



HAL
open science

Mécanismes par lesquels la recombinaison homologue prévient les défauts mitotiques induits par le stress répliatif

Anissia Ait Saada

► **To cite this version:**

Anissia Ait Saada. Mécanismes par lesquels la recombinaison homologue prévient les défauts mitotiques induits par le stress répliatif. Génétique. Université Paris Saclay (COMUE), 2018. Français. NNT : 2018SACLS167 . tel-01845376

HAL Id: tel-01845376

<https://theses.hal.science/tel-01845376>

Submitted on 20 Jul 2018

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Mécanismes par lesquels la recombinaison homologue prévient les défauts mitotiques induits par le stress réplicatif

Thèse de doctorat de l'Université Paris-Saclay
préparée à l'Université Paris Sud

École doctorale n°577, Structure et Dynamique
des Systèmes Vivants, (SDSV)
Spécialité de doctorat: Sciences de la vie et de
la santé

Thèse présentée et soutenue à Orsay, le 26 juin, 2018, par

Anissia Ait Saada

Composition du Jury :

Simon Saule Professeur de l'Université Paris Sud XI, Directeur de Recherche, Institut Curie (UMR 3347)	Président
Marie-Noëlle Prioleau Directeur de Recherche, Institut Jaques Monod (UMR7592)	Rapporteur
Vincent Géli Directeur de Recherche, CRCM (UMR7258)	Rapporteur
Armelle Lengronne Chargée de Recherche, IGH (UPR1142)	Examinatrice
Marie-Jeanne Pillaire Chargée de Recherche, CRCT (U1037)	Examinatrice
Sarah Lambert Directeur de Recherche, Institut Curie (UMR3348)	Directeur de thèse



Université Paris-Saclay
Institut Curie- Section de Recherche

THÈSE

Pour obtenir le grade de
Docteur en Sciences de L'Université Paris-Saclay
École doctorale "Structure et dynamique des systèmes vivants"

Présentée et soutenue par

Anissia Ait Saada

Le 26 juin 2018

**Mécanismes par lesquels la recombinaison homologe prévient les défauts
mitotiques induits par le stress réplicatif**

Jury

Prof. Simon Saule

Dr Marie-Noëlle Prioleau

Dr Vincent Géli

Dr Armelle Lengronne

Dr Marie-Jeanne Pillaire

Dr Sarah Lambert

Président du Jury

Rapporteur

Rapporteur

Examinatrice

Examinatrice

Directrice de thèse



université
PARIS-SACLAY

N° INE: 0jj0dm00m0

Remerciements

Après 4 ans de thèse, 7 mois de stage de M2, 3 mois de stage de M1 sur les 6 années passées en France, le temps est arrivé de remercier les personnes qui m'ont aidée et soutenue (et qui ont supporté ma personnalité bruyante) durant cette aventure.

Je tiens d'abord à remercier les membres du jury pour avoir accepté de participer à l'évaluation de mon travail. Merci aux rapporteurs, Dr. Marie-Noëlle Prioleau et Dr. Vincent Géli d'avoir accepté de faire partie du jury et de m'avoir accordé un délai supplémentaire pour la finalisation du manuscrit. Merci aux Dr. Armelle Lengronne et Dr. Marie-Jeanne Pillaire d'avoir accepté d'être examinatrices de ce travail. Enfin, je remercie le professeur Simon Saule, président du jury. J'ai eu le privilège de vous avoir comme professeur durant mon master et j'ai maintenant l'honneur de vous avoir comme président du jury de thèse et je vous en remercie. Je tiens à remercier ici, le Dr. Philippe Pasero qui a suivi ces travaux durant ces quatre années. Au meilleur des tuteurs : merci.

Je remercie la personne sans qui rien n'aurait été possible, ma directrice de thèse Sarah Lambert. Merci de m'avoir encadrée durant toutes ces années et d'avoir cru en moi. Merci de m'avoir laissé assez de liberté à la paillasse pour pouvoir m'épanouir dans le développement des projets mais sans jamais m'avoir laissée livrée à moi-même. Merci pour ton exigence qui m'a permis non seulement de m'améliorer mais aussi de me faire prendre conscience que je pouvais faire mieux. Merci pour tous tes conseils qui ont contribué à alimenter ma réflexion. Merci de m'avoir offert l'opportunité d'être impliquée dans différents projets du laboratoire. Merci pour le privilège que tu m'as accordé en me permettant de participer à plusieurs meetings (peu d'étudiants en thèse peuvent se targuer d'avoir participé à autant de meetings). Merci de ton support moral tout au long de mes démarches administratives. C'est le cœur lourd que je quitterai le laboratoire mais aussi avec une immense fierté d'avoir pu travailler avec toi. J'espère que mes ailes arriveront à se déployer sans toi pour me chaperonner scientifiquement.

Je remercie les membres actuels et passés de l'équipe. J'adresse un remerciement spécial à Karine Fréon, Ana Teixeira-Silva et Julien Hardy. Karine, il y a énormément de choses pour lesquelles je te suis redevable, je ne citerai que celle-ci : merci pour toutes les fois où tu as rattrapé mes bêtises avant même quand je les fasse. Je ne sais pas comment j'aurais fait sans toi. Ana

Carolina, je te mets avec les membres actuels même si tu es en théorie « un membre passé » car tu es toujours présente. Je te remercie simplement d'être TOI (si je rentre dans les détails les remerciements feront la moitié du manuscrit, il est déjà assez gros comme ça). Julien, mon beau Juju, merci pour toutes les fois où tu m'as aidée et surtout disséqué des boîtes. Tu me manqueras tellement si jamais je dois faire des dissections dans le prochain labo où j'irai. Enfin, je vous remercie tous les trois pour tous les bons moments qu'on a passés ensemble. Je remercie également Charlotte Audoynaud. Je te remercie pour ta précieuse aide, ta gentillesse, tes charlottes aux poires et tes crêpes (miam). Je remercie Karol Kramaz, une des personnes les plus pragmatique, gentille et efficace que je connaisse ; et avec qui, il est très agréable de travailler et de discuter. Je n'oublie évidemment pas les autres membres de l'équipe, Louise Dupoiron (toujours de bonne humeur), Dingli Dai et Virginie Boucherit avec qui il est et il sera agréable de travailler. Je remercie chaleureusement Ismaïl Iraqui et Audrey Costes de leur patience et du temps qu'ils m'ont consacré pour me former au tout début, lors de mon arrivée.

Je tiens à remercier également les « visiteurs » qui ont été de passage au laboratoire. Rofl Kraehenbuehl, ou plutôt Rolfounet, une personne que j'ai eue énormément de plaisir à côtoyer. Catherine Freudenreich avec qui il a été très stimulant de travailler. Et le dernier arrivant, Kirill Lobachev que je remercie pour les conversations scientifiques et non scientifiques qu'on a eues et qu'on aura, « pomme de terre », encore ; et pour son soutien durant les dernières étapes de la rédaction de cette « chose ».

J'ai eu la chance de bénéficier d'une ambiance exceptionnelle au travail grâce aux membres de l'équipe mais aussi grâce aux membres de l'unité 3348. Je remercie chaleureusement Mounira Amor-Guéret pour son soutien lors de toutes les demandes de financement et ses lettres de recommandation. Merci de toujours afficher un sourire radieux quand tu nous croises dans le couloir !. Je remercie Hamza Mammeri et Elias Bou Samra pour leurs conseils et les innombrables conversations qu'on a eues. Je remercie Sandra Silveira, une amie formidable qui prend bien soin de moi. Je remercie Rosine Onclercq-Delic pour sa gentillesse à mon égard. Merci à Simon Gemble pour m'avoir formée au L2 et pour son aide. Je remercie Sylvounet (Sylvain Martineau), un collègue formidable avec qui j'apprécie de discuter. Les moments passés à la cantine en ta compagnie (mais pas les repas en soi) me manqueront énormément. Enfin, je remercie un ex-membre de l'unité, Pierre-Marie Gérard, la personne que j'ai le plus maltraitée verbalement, pour

avoir résisté à la tentation de m'étrangler. Je profite de ces remerciements pour te dire tout le respect que j'ai pour toi.

Je tiens à remercier les membres des services techniques et informatiques : Jean Jacques Lopes (je sais que je vais rire rien qu'en te voyant), Amin Essid et Patrice Lopez (pour leur soutien et tout le chocolat qu'il m'ont offert) et Patricia Grosjean (ma voisine de bureau durant ces derniers mois) et Cédric Duprilot (qui m'a aidée à surmonter le cap des 17 pages d'introduction). Votre sollicitude à mon égard, surtout durant ces derniers mois, m'a marquée. Je remercie Pascale Léon et Laurence Jagot pour le travail qu'elles font et leur aide dès que j'en ai besoin. Je remercie tous les membres de la laverie et notamment Mirella Miredin et Lilia Chregui pour toutes les fois où elles ont préparé des milieux après une commande de dernière minute. Je remercie les membres de la Plateforme IBISA d'imagerie Cellulaire et Tissulaire ainsi que Anne Paoletti et Giulia Paoletti pour leur aide avec les expériences de microscopie.

Je remercie les membres de l'école doctorale SDSV : Pierre Capy et Jean Luc Pernodet pour le temps qu'ils prennent à discuter avec les doctorants mais aussi Sandrine Le Bihan pour le remarquable travail qu'elle fait au sein de l'ED et sa précieuse aide.

Je remercie ma sœur, Mira, pour avoir supporté mon exubérance notamment lors de la rédaction de la thèse, pour m'avoir soutenue, pour avoir accepté tous les surnoms dont je l'affuble. Je remercie mon frère, Nazim ou plutôt connu sous le nom de Poupone, pour son soutien moral au quotidien. Je remercie mes cousines, Myriam et Nora, qui ont été là pour moi, et ce, dès le premier jour où je suis arrivée en France. Je remercie mes propriétaires Annick et Henry pour le soutien qu'ils m'apportent dans ce que j'entreprends, leur gentillesse à mon égard, leur intérêt pour mon projet de recherche même s'il reste très abstrait pour eux, pour les nombreuses fois où ils m'ont déposée au labo les weekends, pour toutes les fois où j'ai eu le plaisir de trouver le dîner servi, et j'en passe. Plus que des propriétaires, vous êtes des membres de ma famille. Je remercie mes copines de toujours Lynda et Souhila, ni les années ni la distance n'ont réussi à altérer notre amitié. Merci pour votre soutien durant l'éprouvante période de la rédaction et votre capacité à me remonter le moral. Je remercie mon ami Saber pour tous les bons moments qu'on a passés ensemble (je pense notamment au Pictionnary et à Fellag) et son soutien.

*Je dédie cette thèse à mes parents,
puissent-ils être aussi fiers de leur fille que je le suis de les avoir comme parents*

Table des Matières

Remerciements	3
Table des Matières	9
Liste des Figures	13
Liste des Tableaux	16
Abréviations	17
Préambule	21
Introduction.....	23
I. Dommages à l'ADN et mécanismes de réparation	25
1. Sources de dommages à l'ADN	25
2. Réponses cellulaires aux dommages à l'ADN	26
2.1. Signalisation des dommages	27
2.2. Mécanismes de réparation des dommages	30
3. Les grands mécanismes de réparation des cassures double-brin de l'ADN	34
3.1. Nature et conséquences des CDBs.....	34
3.2. Voies de réparation des CDBs	36
II. La Recombinaison Homologue.....	42
1. Rôles biologiques de la recombinaison homologue	42
2. Mécanismes moléculaires de la recombinaison homologue	42
2.1. Résection des cassures double-brin : la machinerie de résection	44
2.2. Formation du filament nucléoprotéique et échange de brin: Focus sur la recombinaison Rad51/RecA	62
2.3. Médiators de la RH.....	68
2.4. Modèles de la recombinaison homologue.....	73
3. Régulation de la RH au cours du cycle cellulaire	80
4. La recombinaison homologue, une source de mutations	81
III. Réplication de l'ADN et stress réplcatif.....	83
1. Réplication de l'ADN	84
1.1. Initiation	85

1.2.	Elongation.....	86
1.3.	Terminaison.....	87
2.	Le stress réplicatif	90
2.1.	Sources du stress réplicatif	93
2.2.	Prise en charge des fourches de réplication bloquées	94
3.	Conséquences du stress réplicatif sur la mitose.....	103
3.1.	La synthèse d'ADN mitotique (MiDAS)	104
3.2.	Les ponts anaphasiques	105
3.3.	Centrosomes surnuméraires et mitoses multipolaires.....	108
3.4.	Micronoyaux.....	108
IV.	Rôle de la recombinaison homologue dans la réponse au stress réplicatif.....	109
1.	La recombinaison homologue est associée à la réplication de l'ADN	111
2.	Mécanismes de redémarrage des fourches de réplication par la recombinaison homologue et leurs conséquences	111
2.1.	Redémarrage des fourches de réplication cassées.....	112
2.2.	Redémarrage des fourches de réplication non cassées.....	116
3.	Fonctions post-réplicatives de la recombinaison homologue.....	119
4.	Protection des fourches de réplication par la recombinaison homologue	120
V.	<i>Schizosaccharomyces pombe</i> , une levure modèle.....	124
VI.	Essai génétique pour étudier les conséquences d'un blocage de fourche de réplication chez <i>S. pombe</i>	126
	Objectifs	129
	Résultats.....	131
I.	Les fourches de réplication non protégées sont converties en ponts mitotiques	135
1.	Résumé.....	135
2.	Publication #1	137
II.	Le facteur du NHEJ Ku joue un rôle dans la résection des fourches de réplication bloquées non cassées	171
1.	Résumé.....	171
2.	Publication #2	173
III.	Exploration de la réversion de fourche dans le système <i>RTS1</i> -RFB.....	199

1.	Mise en évidence de la réversion des fourches bloquées au niveau de la barrière <i>RTS1</i>	199
2.	La réversion des fourches bloquées dans le système <i>RTS1</i> -RFB est dépendante de Rad52	208
V.	Rôle du remodelleur de la chromatine Fft3 au niveau des fourches de réplication dysfonctionnelles	209
1.	Fft3 est impliquée dans la résection des fourches de réplication dysfonctionnelles	209
2.	Recrutement de Fft3 au niveau de la barrière <i>RTS1</i>	212
3.	Fft3 joue un rôle dans le redémarrage des fourches de réplication bloquées....	213
	Discussion.....	217
I.	L'absence de Rad51/Rad52 révèle le côté obscur de la résection par Exo1	221
II.	Quand la stabilité du filament Rad51 prime sur sa capacité d'échange de brin	224
1.1.	La protection et le redémarrage des fourches par Rad51/Rad52 sont génétiquement séparables.....	225
III.	Ku se fait complice de la RH pour le redémarrage des fourches non cassées.....	226
IV.	La réversion de fourche, la clé de tous les mystères ?	228
1.2.	Limites des techniques utilisées pour étudier la réversion de fourche.....	231
V.	Non-disjonction des chromatides sœurs en mitose et instabilité génétique.....	233
VI.	Rad51/Rad52 : les gardiens de la stabilité des fourches et du génome	237
VII.	Perspectives expérimentales.....	240
VIII.	Conclusion	241
	Matériel et Méthodes	243
I.	Souches et milieux.....	245
1.	Induction de la barrière <i>RTS1</i>	245
2.	Souches	246
3.	Croisements de souches	246
II.	Transformation.....	246
III.	Gels d'ADN bidimensionnels, 2DGE	247
1.	Préparation des échantillons d'ADN:.....	249
2.	Digestion de l'ADN par les enzymes de restriction :.....	249
3.	Enrichissement des intermédiaires de réplication	250

3.1. Sur des colonnes de BND-Cellulose.....	250
3.2. Sur des colonnes Qiagen Tip20	250
4. Séparation des intermédiaires de réplication par gel d'ADN bidimensionnel (neutre/neutre)	251
5. Séparation des intermédiaires de réplication par gel d'ADN bidimensionnel en conditions dénaturantes (neutre/alcalin)	252
6. Détection du bras réversé.....	252
IV. Analyse de l'ADNsb par qPCR.....	254
V. Microscopie sur cellules vivantes.....	257
VI. Sensibilité aux agents génotoxiques	258
Références.....	259
Annexe.....	303

Liste des Figures

Figure 1 : Dommages à l'ADN et mécanismes de réparation. ...	26
Figure 2 : Organisation de la réponse aux dommages de l'ADN.....	27
Figure 3 : Mécanismes de réparation de l'ADN.	34
Figure 4 : Mécanismes de formation des différents types de CDBs et leur réparation.....	35
Figure 5 : Réparation des CDBs par le NHEJ (Non-homologous end joining) et la recombinaison homologue (HR, Homologous recombination).	36
Figure 6 : Choix entre le NHEJ et la recombinaison homologue en fonction du cycle cellulaire.	37
Figure 7 : Différences entre la résection au cours du NHEJ canonique (en G1) et de la recombinaison homologue (en G2).....	39
Figure 8 : Mécanismes de réparation des CDBs par jointure des extrémités.....	40
Figure 9 : Mécanismes de réparation des CDBs dépendants et indépendants de la résection.	41
Figure 10 : Les étapes de la recombinaison homologue.....	43
Figure 11 : Modèle de la résection en deux étapes chez <i>S. cerevisiae</i>	45
Figure 12 : Modèle de la résection des CDBs chez <i>S. pombe</i>	46
Figure 13 : Le complexe MRN/X.....	48
Figure 14 : Modèle de la résection bidirectionnelle des CDBs.	50
Figure 15 : Modèle du maintien des extrémités des CDBs par MRN et CtIP.	53
Figure 16 : Rôle de RPA dans coordination de la résection des CDBs chez <i>S. cerevisiae</i>	57
Figure 17 : Résection des CDBs dans un contexte chromatinien chez <i>S. cerevisiae</i>	59
Figure 18 : Mécanisme par lequel MRN/X stimule le remodelage de la chromatine.....	60
Figure 19 : Modèle illustrant le rôle de Fun30/SMARCAD1 dans la résection extensive des CDBs.....	61
Figure 20 : Structure des homologues de RecA.	65
Figure 21 : Régulation des fonctions de Rad51 par les médiateurs de la recombinaison chez <i>S. cerevisiae</i>	69
Figure 22 : Stimulation de la recombinaison homologue dépendante de Rad51 selon deux voies chez les mammifères.	71

Figure 23 : Modèle représentant les fonctions de Rad54 durant la recombinaison homologue.	72
Figure 24 : Modèles de la recombinaison homologue.....	74
Figure 25 : Les modes de synthèse de l'ADN au cours du BIR.	78
Figure 26 : Mécanismes par lesquels la recombinaison homologue peut être mutagène.....	82
Figure 27 : Etapes principales de la réplication chez les eucaryotes.	85
Figure 28 : Modèle de la terminaison de la réplication chez les eucaryotes.....	89
Figure 29 : Voies prévenant l'instabilité génomique en réponse au stress réplcatif.....	91
Figure 30 : Mécanismes proposés pour la formation et la prise en charge des fourches réversées chez les mammifères <i>in vivo</i>	97
Figure 31 : Mécanismes de tolérance des dommages au cours de la réplication.	102
Figure 32 : Nature des ponts anaphasiques type UFB.	106
Figure 33 : Rôles de la recombinaison homologues au niveau des fourches de réplication.	110
Figure 34 : Le BIR dans tous ses états.	115
Figure 35 : Modèles de redémarrage des fourches de réplication par la recombinaison homologue chez <i>S. pombe</i>	117
Figure 36 : Modèles de redémarrage de fourche associé aux changements de matrice.....	118
Figure 37 : Modèle de la protection des fourches dysfonctionnelles par BRCA2 et RAD51.	123
Figure 38 : <i>Schizosaccharomyces pombe</i>	125
Figure 39 : Schéma du système <i>RTS1</i> -RFB.	128
Figure 40 : Modèle proposé pour le redémarrage des fourches de réplication chez <i>S. pombe</i>	172
Figure 41 : Principe de détection de la réversion de fourche au niveau de la barrière <i>RST1</i>	200
Figure 42 : Les fourches de réplication réversent suite à l'activation de la barrière <i>RTS1</i>	201
Figure 43 : Estimation de la distance sur laquelle les fourches de réplication réversent.	204
Figure 44 : Profil du bras réversé en fonction de la résection ou non des fourches de réplication bloquées.	205
Figure 45 : Analyse de la réversion de fourche par gels d'ADN bidimensionnels.	207
Figure 46 : La réversion de fourche au niveau de la barrière <i>RTS1</i> est dépendante de Rad52.	208

Figure 47 : Fft3 promeut la résection des fourches dysfonctionnelles via son activité ATPase.	211
Figure 48 : Immuno-précipitation de Fft3 à la chromatine.....	213
Figure 49 : Fft3 promeut le redémarrage des fourches de réplication par la RH indépendamment de son activité ATPase.....	215
Figure 50 : Modèle proposé pour le rôle de Rad51 dans la protection et le redémarrage des fourches de réplication chez <i>S. pombe</i>	220
Figure 51 : Comment former des UFBs.	233
Figure 52 : Interprétation des signaux obtenus suite à l'analyse des intermédiaires de réplication par 2DGE.	248
Figure 53 : Constructions utilisées pour analyser la réversion de fourches par gels d'ADN à une dimension.....	253

Liste des Tableaux

Tableau 1 : Facteurs impliqués dans la signalisation des dommages à l'ADN.....	29
Tableau 2 : Récapitulation de certaines caractéristiques de RecA et Rad51.....	63
Tableau 3 : Protéines capables d'induire la réversion de fourche et leur restauration après réversion.....	98

Abréviations

ADNsb	ADN simple-brin	CDT1	Chromatin Licensing and DNA Replication Factor 1
ADNdb	ADN double-brin	CFS	Common Fragile Site
53BP1	53 Binding Protein 1	CHK1	Checkpoint Kinase 1
5-FOA	5-Fluorootic Acid	CMG	Cdc45–Mcm–GINS
alt-NHEJ	Alternative Non-Homologous End-Joining	CO	Crossover
ATR	Ataxia Telangiectasia Mutated-Related	CPT	Camptothecin
B-NHEJ	Backup Non-Homologous End-Joining	CSB	Cassure Simple-Brin
BER	Base Excision Repair	CtIP	CtBP-interacting protein, aka RBBP8
BIR	Break-Induced Replication	Ctp1	CtIP-related Protein
BLM	Bloom Syndrome RecQ like helicase	DDR	DNA Damage Response
Brc1	BRCT domain protein	DNA-PKcs	DNA-dependent Protein Kinase catalytic subunit
BRCA1	Breast Cancer 1	DSB	Double-Strand Break
BRCA2	Breast Cancer 2	DSBR	Double-Strand Break Repair
BTR	BLM, Topo IIa, RMI1 and RMI2	Exo1	Exonuclease 1
c-NHEJ	classical or canonical Non-Homologous End-Joining	FANC	Fanconi Anemia (FA) Core Complex
CDB	Cassure Double-Brin	FoSTeS	Fork Stalling and Template Switch
Cdc45	Cell Division Cycle 45	Fft3	Fission yeast Fun Thirty
CDK	Cyclin-Dependent Kinase	Fun30	Function Unknown 30

GIN5	Complex Composed of Sld5, Psf1, Psf2, and Psf3. From the first letters of the Japanese numbers 5-1-2-3 (<i>go-ichi-ni-san</i>)	PARP1	Poly (ADP-ribose) polymerase 1
H2A	Histone 2 A	PCNA	Proliferating Cell Nuclear Antigen
HTLF	Human T-cell Leukemia virus enhancer factor	Phase G1	Phase "Gap 1"
HU	Hydroxyurea	Phase G2	Phase "Gap 2"
ICL	Inter-strand Cross-link repair	Phase S	Phase de Synthèse
Ku	Ku70/Ku80 complex	Pol $\alpha/\beta/\epsilon$	DNA polymerase $\alpha/\beta/\epsilon$
Mat	Mating type locus	Rad	Radiation sensitive (exemple Rad51)
MCM	Mini-chromosome Maintenance Complex	RecA	Recombinase A
MiDAS	Mitotic DNA Synthesis	RecQ	ATP-dependent DNA helicase
MMBIR	Micro-homology Mediated Break-Induced Replication	RDR	Recombination-dependent Replication
MMEJ	Micro-homology-Mediated End-Joining	RFB	Replication Fork Barrier
MMR	Mismatch Repair	RFC	Replication Factor C
MMS	Methyl Methanesulfonate	RH	Recombinaison Homologue
Mre11	Meiotic recombination 11	ROS	Reactive Oxygen Species
NER	Nucleotide Excision Repair	RPA	Replication Protein A
NHEJ	Non-Homologous End-Joining	Rqh1	RecQ type DNA helicase
Nsb1	Nijmegen breakage syndrome 1	RS	Replication Slippage
ORC	Origin Recognition Complex	RSC	Remodeling the Structure of Chromatin
		Rtf1	Replication Termination Factor 1

RTS1	Replication Termination Sequence	SSA	Single Strand Annealing
Sae2	Sporulation in the Absence of Spo11 2	STR	Sgs1, Top3, Rmi1
SDSA	Synthesis Dependent Strand Annealing	UFB	Ultrafine Bridge
Sgs1	Slow Growth Suppressor 1	UV	Ultraviolet
SMARCAD1	SWI/SNF-related, Matrix-associated Actin-dependent Regulator of Chromatin, Subfamily A, Containing DEAD/H Box 1	XRCC	X-ray Repair Cross Complementing (Example XRCC4)
		Xrs2	X-ray sensitive 2
Spo11	Sporulation; Initiator of Meiotic DSBs	ZRANB3	Zinc Finger, RAN-binding domain containing 3

Préambule

Au cours du processus de réplication de l'ADN, les cellules sont exposées à différents stress réplicatifs (d'origine endogène ou exogène) qui perturbent la progression des fourches de réplication. Ces stress mettent en péril à la fois la fidélité de duplication des chromosomes et leur ségrégation en mitose. Toutefois, l'interconnexion entre le stress réplicatif et les défauts mitotiques, qui rappelons-le caractérisent les cellules cancéreuses, n'est pas complètement élucidée. La recombinaison homologue (RH) est un mécanisme important dans le maintien de la stabilité génétique. Le rôle de la RH dans la gestion du stress réplicatif, bien qu'indéniable, est moins bien caractérisé que son rôle dans la réparation des cassures double-brin (CDBs) et fait l'objet de recherches intensives.

La RH est perçue comme un mécanisme soutenant la robustesse de la réplication car elle intervient dans : (i) la réparation des fourches cassées, (ii) le redémarrage des fourches dysfonctionnelles, (iii) la réparation post-réplicative des brèches simple-brin et (iv) la protection et la stabilisation des fourches bloquées. Il s'avère que les cellules de mammifères déficientes pour la recombinaison homologue souffrent d'un stress réplicatif chronique et d'une incidence élevée de défauts mitotiques.

Afin d'étudier les mécanismes par lesquels la RH contribue à la dynamique de réplication de l'ADN, le laboratoire a développé chez *Schizosaccharomyces pombe* un essai génétique, type RFB (pour *Replication Fork Barrier*), permettant de bloquer de manière polaire et conditionnelle une seule fourche de réplication située à un *locus* défini. La fourche bloquée peut être sauvée par deux mécanismes en compétition : (i) la fusion avec la fourche convergente et (ii) le redémarrage par la RH. Il a été montré que le redémarrage de fourche se fait indépendamment de la formation d'une CDB. L'exposition d'un ADN simple-brin par MRN et Exo1 (jusqu'à 1kb) permet de recruter les facteurs de la RH. Ainsi, les fonctions de la RH au cours de la réplication peuvent être explorées indépendamment de ses fonctions dans la réparation des CDBs. En utilisant ce système de blocage fourche, nous nous sommes intéressés dans ce travail à déchiffrer les moyens mis en œuvre par la RH pour prévenir les effets délétères liés au stress réplicatif. Nous avons notamment pu lier, au niveau moléculaire

et en termes de mécanisme, la fonction de protection des fourches de réplication par la RH et la formation de défauts mitotiques incluant les ponts anaphasiques type UFB (pour *Ultrafine bridges*).

Avant de présenter les résultats obtenus durant ma thèse, la section introduction de ce manuscrit présente un descriptif (long mais non exhaustif) (i) du mécanisme de la RH et de la réplication, (ii) du stress réplicatif et de ses conséquences sur la mitose et (iii) des fonctions réplicatives de la RH au cours du stress réplicatif. La première partie des résultats est présentée sous forme d'articles dans lesquels : (i) la fonction de protection des fourches par la RH dans la prévention des défauts mitotiques a été explorée (Ait Saada et al., 2017) ; et (ii) un rôle inattendu de Ku dans le redémarrage des fourches de réplication bloquées a été mis en évidence (Teixeira-Silva et al., 2017). Dans la seconde partie de cette section sont présentées des données non publiées concernant la réversion des fourches de réplication au niveau de la barrière *RTS1*. Enfin, des résultats, générés dans un cadre collaboratif avec un autre laboratoire, concernant le rôle d'un remodeleur de la chromatine, Fft3, sont présentés.

La fin du manuscrit comprend une section Matériel et Méthodes dans laquelle les techniques utilisées durant ma thèse sont décrites avec un focus particulier sur l'analyse des intermédiaires de réplication par la technique des gels 2D (ou 2DGE) ; et une Annexe dans laquelle se trouve, entre autres, une revue, non publiée, écrite en collaboration avec Antony Carr (GDS Center, Sussex) intitulée : « *Preserving replication fork integrity and competence via the homologous recombination pathway* ».

Introduction

I. Dommages à l'ADN et mécanismes de réparation

1. Sources de dommages à l'ADN

Chez la plupart des organismes vivants, l'ADN est la molécule à la base de la vie. Ses propriétés font qu'elle contient les informations nécessaires au fonctionnement de la cellule. Constituant le génome, l'ADN est le support de l'information génétique et est transmis aux générations suivantes. Il est donc vital pour les cellules de préserver l'intégrité de leurs génomes, qui sont loin de connaître une vie paisible. En effet, les cellules sont constamment soumises à une grande variété de stress menaçant la stabilité du génome. Ces stress peuvent être d'origine endogène, tel que le métabolisme normal de la cellule produisant des espèces réactives de l'oxygène (ROS), ou exogène, tels que les agents génotoxiques représentés, entre autres, par les rayonnements ultraviolets (UVs), les radiations ionisantes ou encore les agents chimiques endommageant la molécule d'ADN (Camptothécine, hydroxyurée, ...). Les lésions de l'ADN ainsi produites sont de nature très diverse : bases altérées, pontage intra- ou inter-brins, dimères de thymine, cassures double-brin (CDBs) ; et peuvent entraîner la mort cellulaire ou une instabilité génétique si elles sont non ou mal réparées. A cet effet, les cellules ont acquis, au cours de l'évolution, un arsenal efficace qu'elles déploient à chaque attaque contre leur génome : ce sont les mécanismes de réparation de l'ADN (Figure 1).

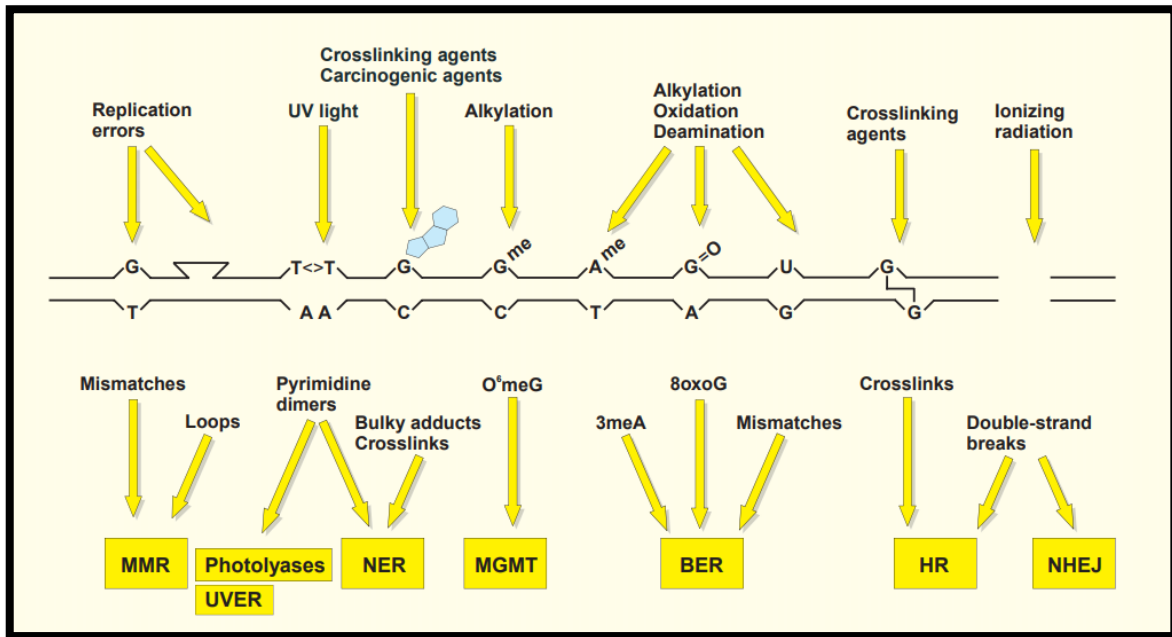


Figure 1 : Dommages à l'ADN et mécanismes de réparation. Différentes sources et types de lésions sont représentées ainsi que leurs mécanismes de réparation. Les bases avec un groupement alkyle (O^6 -methylguanine ou O^6 meG) sont réparées par l'enzyme MGMT (O^6 -methylguanine-DNA methyltransferase) qui retire le groupement alkyle. Les liaisons covalentes au niveau des dimères de pyrimidine peuvent être scindées par des photolyases. La voie UVER est impliquée dans le traitement des dommages photo-induits. Cette voie est présente que chez certains organismes tels que *S. pombe*. Voir le texte pour les autres mécanismes de réparation de l'ADN (MMR, NER, BER, HR, et NHEJ). Modifié de Fleck and Nielsen, 2004.

2. Réponses cellulaires aux dommages à l'ADN

Les cellules ripostent contre le stress génotoxique en activant la réponse aux dommages de l'ADN (DDR, pour *DNA Damage Response*). Le DDR est constitué d'un réseau de détection de dommages, de transduction du signal et de protéines effectrices visant, entre autres, à arrêter le cycle cellulaire et à stimuler la réparation de l'ADN (Figure 2). Un défaut touchant un des acteurs du DDR est associé à une instabilité génétique et une prédisposition tumorale.

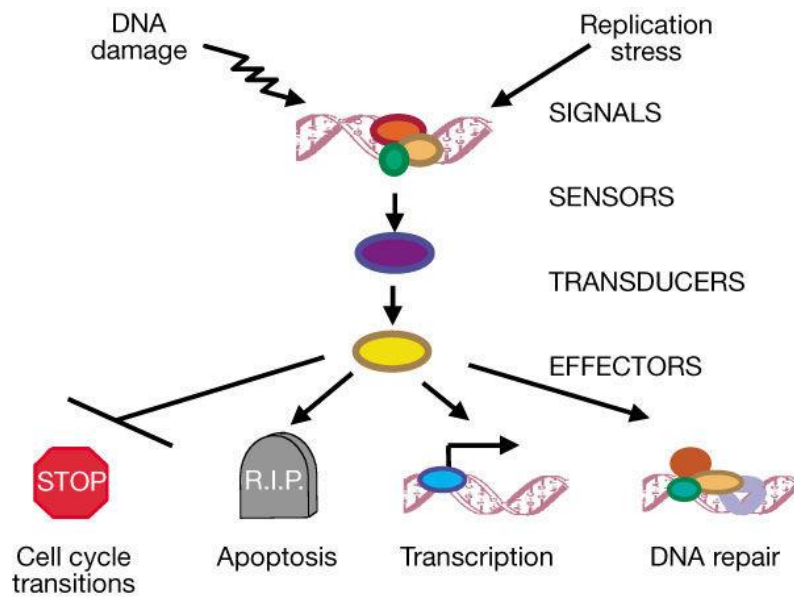


Figure 2 : Organisation de la réponse aux dommages de l'ADN. La voie du DDR (DNA Damage Response) est un réseau de transduction de signal impliquant des senseurs (tels que le complexe MRN), des transducteurs (tels que ATM et ATR qui activent les checkpoints kinases Chk2 et Chk1) et des effecteurs (généralement les protéines cibles de Chk1/Chk2 telles que p53 et Wee1). Plusieurs issues sont possibles suites à l'activation du DDR : arrêt du cycle cellulaire, activation de l'apoptose, activation de la transcription de certains gènes impliqués dans ces processus et réparation effective de la lésion. D'après Zhou and Elledge, 2000.

2.1. Signalisation des dommages

Les facteurs clés impliqués dans la signalisation des dommages à l'ADN sont des sérine-thréonine kinases appartenant à la famille des PIKK (pour *Phosphatidylinositol 3-Kinase-like protein Kinases*) : ATM (Tel1 chez *Saccharomyces cerevisiae* et *Schizosaccharomyces pombe*), ATR (Mec1 *S. cerevisiae*, Rad3 chez *S. pombe*) et DNA-PK (absente chez les levures) (Tableau 1). De façon très simplifiée, ATM est activée par le complexe MRN (Mre11/Rad50/Nbs1) sur les CDBs et ATR est activée par l'ADN simple-brin (ADNsb) recouvert par RPA (pour *Replication protein A*). L'activation du DDR entraîne un changement du paysage chromatinien au niveau du site de dommage. L'exemple le plus caractérisé est la phosphorylation du variant d'histone H2AX sur la sérine 139 (γ H2AX) chez les mammifères (Burma et al., 2001; Rogakou et al., 1998; Ward and Chen, 2001), de l'histone H2A sur la sérine 129 de *S. cerevisiae* (Downs et al., 2000) et des histones H2A.1 et H2A.2 sur les sérines 129 et 128, respectivement, chez *S. pombe* (γ H2A) (Nakamura et al., 2004). Cette modification se produit sur le site de dommage et se propage sur plusieurs milliers (chez les levures) voire millions de paires de bases (chez les

mammifères), constituant ainsi une plateforme pour le recrutement des acteurs impliqués dans la réparation (Paull et al., 2000; Rogakou et al., 1999; Shroff et al., 2004; Ward et al., 2003).

Les cibles de ATM et ATR les mieux étudiées sont CHK2 et CHK1 (pour *Checkpoint Kinase 1* et *2*) qui déclenchent une cascade de phosphorylations activant plusieurs protéines cibles afin de ralentir ou d'arrêter le cycle cellulaire *via* la réduction de l'activité des CDKs (pour *Cyclin Dependant Kinase*) (Figure 2 et Tableau 1). En parallèle, ces voies de signalisation stimulent la réparation des lésions : (i) en stimulant l'expression des gènes codant les protéines de la réparation de l'ADN, (ii) en recrutant les facteurs de réparation sur le site de dommage, et (iii) en régulant l'activité des protéines de réparation de l'ADN *via* des modifications post-traductionnelles.

Tableau 1 : Facteurs impliqués dans la signalisation des dommages à l'ADN. Les orthologues des protéines sont indiquées chez l'homme (*Hs*, *Homo sapiens*), *S. cerevisiae* (*Sc*) et *S. pombe* (*Sp*).

<i>Hs</i>	<i>Sc</i>	<i>Sp</i>	Fonctions chez l'homme
ATM	Tel1	Tel1	ATM est recrutée sur les CDBs de façon MRN dépendante. ATM phosphoryle H2AX et plusieurs autres protéines dont CHK2 (Blackford and Jackson, 2017; Falck et al., 2005).
CHK2	Rad53	Cds1	Kinase effectrice activée par ATM. Elle est impliquée dans l'arrêt du cycle cellulaire en G1 (Smith et al., 2010).
ATR	Mec1	Rad3	ATR forme un complexe avec ATRIP. Le complexe est activé par l'ADNsb recouvert par RPA. Sa cible principale est CHK1 qu'il phosphoryle afin d'induire un arrêt du cycle cellulaire (Cortez et al., 2001; Edwards et al., 1999; Zou and Elledge, 2003).
ATRIP	Ddc2	Rad26	ATRIP est le partenaire de ATR dans la réponse aux dommages de l'ADN et au stress répliatif (Zou and Elledge, 2003).
ETAA1	-	-	Active de ATR (indépendamment de TopBP1) (Haahr et al., 2016).
CHK1	Chk2	Chk1	Kinase effectrice activée par ATR-ATRIP. Impliquée dans l'activation des points de contrôle cellulaire (G1/S et G2/M) (Smith et al., 2010).
MRN	MRN	MRX	MRE11-RAD50-NBS1/Xrs2. Senseur de CDBs, le complexe MRN agit en amont de ATM qu'il active. Il Interagit avec ATM via NBS1 (Falck et al., 2005; Uziel et al., 2003).
DNA-PKcs	-	-	Kinase recrutée sur les CDBs et activée par Ku. Plutôt connue pour son rôle dans le NHEJ, DNA-PKcs est aussi impliquée dans l'activation du checkpoint en réponse au stress répliatif (Ashley et al., 2014; Falck et al., 2005).
53BP1	Rad9	Crb2	Impliquée dans l'activation de CHK2, 53BP1 limite la résection des CDBs en G1 (Daley and Sung, 2014)
TopBP1	Dpb11	Cut5/ Rad4	Forme un complexe avec 9-1-1 et Rad17 sur les fourches de réplication bloquées et active ATR-ATRIP (Kumagai et al., 2006; Navadgi-Patil and Burgers, 2008; Yan and Michael, 2009).
MDC1	-	Mdb1	Interagit avec γ H2AX et est requise pour l'accumulation de 53BP1, NBS1 et ATM sur la chromatine endommagée (Chapman and Jackson, 2008; Stucki et al., 2005).
RPA	RPA	RPA	RPA permet à ATR-ATRIP d'être recruté sur l'ADNsb et stimule la phosphorylation de RAD17 par ATR-ATRIP (Zou and Elledge, 2003).
Rad9 Rad1 Hus1	Ddc1 Rad17 Mec3	Rad9 Rad1 Hus1	PCNA-Like. Le complexe 9-1-1 active ATR et facilite le recrutement de TopBP1. Le complexe 9-1-1 est recruté sur la fourche de réplication bloquée par Pol α et/ou TopBP1 (Ohashi et al., 2014; Yan and Michael, 2009)

RAD17	Rad24	Rad17	Forme le complexe RFC-Like. RAD17 est recrutée par RPA et activée par ATR-ATRIP. RAD17 facilite le recrutement de 9-1-1 et MRN (Paull and Lee, 2014).
CDK1	Cdc28	Cdc2	Kinase cycline-dépendante. Associée à la cycline B, elle régule la progression du cycle cellulaire et facilite les étapes de la RH (Ira et al., 2004)
CDC25	Mih1	Cdc25	Phosphatase qui cible CDK pour promouvoir progression du cycle cellulaire et l'entrée en mitose (Smith et al., 2010).
WEE1	Swe1	Wee1/ Mik1	Kinase activée par CHK1. Elle inhibe la progression du cycle cellulaire (Lee et al., 2001)

2.2. Mécanismes de réparation des dommages

Une fois la signalisation des dommages mise en place, ceux-ci sont réparés par divers mécanismes adaptés à chaque type de lésion. Ces mécanismes sont très importants car leur dysfonctionnement est souvent à l'origine de syndromes caractérisés, entre autres, par une instabilité génétique et une prédisposition tumorale. Plusieurs voies permettent de corriger les différents types de lésions : la réparation par excision de base (**BER**, pour *Base Excision Repair*), la réparation par excision de nucléotide (**NER**, pour *Nucleotide Excision Repair*), la réparation des mésappariements (**MMR**, pour *MisMatch repair*), la réparation par la jonction d'extrémités non-homologues (**NHEJ**, pour *Non Homologous End Joining*) et la recombinaison homologue (**RH**) (Figure 3). Les 3 premiers mécanismes sont sollicités pour la réparation des lésions simple-brin de l'ADN et sont des mécanismes très conservés au cours de l'évolution. Le NHEJ et la RH étant les principales voies de réparation des CDBs, ils seront développés dans la section suivante. Tous ces mécanismes nécessitent l'intervention de plusieurs protéines ainsi que l'excision et la resynthèse du brin d'ADN endommagé. Au contraire, il existe une voie faisant intervenir qu'une seule enzyme, la **MGMT** (6-O-méthylguanine-ADN méthyltransférase), afin d'induire la simple réversion de la lésion initiale. La MGMT intervient dans le retrait de groupements alkyles (induits par exemple par le MMS, pour *methyl metanesulfonate*) via une réaction suicide. Cette réaction consiste à transférer le groupement alkyle de la guanine endommagée sur un des résidus cystéines de la MGMT, ce qui inactive l'enzyme de manière irréversible (Fleck and Nielsen, 2004).

Le NER : La réparation par excision de nucléotide prend en charge des lésions qui altèrent la structure de l'hélice d'ADN, telles que celles induites par les UVs (dimers de thymines) (Figure 3a) (Nospikel, 2009). La reconnaissance du dommage conduit à l'excision d'un court fragment d'ADNsb contenant la lésion. Le brin d'ADNsb complémentaire intact est utilisé comme matrice par des ADN polymérases. Il existe deux modes de réparation par le NER : le premier dépend de la transcription (TCR, pour *Transcription Coupled-NER*) et le second est dit global (GGR, pour *Global Genomic Repair*). Tandis qu'ils partagent le même mode d'incision, de réparation et de ligature de la lésion, le TCR et le GGR diffèrent dans leur mode de reconnaissance du dommage. Le TCR est initié lorsque l'ARN polymérase II (ARN PolII) bute sur une lésion au niveau de son ADN matrice. Il fait appel à des protéines qui se fixent sur l'ARN polymérase II et dont la déficience est impliquée dans le syndrome de Cockayne (CSA ou ERCC8 et CSB ou ERCC6). Le GGR est initié par le complexe XPC-RAD23B qui reconnaît les distorsions de l'hélice d'ADN. XPC-RAD23B recrute les facteurs impliqués dans le déroulement de l'hélice tels que la sous-unité XPB/XPD contenue dans le facteur de transcription TFIIH (Fleck and Nielsen, 2004). Des mutations dans la voie du GGR sont à l'origine de plusieurs désordres génétiques, le plus connu étant le syndrome le Xéoderma Pigmentosum (XP). Les patients XP présentent une prédisposition à développer des cancers de la peau et de l'œil et une extrême sensibilité à la lumière du soleil.

Le BER : La réparation par excision de base est un mécanisme de réparation de bases endommagées qui n'altèrent pas le squelette de l'hélice (Figure 3b). Ces bases endommagées peuvent correspondre à des bases oxydées (dont la 8-oxoG), à des bases alkylées (3-méthyladenine), à des bases désaminées (hypoxanthine, formée par désamination de l'adénine) ou encore à des uraciles (incorporées par erreur ou générées par la désamination de la cytosine). Le BER est initié par des ADN glycosylases, telles que OGG1 qui reconnaît la 8-oxoG. Ces enzymes reconnaissent et éliminent spécifiquement les bases endommagées ou inappropriées et créent ainsi des sites AP (sites apuriques/aprimidiques) (Krokan et al., 1997). Ces sites AP sont alors clivés par des endonucléases (APE1 chez l'homme) et la cassure simple-brin (CSB) générée est reconnue par PARP1 (pour *poly (ADP-ribose) polymerase-1*) qui orchestre l'accumulation de XRCC1. L'ADN polymérase β incorpore un nouveau nucléotide complémentaire et le complexe XRCC1/Ligase-III fait la soudure avec le nucléotide adjacent

(Figure 3b). Un second mode de réparation de la CSB génère un intervalle d'ADNsb plus long (2 à 12 nucléotides) grâce aux ADN polymérase β ou δ qui synthétisent un nouveau fragment complémentaire tout en déplaçant l'ancien brin dans le sens 5'-3'. Le fragment déplacé est alors clivé par l'endonucléase FEN1 avant l'intervention de la Ligase-I qui rétablit la liaison (Fleck and Nielsen, 2004; Helleday et al., 2014).

Le MMR : Cette voie de réparation reconnaît les erreurs d'incorporation ou d'insertion-délétion de bases qui surviennent lors de la réplication de l'ADN et de la recombinaison (Figure 3c) (Jiricny, 2006; Peña-Diaz and Jiricny, 2012). Ces erreurs surviennent malgré le taux de fidélité élevé des ADN polymérase. Il arrive que ces dernières incorporent sur le brin néo-synthétisé un nucléotide non complémentaire à celui du brin parental ou qu'elles subissent des glissements au niveau de séquences répétées. L'efficacité de ce système réside dans la capacité à reconnaître le brin matrice du brin nouvellement synthétisé, ce qui permet de ne pas modifier la copie originale. Chez *Escherichia coli*, cette distinction est basée sur la présence de méthylations spécifiques sur le brin matrice au cours de la réplication. Chez les eucaryotes, il est envisageable que PCNA (pour *Proliferating Cellular Nuclear Antigen*), qui n'est pas une protéine spécifique du MMR, oriente les protéines du MMR vers la reconnaissance du brin néo-synthétisé contenant le mésappariement. Un autre modèle propose que l'incorporation de ribonucléotides, qui marquent les brins néo-synthétisés au cours de la réplication, oriente les protéines du MMR vers la réparation du brin néosynthétisé (Nick McElhinny et al., 2010; Potenski and Klein, 2014). La détection des mésappariements et des courtes insertions-délétions (<10pb), se fait par les protéines homologues de MutS formant l'hétérodimère MSH2-MSH6. Le dimère MSH2-MSH3, quant à lui, reconnaît les insertions-délétions plus longues (>10pb). Le complexe MLH1-PMS2 (homologues de MutL) est alors recruté pour cliver le brin défectueux grâce à l'activité endonucléase de PMS2 et fournir un point d'entrée aux exonucléases. Enfin, l'ADN polymérase δ synthétise le brin excisé et une ligase suture le brin.

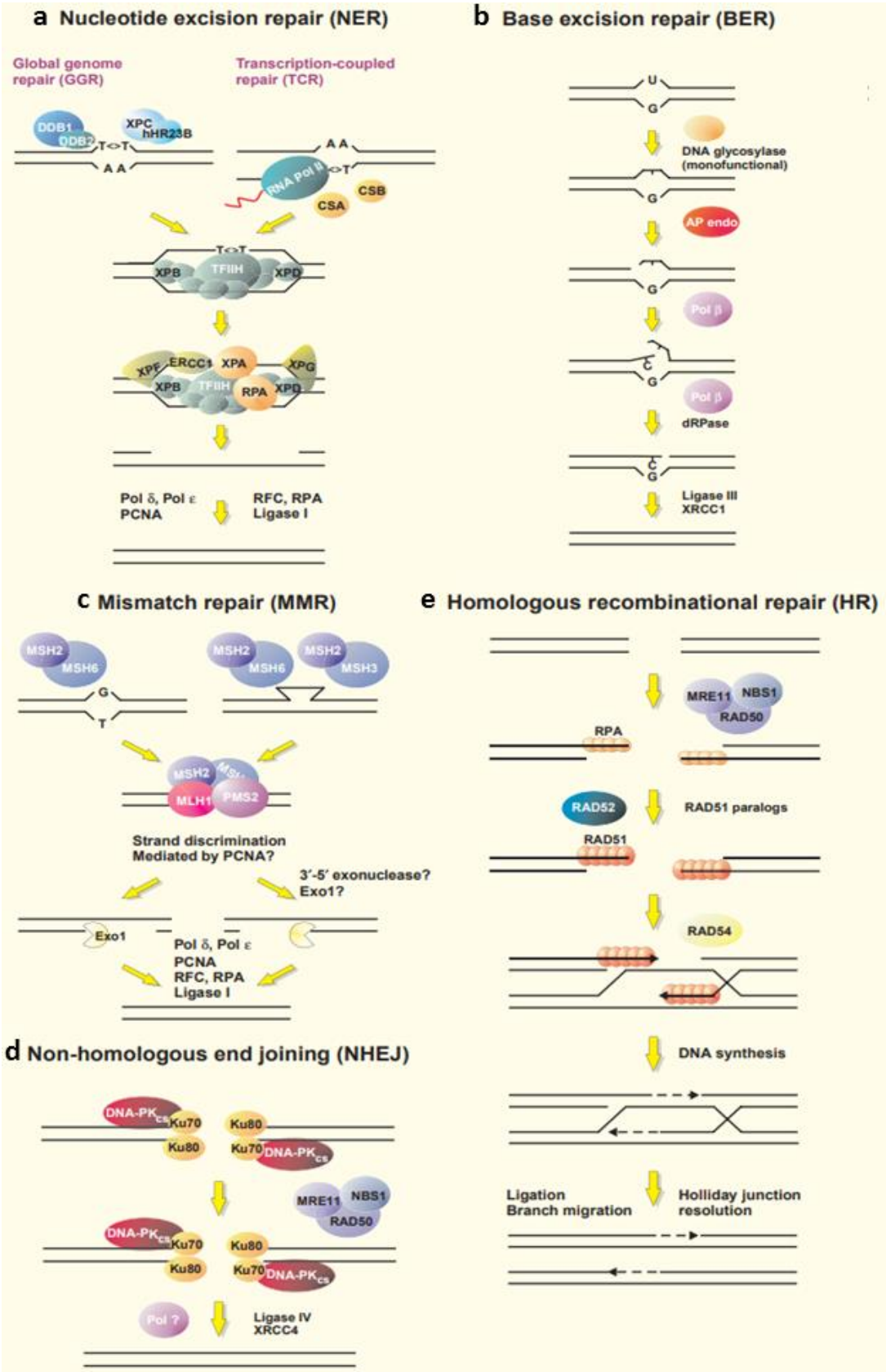


Figure 3 : Mécanismes de réparation de l'ADN. (a) Réparation par Excision de Nucléotide (NER). (b) Réparation par Excision de Bases (BER). (c) Réparation des Mésappariements (MMR). (d) Réparation par jointure d'extrémités non-homologues (NHEJ). (e) Réparation par la Recombinaison homologue. Modifié de Fleck and Nielsen, 2004.

3. Les grands mécanismes de réparation des cassures double-brin de l'ADN

3.1. Nature et conséquences des CDBs

L'occurrence de CDBs peut être très dommageable pour les cellules. Mal réparées, les CDBs peuvent générer des réarrangements chromosomiques ; tandis que non réparées elles sont une source de perte d'hétérozygotie (*via* la perte de fragments de chromosomes) et de létalité pour les cellules haploïdes. Le potentiel mortel des CDBs est d'ailleurs exploité dans de nombreux traitements du cancer (chimiothérapie, radiothérapie). Les CDBs peuvent être induites par des agents génotoxiques (clastogènes) ou être formées lors de la réplication de l'ADN (Figure 4) (Costanzo et al., 2001; Lisby et al., 2001). En effet, la présence de cassures simple-brin (CSBs) entraîne leur conversion, lors du passage de la fourche de réplication, en CDBs avec une seule extrémité. Une étude a montré que dans des cellules humaines 1% des lésions simple-brin sont converties en CDBs, générant ainsi environ 50 CDBs par cellule et par cycle cellulaire (Vilenchik and Knudson, 2003). De manière surprenante, ces estimations sont plus de six fois supérieures au nombre de CDBs estimé par Burkart et al., (8 par jour) et sont du même ordre de grandeur que le nombre de CDBs induites par une dose de 1 Gray (30 à 40 CDBs) (Burkart et al., 1998; Vilenchik and Knudson, 2003; Ward, 1988).

Bien que les CDBs soient des lésions dangereuses pour les cellules, elles peuvent néanmoins être physiologiques et délibérément induites afin d'introduire une variabilité génétique *via* des réarrangements programmés du génome (Figure 4) (Mehta and Haber, 2014). On peut citer les CDBs produites chez les levures lors du changement de type sexuel, les CDBs générées par le complexe RAG afin d'initier la recombinaison V(D)J dans les lymphocytes ou encore celles induites lors de la méiose par l'endonucléase Spo11. Il en résulte un brassage de l'information génétique et une diversité génétique dans la descendance.

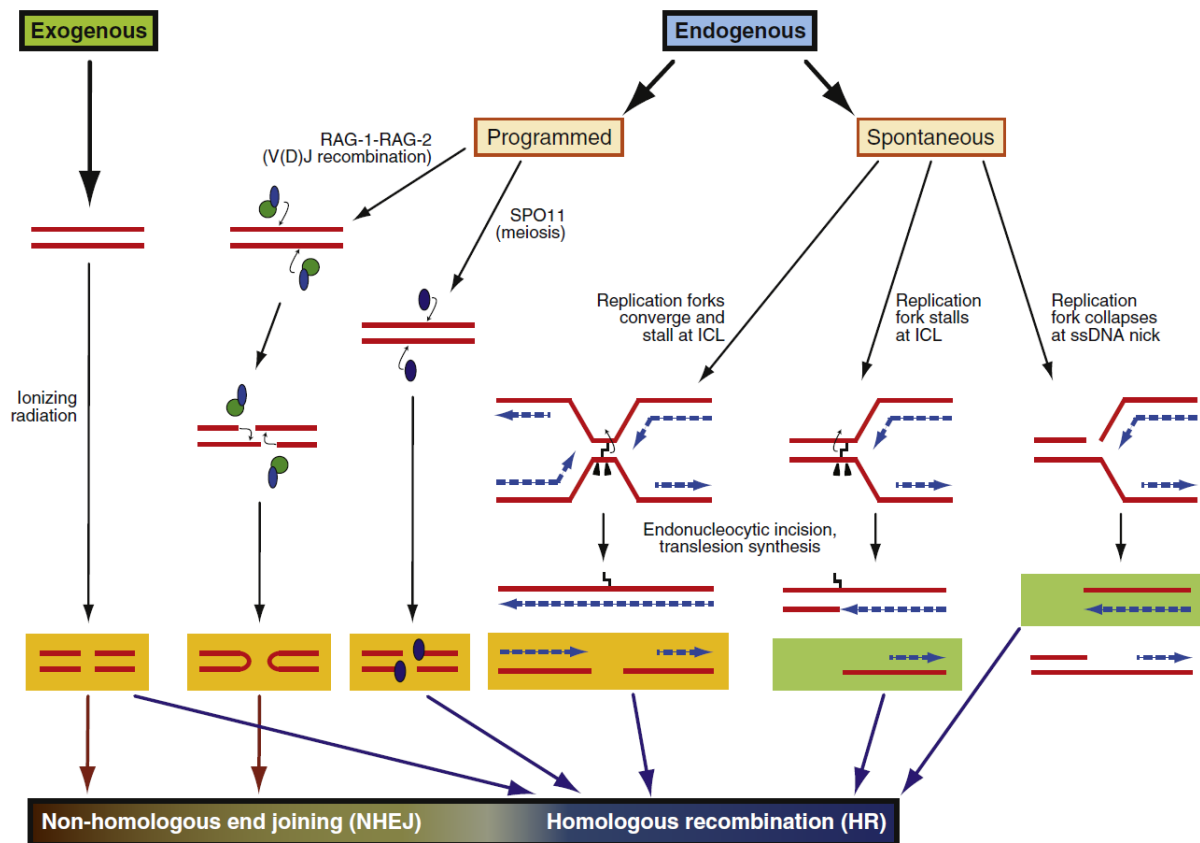


Figure 4 : Mécanismes de formation des différents types de CDBs et leur réparation. D'après Chapman et al., 2012.

La réparation des CDBs a été extensivement étudiée chez la levure *S. cerevisiae*. Ces études sont basées essentiellement sur la capacité des cellules à réparer les CDBs induites par des endonucléases telles que HO (Nickoloff et al., 1986) et I-SceI (Colleaux et al., 1988). Des essais génétiques ont été développés pour étendre l'utilisation de ces endonucléases de *S. cerevisiae* à d'autres espèces : I-SceI et son site de clivage de 18pb dans les cellules de mammifères (Pierce et al., 1999) et HO avec son site de clivage *MATa* (24pb) dans les cellules de *S. pombe* (Prudden et al., 2003). Les cassures générées par ces endonucléases ne sont pas franches (3'-OH sortant) mais sont qualifiées de propres (3'OH et 5'). Ces cassures sont différentes de celles induites par certains agents génotoxiques (radiations ionisantes, bléomycine, camptothécine, ...) ou encore Spo11. Dans ces situations, les extrémités de la CDB comportent des modifications chimiques (modification du nucléotide/adduits à l'ADN) ou des complexes protéiques (tels que Spo11 qui reste fixée de manière covalente au site de cassure). Ces cassures dites « complexes » requièrent un traitement, préalable à leur réparation, par des nucléases ou d'autres enzymes.

3.2. Voies de réparation des CDBs

Deux grands mécanismes sont impliqués dans la réparation des CDBs : la réparation par la jonction d'extrémités non-homologues (NHEJ, pour *Non-Homologous End Joining*) et la recombinaison homologue (RH) (Figure 5). Même s'ils partagent le même substrat initial, leur accès aux CDBs n'est pas forcément régi par un mode de compétition. Ils sont soumis à une régulation fine en fonction de la nature de la CDB et du cycle cellulaire (Figure 6) ; et cela diffère d'un organisme à un autre (Delacôte and Lopez, 2008; Shibata et al., 2011; Takata et al., 1998). Dans certains cas, l'absence de l'un peut être compensée par la fonctionnalité de l'autre. Cependant, certaines situations font que la RH et le NHEJ ne peuvent pas être interchangeables. C'est notamment le cas lorsqu'une seule extrémité double-brin est disponible (par exemple, les CDBs issues de la conversion d'une CSB au cours de la réplication). Dès lors, l'utilisation de la chromatide sœur pour la réparation de la CDB par la RH est nécessaire afin d'éviter des réarrangements chromosomiques (*via* l'utilisation d'une deuxième extrémité éloignée du site initial de la cassure).

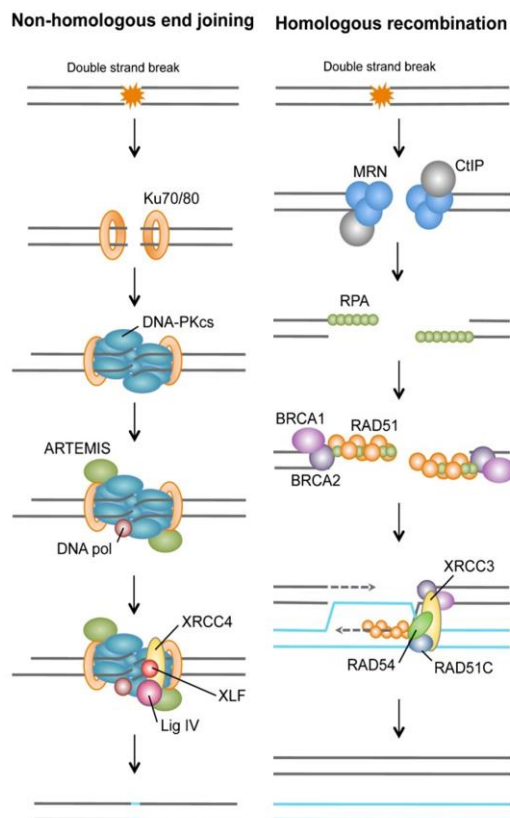


Figure 5: Réparation des CDBs par le NHEJ (Non-homologous end joining) et la recombinaison homologue (HR, Homologous recombination). Modifié de Brochier and Langley, 2013.

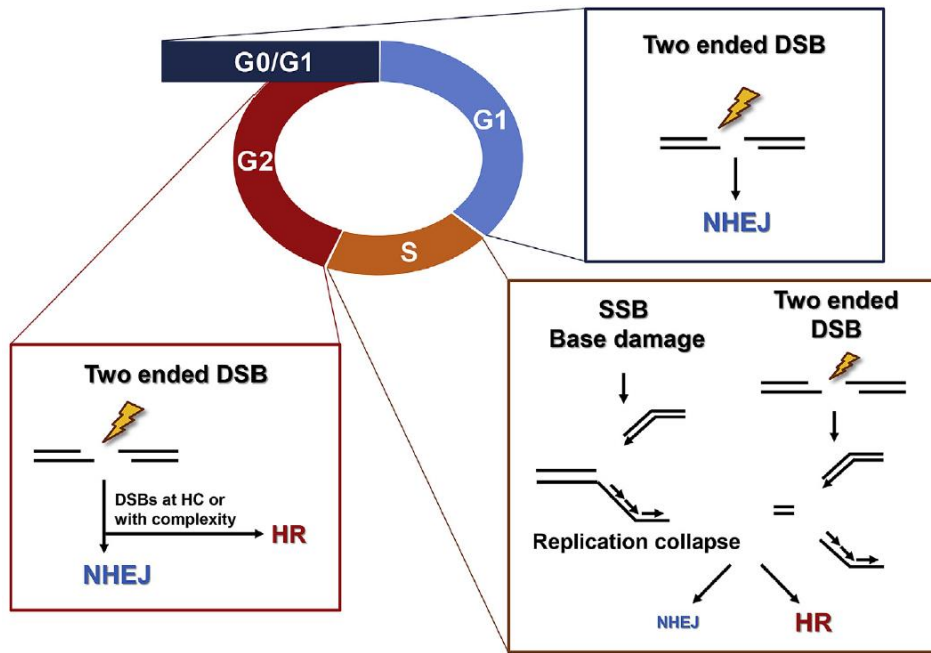


Figure 6 : Choix entre le NHEJ et la recombinaison homologue en fonction du cycle cellulaire. D'après Shibata and Jeggo, 2014.

3.2.1. Le NHEJ

Initialement découvert dans les cellules de mammifères, le NHEJ est un mécanisme répandu chez tous les eucaryotes ainsi que chez certains procaryotes (Lieber, 2010). Souvent qualifié de recombinaison illégitime, le NHEJ requiert peu ou pas d'homologie de séquence pour réparer les CDBs car les deux extrémités de celles-ci sont raboutées directement après leur traitement. Même si conceptuellement le mécanisme de base du NHEJ peut sembler relativement simple, il survient à de faibles fréquences chez les procaryotes et les levures (Goedecke et al., 1994). *A contrario*, il semblerait que le NHEJ soit la voie privilégiée dans la réparation des CDBs chez les mammifères (Guirouilh-Barbat et al., 2004; Mao et al., 2008; Roth and Wilson, 1985). Préférentiellement sollicité en G1, lorsque la chromatide sœur est absente pour servir de matrice, le NHEJ peut être actif durant tout le cycle cellulaire (Mao et al., 2008; Shibata et al., 2011). Longtemps décrit comme un processus de réparation infidèle et mutagène, diverses études ont remis en cause ce concept notamment en montrant l'existence de deux modes de réparation par la jonction des extrémités. Il s'agit du NHEJ

canonique (c-NHEJ) et du NHEJ alternatif (Alt-NHEJ), ce dernier étant conceptuellement mutagène.

3.2.1.1. Le NHEJ canonique

Le c-NHEJ est un mode de réparation de CDB très rapide. Il fait appel à plusieurs protéines, dont les plus emblématiques forment le dimère Ku. Chez les eucaryotes, Ku agit sous forme d'hétérodimère composé de Ku70 et Ku80. L'hétérodimère se fixe à l'ADN indépendamment de sa séquence et avec une grande affinité pour les extrémités double-brin (franches ou avec une courte séquence sortante). Le complexe Ku promeut le recrutement de DNA-PK (chez les vertébrés) et Artemis. Cette dernière traite les extrémités de la cassure afin que celles-ci soient propices à une suture par le complexe Cernunnos-XLF/XRCC4/LigaseIV. Il est à noter que le c-NHEJ fait également appel au complexe MRN. Acteur de la machinerie de résection lors de la RH, MRN joue plutôt un rôle structural dans le c-NHEJ. En effet, MRN a la capacité de maintenir les extrémités d'une CDB physiquement proches, ce qui faciliterait les étapes de jointure. Le rôle de MRN dans le c-NHEJ est retrouvé chez les mammifères (Anyong Xie, Amy Kwok, 2010) et *S. cerevisiae* (Boulton and Jackson, 1998) mais pas chez le Xénope (Di Virgilio and Gautier, 2005) et *S. pombe* (Manolis et al., 2001). Toutefois, une étude récente montre l'implication du complexe dans la résolution de CDBs particulières par le c-NHEJ chez *S. pombe*. En effet, les CDBs dont les extrémités forment une structure en tige-boucle nécessitent l'intervention de MRN pour leur traitement (Li et al., 2017; Runge and Li, 2017). Le rôle de MRN dans le c-NHEJ chez les mammifère et les levures, bien qu'avec une divergence fonctionnelle, ne requiert pas ses activités nucléases (Anyong Xie, Amy Kwok, 2010; Li et al., 2017; Zhang and Paull, 2005).

Le c-NHEJ peut s'accompagner d'une perte limitée de nucléotides en fonction de la nature de la CDB et non à cause du mécanisme de réparation en soi (Goedecke et al., 1994; Moore and Haber, 1996; Nicolás and Young, 1994). Par ailleurs, une étude récente a montré, chez les mammifères, qu'une résection pouvait être engagée en G1 dans le cadre d'une réparation de CDBs par le c-NHEJ. Cette réparation est plus lente et augmente le potentiel mutagène du c-

NHEJ. La résection en G1 implique la même machinerie de résection que la RH (en G2) mais avec un mode d'action différent (Figure 7) (Biehs et al., 2017).

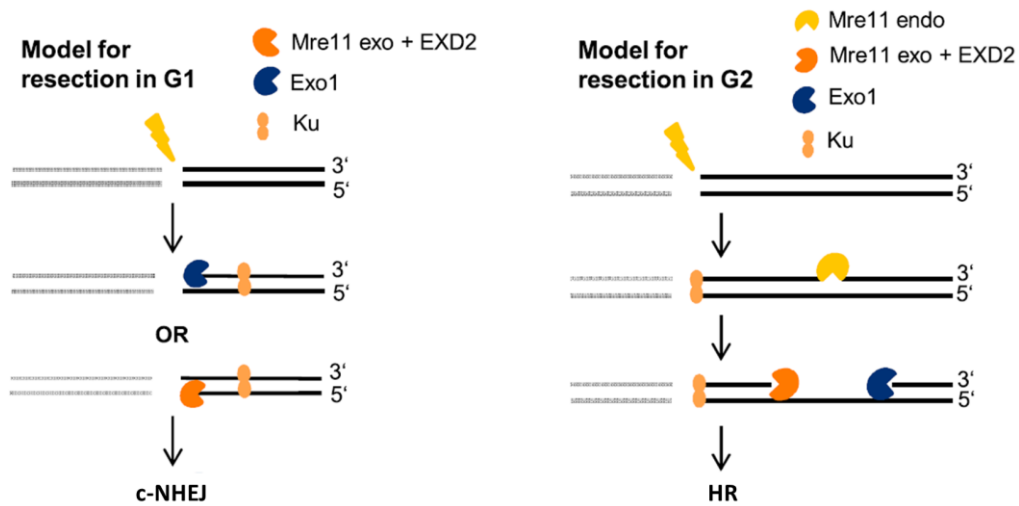


Figure 7 : Différences entre la résection au cours du NHEJ canonique (en G1) et de la recombinaison homologue (en G2). Modifié de (Biehs et al., 2017).

3.2.1.2. Le NHEJ alternatif

L'existence du Alt-NHEJ, appelé aussi B-NHEJ (pour *Backup-NHEJ*) ou MMEJ (pour *Microhomology-Mediated End-Joining*), a pu être mise en évidence dans des contextes génétiques où le c-NHEJ est absent (Boulton and Jackson, 1996; Guirouilh-Barbat et al., 2004). Toutefois, il n'est pas exclu que le Alt-NHEJ puisse coexister avec le c-NHEJ (Corneo et al., 2007; Lee-Theilen et al., 2011; Ma et al., 2003; Seol et al., 2017; Sfeir and Symington, 2015; Truong et al., 2013).

Cette deuxième voie du NHEJ ne requiert pas non plus d'homologie de séquence mais elle se distingue du c-NHEJ génétiquement et en termes de mécanisme (Figure 8). En effet, à l'inverse du c-NHEJ, le Alt-NHEJ est systématiquement initié par une résection modérée des extrémités de la CDB par des nucléases et ne nécessite pas l'intervention de Ku (Rass et al., 2009). Les ADNsb aux extrémités de la cassure s'apparient au niveau de micro-homologies (de 5 à 25pb) plus ou moins distales par rapport au site de cassure, d'où l'appellation MMEJ

(McVey and Lee, 2008). Cette voie de réparation est donc mutagène et constitue également une source majeure de translocations et de réarrangements chromosomiques (Guirouilh-Barbat et al., 2007; Weinstock et al., 2011; Yan et al., 2007). Le choix entre le c-NHEJ et le Alt-NHEJ se fait via l'initiation ou non de la résection de l'ADN par le complexe MRN (activité nucléase de Mre11) et CtIP (Grabarz et al., 2013; Rass et al., 2009; Xie et al., 2009; Zhang and Jasin, 2011; Zhang and Paull, 2005). La taille de l'ADNsb formé, qui dépend de la phase du cycle cellulaire, va quant à elle déterminer le choix entre le Alt-NHEJ et la RH (Rass et al., 2009).

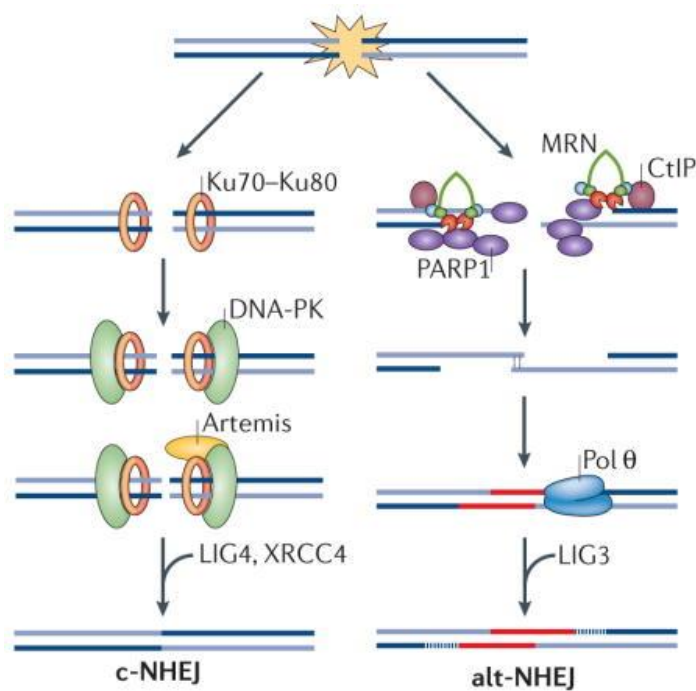


Figure 8 : Mécanismes de réparation des CDBs par jointure des extrémités. NHEJ canonique (à gauche) et NHEJ Alternatif. D'après Lazzarini-Denchi and Sfeir, 2016.

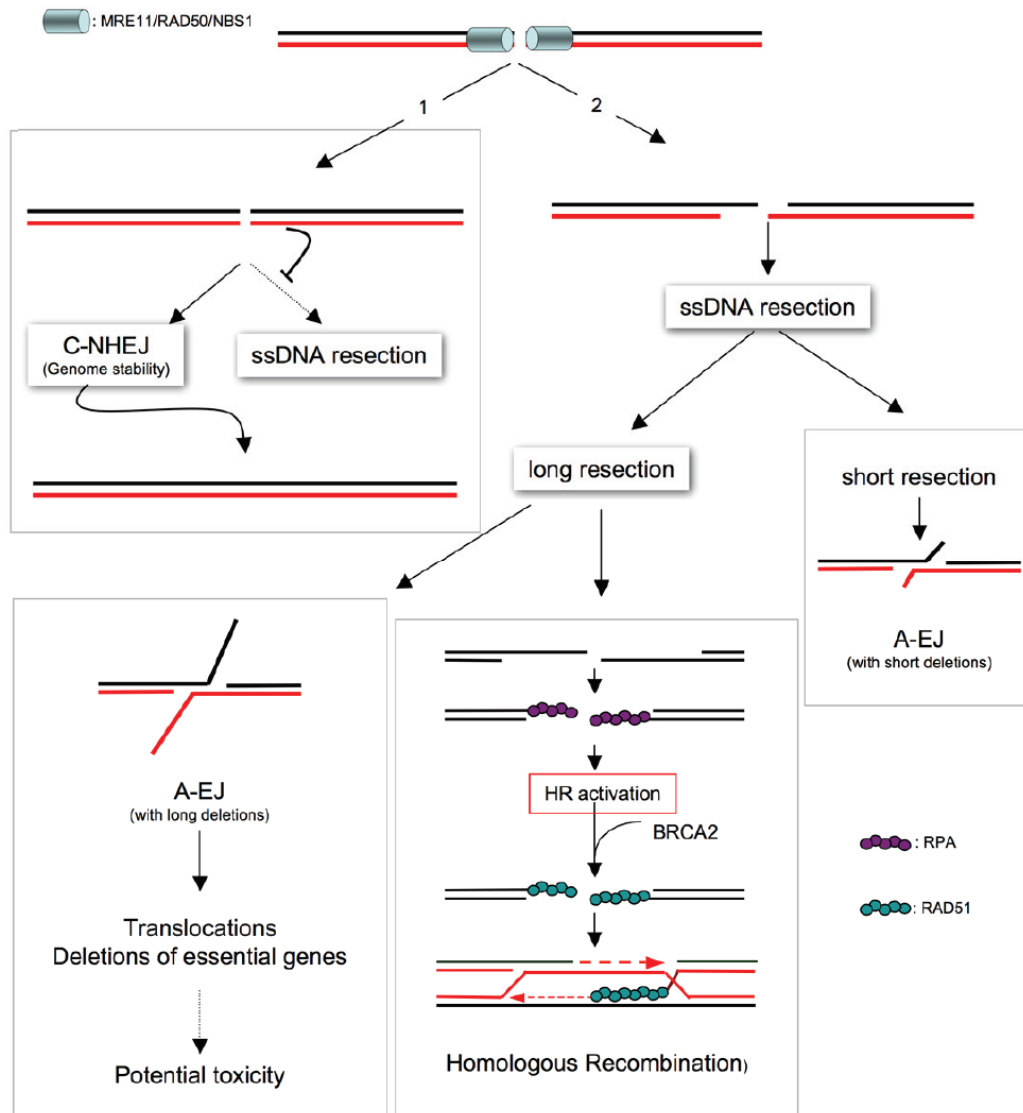


Figure 9 : Mécanismes de réparation des CDBs dépendants et indépendants de la résection. D'après Grabarz et al., 2012.

3.2.2. La recombinaison homologue

La recombinaison homologue est le deuxième grand mécanisme de réparation des CDBs. Les prérequis pour cette voie sont : (i) la présence d'une séquence homologue intacte pour servir de matrice, et (ii) la résection de l'ADN à l'extrémité de la CDB. La RH étant le thème central de cette thèse, elle est développée dans le chapitre suivant.

II. La Recombinaison Homologue

La recombinaison homologue est un mécanisme de recombinaison génétique ubiquitaire très conservé au cours de l'évolution. Elle est la base moléculaire de l'échange génétique entre deux molécules d'ADN homologues. La RH existe chez tous les organismes vivants et survient dans divers processus biologiques.

1. Rôles biologiques de la recombinaison homologue

Principalement connue pour son rôle dans la réparation des CDBs et des brèches d'ADNs, la RH remplit plusieurs fonctions chez les eucaryotes. Elle est notamment impliquée dans le soutien à la réplication, dans le maintien des télomères, la commutation de classe des immunoglobulines, le changement de sexe chez les levures et la ségrégation des chromosomes en méiose (Sung and Klein, 2006). La RH joue un rôle central dans la balance entre la stabilité génétique et la diversité des génomes.

Chez les procaryotes, la RH est essentielle pour la réparation des CDBs et la restauration de la fourche de réplication. Elle est également impliquée dans le phénomène de conjugaison chez les bactéries (acquisition de matériel exogène *via* le transfert horizontal de l'information génétique).

Ce chapitre sera consacré aux mécanismes de réparation des CDBs par la RH. Les fonctions de la RH au cours de la réplication seront, quant à elles, adressées dans le dernier chapitre de l'introduction.

2. Mécanismes moléculaires de la recombinaison homologue

Le mécanisme de la RH peut être découpé en trois grandes étapes : (i) la phase présynaptique durant laquelle la CDB est reconnue, son extrémité 5' dégradée, et où les facteurs de la RH sont assemblés (formation du filament de Rad51), (ii) la phase synaptique

durant laquelle la recherche de la séquence homologue ainsi que l'échange de brin s'opèrent (formation de la D-loop), et (iii) la phase postsynaptique durant laquelle les intermédiaires de recombinaison formés à l'étape précédente sont résolus suite à la synthèse de l'ADN, régénérant ainsi la séquence perdue (Figure 10).

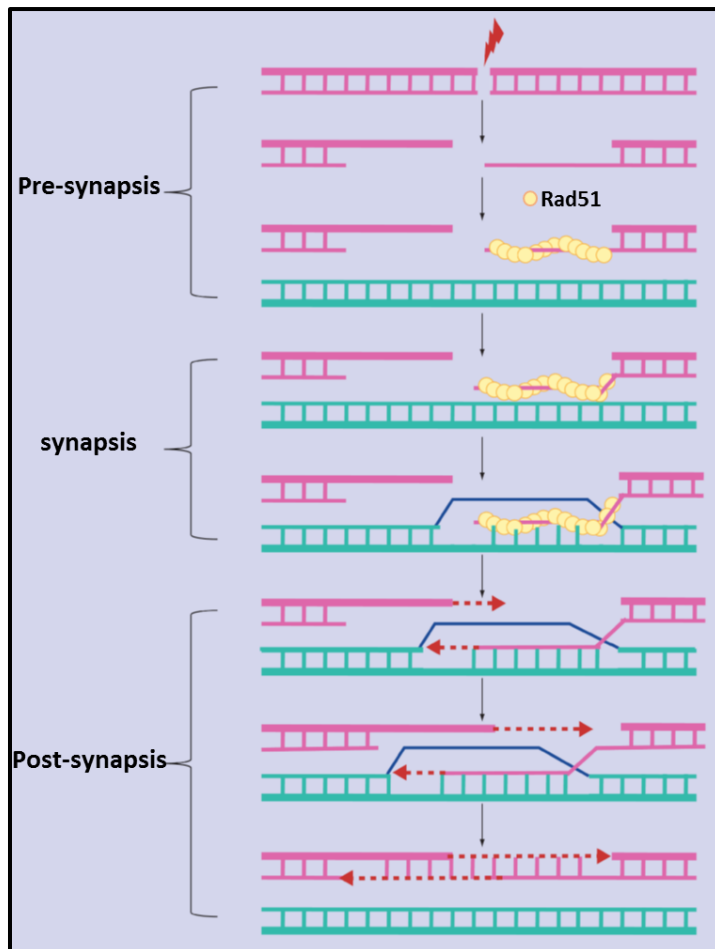


Figure 10 : Les étapes de la recombinaison homologue. Modifié de Sinha and Peterson, 2009.

2.1. Résection des cassures double-brin : la machinerie de résection

La résection des extrémités des cassures, par l'action conjointe de nucléases et d'hélicases, est une étape importante. Elle conditionne notamment le choix de la voie de réparation des CDBs et constitue une étape essentielle pour l'initiation de la RH.

La résection consiste à dégrader les extrémités 5' des CDBs afin de générer un ADNsb 3' sortant. Chez *E. coli*, deux voies sont responsables de la formation de l'ADNsb aux CDBs. La première voie implique l'enzyme RecBCD dotée d'une activité hélicase et nucléase, la seconde fait appel au complexe RecF composé de l'hélicase RecQ et de la nucléase RecJ (Amundsen and Smith, 2003).

Chez les eucaryotes, plusieurs protéines sont impliquées dans la résection des CDBs dont des nucléases, des hélicases et des facteurs de remodelage de la chromatine. Un modèle de résection en deux étapes a été proposé pour la réparation des CDBs par la RH chez *S. cerevisiae* (Figure 11) (Mimitou and Symington, 2008). La première étape correspond à une résection limitée et implique l'action conjointe du complexe MRX (Mre11/Rad50/Xrs2) et de Sae2 (Ctp1 chez *S. pombe* et CtIP chez les mammifères) capables d'amorcer la dégradation de l'extrémité de la CDB sur environ 100 à 300pb, grâce notamment aux activités endonucléases de Mre11 (Garcia et al., 2012). La deuxième étape de la résection, dite extensive, peut être accomplie selon deux voies parallèles : Exo1 d'une part et Sgs1 (BLM chez l'homme et Rqh1 chez *S. pombe*) et Dna2 d'autre part (Gravel et al., 2008; Mimitou and Symington, 2008; Zhu et al., 2008). Cela permet d'exposer jusqu'à plusieurs milliers de bases d'ADNsb (Langerak et al., 2011).

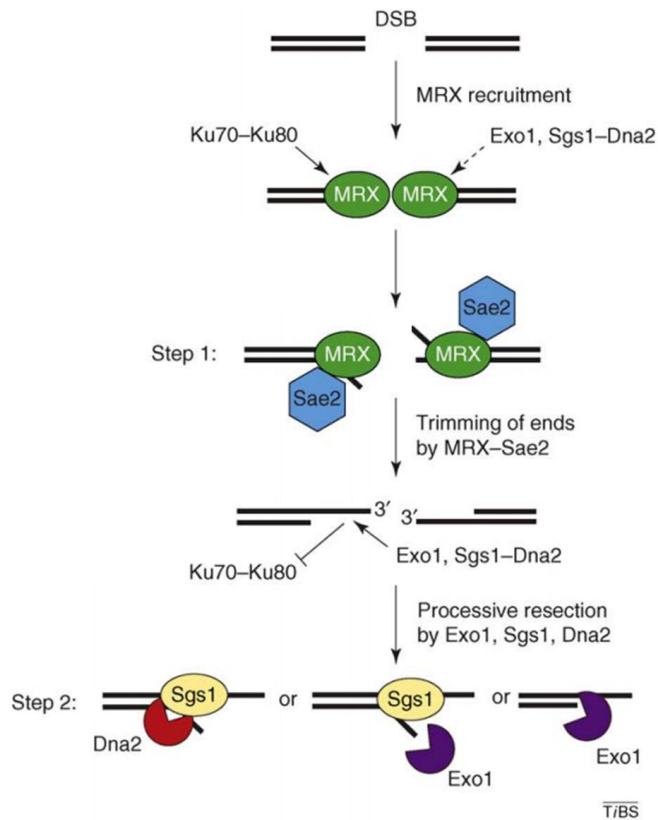


Figure 11 : Modèle de la résection en deux étapes chez *S. cerevisiae*. Modifié de Mimitou and Symington, 2009.

Chez les mammifères et *S. pombe*, le même modèle de résection en deux étapes est proposé (Limbo et al., 2007; Nimonkar et al., 2011; Takeda et al., 2007) avec toutefois des différences dans l'essentialité des fonctions des homologues de MRX et Sae2 qui seront discutées ci-dessous.

Une fois la résection initiée, l'ADNsb généré est recouvert par RPA. D'un côté, cela permet de recruter ATR-ATRIP après l'élimination de MRN/X et ATM/Tel1. De l'autre, la fixation de RPA permet d'inhiber la formation de structures secondaires sur l'ADNsb qui pourraient entraver la fixation de Rad51 (Chen et al., 2013).

2.1.1. La résection initiale

Les acteurs clés dans cette étape sont MRN/X et Sae2/CtIP/Ctp1. Il est intéressant de noter que le premier clivage dans le modèle de la résection en deux étapes remplit au moins deux fonctions : (i) il permet de générer l'ADNsb qui constitue un substrat de choix pour l'exonucléase Exo1 et le complexe Sgs1/Dna2 qui procèdent à la deuxième étape de la résection (Llorente and Symington, 2004), et (ii) il permet d'éliminer Ku, dont la fixation inhibe l'accès direct de Exo1, de l'extrémité de la CDB (Mimitou and Symington, 2010) (Figure 12). Cette fonction semble être plus importante car, en absence de Ku, MRN/X et Ctp1/Sae2 deviennent facultatifs pour l'initiation de la résection (Langerak et al., 2011; Mimitou and Symington, 2010). Ku serait donc le facteur limitant pour la résection directe des CDBs par Exo1.

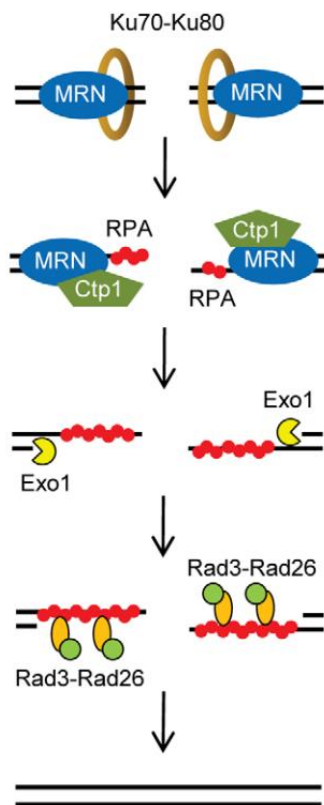


Figure 12 : Modèle de la résection des CDBs chez *S. pombe*. D'après Langerak et al., 2011.

2.1.1.1. Ku, un facteur anti-résection ?

Ku joue un rôle central dans le NHEJ mais est aussi impliqué dans la RH. Le complexe est présent sur les CDBs de façon très précoce. Ku restreint ainsi l'accès des nucléases en interagissant avec chacune des extrémités de la CDB (Figure 12) (Mimitou and Symington, 2010). La résection effective des CDBs étant obligatoire pour la réparation par la RH, l'éviction de Ku est primordiale.

MRN/X est recruté quasi simultanément avec Ku (Wu et al., 2008a). Plusieurs études montrent que la résection par MRN/X et Ctp1/CtIP/Sae2 entraîne *de facto* l'éjection de Ku de la CDB (Chanut et al., 2016; Langerak et al., 2011; Mimitou and Symington, 2010). Il s'avère qu'un autre moyen d'éjecter Ku de la CDB s'opère *via* son ubiquitination par RNF138, une E3 ubiquitine ligase. Dans ce modèle, MRN génère un ADNs sur lequel RNF138 est recrutée afin d'ubiquitiner Ku. Cela favoriserait sa dissociation de l'ADN et le recrutement de nucléases (Ismail et al., 2015).

Il a été montré *in vitro* que la présence de Ku favorise l'activité endonucléase de MRX-Sae2 tout en limitant ses activités exonucléases (Reginato et al., 2018). En constituant une barrière à la résection extensive des CDBs, Ku assure donc un mode de résection en deux étapes. La signification biologique d'une résection séquentielle n'étant pas établie, Ku est perçu comme un facteur anti-résection.

2.1.1.2. Le complexe MRN/X

Le complexe MRN (MRX chez *S. cerevisiae*) est composé de deux sous-unités de Mre11 et Rad50 et une sous-unité de Nbs1 (Xrs2 chez *S. cerevisiae*) (Figure 13). Contrairement à Nbs1/Xrs2, Mre11 et Rad50 sont très conservées entre les levures et les mammifères et sont capables de former un sous-complexe (Mre11-Rad50) (De Jager et al., 2001).

Plusieurs pathologies sont associées à des mutations dans ce complexe. Des mutations touchant les gènes *MRE11* ou *RAD50* sont à l'origine d'un syndrome similaire à l'ataxie télangiectasie appelé ATLD (pour Ataxia Télangiectasia Like Disorder). Les mutations affectant le gène *NBS1* sont quant à elles responsables du syndrome Nijmegen (ou syndrome de cassures de Nijmegen), d'où l'appellation NBS (pour *Nijmegen Breakage Syndrom*). Le phénotype engendré par ces mutations rappelle fortement celui qui est associé à des mutations dans *ATM*, à l'origine de l'ataxie télangiectasie (AT)(D'Amours and Jackson, 2002). NBS est d'ailleurs parfois appelé AT-variant 1. Ceci souligne le lien étroit entre les voies de signalisation et de réparation des dommages de l'ADN.

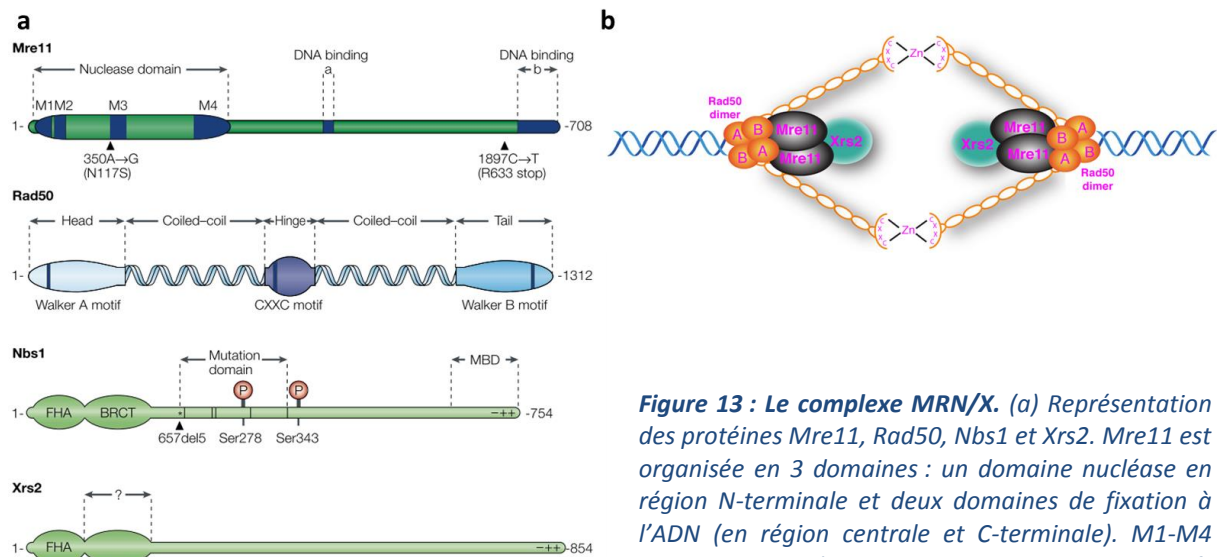


Figure 13 : Le complexe MRN/X. (a) Représentation des protéines Mre11, Rad50, Nbs1 et Xrs2. Mre11 est organisée en 3 domaines : un domaine nucléase en région N-terminale et deux domaines de fixation à l'ADN (en région centrale et C-terminale). M1-M4 correspondent à la position de quatre motifs phospho-estérases. Rad50 possède une structure en superhélice avec un motif ATPase à chaque extrémité (Walker A et B) qui s'assemblent pour former le domaine ATPase. Le centre de la protéine est composé de deux domaines « Coiled-coil » reliés par un motif d'homodimérisation, motif CysXXCys (CXXC). Rad50 appartient à la famille des SMCs (Structural Maintenance of Chromosomes), impliquées dans le maintien de la structure des chromosomes. Nbs1 possède à son extrémité N-terminale des domaines FHA et BRCT qui modulent les interactions protéine-protéine phospho-dépendantes. Son extrémité C-terminale possède un domaine ATM kinase ainsi qu'un domaine d'interaction avec Mre11 (MBD, mre11 Binding Domain). Nbs1 joue notamment un rôle essentiel dans la phosphorylation de Mre11 (Don et al, 1999 J Biol Chem). (b) Représentation du complexe MRN/X sur une CDB. MRN/X a la capacité de se fixer aux extrémités de l'ADN et de les maintenir physiquement proches. Chaque extrémité est fixée par un pentamère composé d'un dimer Rad50 (A et B représentent les motifs Walker A et B), un dimère Mre11 et un monomère Xrs2. Les deux dimères Rad50 se relient via le motif CXXC en présence d'un atome de zinc. D'après D'Amours and Jackson, 2002 (a) et Mimitou and Symington, 2009 (b).

Le complexe MRN possède une pléthore de fonctions, toutes essentielles au maintien de la stabilité du génome. Il est impliqué dans divers processus physiologiques tels que la réplication de l'ADN, le maintien des télomères et la formation de CDBs méiotiques. En

condition de stress, il remplit diverses fonctions dans la réponse aux dommages de l'ADN et leur réparation, que ce soit par la RH ou par le NHEJ (Costanzo et al., 2001; Ma et al., 2003; Nugent et al., 1998; Zhu et al., 2000). Etant difficile de relater toutes les activités de MRN, un focus sera fait sur son rôle dans la réparation des CDBs, et plus particulièrement sur son rôle dans la résection de celles-ci.

Les gènes *RAD50* et *XRS2* ont été initialement identifiés dans un crible de mutants sensibles aux radiations ionisantes (Game and Mortimer, 1974). De ce fait, les mutants de ce complexe, que ce soit chez les levures ou chez les organismes pluricellulaires, sont caractérisés par une incidence élevée de réarrangements chromosomiques spontanés pouvant s'expliquer par des défauts dans les voies de réparation des CDBs (Chen and Kolodner, 1999; Puizina, 2004). En effet, MRN/X intervient dans la réparation des CDBs à différents niveaux. Il joue un rôle dans (i) la détection des dommages, (ii) leur signalisation et l'activation du checkpoint, (iii) le maintien de la proximité entre les deux extrémités de la CDB et le recrutement de cohésines (Hartsuiker et al., 2001; De Jager et al., 2001; Kim et al., 2002; Ünal et al., 2004; Yazdi et al., 2002), (iv) le remodelage de la chromatine et (v) la stimulation de la réparation par la RH ou le NHEJ.

Ces fonctions peuvent expliquer les difficultés des mutants MRN/X à réparer les CDBs. Cependant, la fonction que recèle ce complexe et qui justifie son rôle essentiel dans la réparation des CDBs est sa capacité à initier la résection des CDBs (Buis et al., 2008; Williams et al., 2008).

Le complexe MRN est impliqué dans la résection des CDBs, que celles-ci soient mitotiques ou méiotiques, et ce chez tous les eucaryotes. Il a été montré *in vitro* que Mre11 possède, en plus de son activité endonucléase une activité exonucléase 3'-5' (Paull and Gellert, 1998). Paradoxalement, MRN/X est impliqué dans la résection 5'-3' des CDBs *in vivo*. Dépourvues d'activités nucléases, Rad50 et Nbs1/Xrs2 stimulent celles de Mre11 et n'expliquent pas la polarité de la résection *in vivo*. Deux explications, non exclusives et impliquant l'activité endonucléase de Mre11, ont été établies : (i) la résection se fait de manière bidirectionnelle et avec l'implication d'autres nucléases, et (ii) MRN/X participe au recrutement d'autres

nucléases indépendamment de sa propre activité exonucléase (Figure 14) (Cannavo and Cejka, 2014; Garcia et al., 2012; Reginato et al., 2018). Il est à noter que le mécanisme par lequel MRN/X reconnaît le brin 5' pour l'inciser reste à définir.

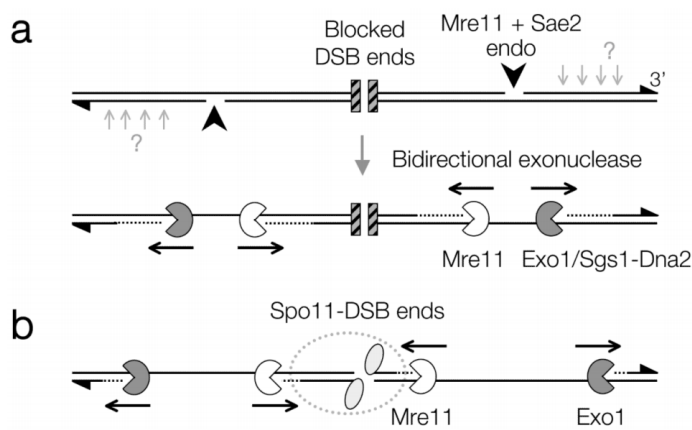


Figure 14: Modèle de la résection bidirectionnelle des CDBs. (a) Résection d'extrémités bloquées. La résection est initiée par une incision du brin 5' par MRN/X et Sae2. La résection se poursuit à partir de l'incision dans les deux directions : 3'>5' par Mre11 et 5'>3' par Exo1 ou Dna2. (b) Résection d'extrémités bloquées par Spo11 (CDB méiotique). D'après Garcia et al., 2012.

Il a été montré chez *S. cerevisiae* que la délétion d'un des composants du complexe MRX compromet la résection des CDBs, tandis que certains mutants *mre11* déficients pour les activités endo- et exo-nucléases (*mre11-H56D* et *mre11-H125N*) ne présentent pas de défauts de résection dans les cellules végétatives du moment que leur interaction avec Rad50 et Xrs2 n'est pas altérée (Krogh et al., 2005; Lorente and Symington, 2004; Moreau et al., 1999). Il semble donc que ce soit l'intégrité du complexe MRX qui est primordiale pour assurer l'initiation de la résection plutôt que l'activité nucléase de Mre11. Cependant, cela n'est vrai que pour certaines CDBs, telles que celles induites par l'endonucléase HO. En effet, les mutants *mre11-H56D* et *mre11-H125N* sont incapables d'amorcer la résection des CDBs méiotiques (générées par Spo11) et des CDBs sur lesquelles des adduits sont présents (par exemple celles générées par les inhibiteurs de topoisomérases). Dans ces situations, un clivage endo-nucléique par Mre11 devient indispensable pour l'initiation de la résection. Il semble donc que, chez *S. cerevisiae*, la fonction première de Mre11 soit le retrait des complexes ADN-protéines dont Spo11 qui reste ancrée sur l'extrémité 5' de la CDB qu'elle a générée (Moreau et al., 1999).

Curieusement, même si Mre11 est très conservée d'un point de vue évolutif, l'activité nucléase de celle-ci n'a pas la même importance en fonction des espèces. Dispensable pour la

réparation des CDBs mitotiques chez *S. cerevisiae*, l'activité nucléase de Mre11 est essentielle pour la réparation des CDBs chez les mammifères et *S. pombe* quel que soit le type de CDBs (Buis et al., 2008; Hartsuiker et al., 2009; Williams et al., 2008). En effet, les phénotypes associés aux mutations *mre11-H129N* chez les mammifères et *mre11-H134S* chez *S. pombe* sont plus sévères que ceux induits par la même mutation chez *S. cerevisiae* (*mre11-H125N*).

Il s'avère que d'autres facteurs sont impliqués, avec MRN/X, dans la première étape de la résection (probablement capables de compenser la perte de l'activité nucléase de Mre11 chez *S. cerevisiae*). Etant donnée la diversité fonctionnelle du complexe MRN, il est tout à fait envisageable que des protéines orientent MRN vers ses fonctions de résection.

2.1.1.3. Ctp1/CtIP/Sae2

Les activités de MRN au niveau des CDBs sont régulées par une protéine connue sous le nom de Ctp1 chez *S. pombe*, CtIP chez les mammifères et Sae2 chez *S. cerevisiae* (Cannavo and Cejka, 2014; Clerici et al., 2005; Limbo et al., 2007; Rattray et al., 2001; Sartori et al., 2007). Tandis que leurs fonctions aux CDBs sont assez conservées, la séquence et la taille de ces protéines sont très différentes. Les résidus vraisemblablement conservés sont tous confinés dans la région carboxy-terminale de Sae2/Ctp1/CtIP. Considérées comme des homologues fonctionnels, la question de savoir si ces trois protéines partagent le même ancêtre reste posée.

Ctp1, CtIP et Sae2 sont indispensables pour la résection initiale des CDBs notamment lorsque des adduits ou des structures en tige-boucle sont présents aux extrémités. Ces protéines interagissent avec MRN et stimulent l'activité nucléase du complexe (Anand et al., 2016; Cannavo and Cejka, 2014; Hartsuiker et al., 2009; Limbo et al., 2007; Sartori et al., 2007).

Chez *S. cerevisiae*, Sae2 est exprimée indépendamment de la phase du cycle cellulaire. Sa régulation se fait de manière post-traductionnelle. Sa phosphorylation par Cdc28 (Cdk1) est requise pour restreindre ses activités dans la résection des CDBs aux phases S et G2 (Huertas

et al., 2008). Sae2 joue un rôle dans la résection des CDBs en tant que régulateur de l'activité endonucléase de MRX et coopère avec ce dernier dans le traitement des structures en tige-boucle et l'élimination de Spo11 (Lengsfeld et al., 2007; Prinz et al., 1997). Sae2 agit en stimulant l'activité endonucléase de Mre11 (Cannavo and Cejka, 2014) indépendamment de sa propre activité endonucléase (Arora et al., 2017). Il est à noter que l'activité nucléase de Sae2 est assez controversée. Deux études, utilisant des systèmes de purification de Sae2 différents, ont permis d'imputer une activité endonucléase à Sae2 (Arora et al., 2017; Lengsfeld et al., 2007). Cependant, une autre purification de Sae2 a montré que cette dernière était dépourvue de toute activité nucléase (Cannavo and Cejka, 2014).

Chez les mammifères, le recrutement de CtIP à la cassure est favorisé par son interaction avec BRCA1 et est soumis au contrôle du cycle cellulaire. CtIP est sujet à une régulation post-transcriptionnelle et post-traductionnelle (phosphorylation par CDK2 et ATM et ubiquitination par BRCA1) (Huertas and Jackson, 2009; Shibata et al., 2011; Yu and Baer, 2000). Au niveau des CDBs, CtIP possède une fonction mécanique et catalytique. D'une part, il agit sous forme de tétramère (« dimère de dimère ») et participe au maintien de la proximité des extrémités de la CDB (Davies et al., 2015) (Figure 15). D'autre part, CtIP interagit physiquement avec MRN et stimule son activité endonucléase (Anand et al., 2016; Sartori et al., 2007). Il s'avère également que CtIP possède une activité endonucléase spécifiquement requise pour l'élimination des adduits et des structures secondaires (tige-boucle) générés sur les CDBs (Makharashvili et al., 2014; Wang et al., 2014). Cette fonction est indépendante de celle qui est impliquée dans la résection initiale des CDBs.

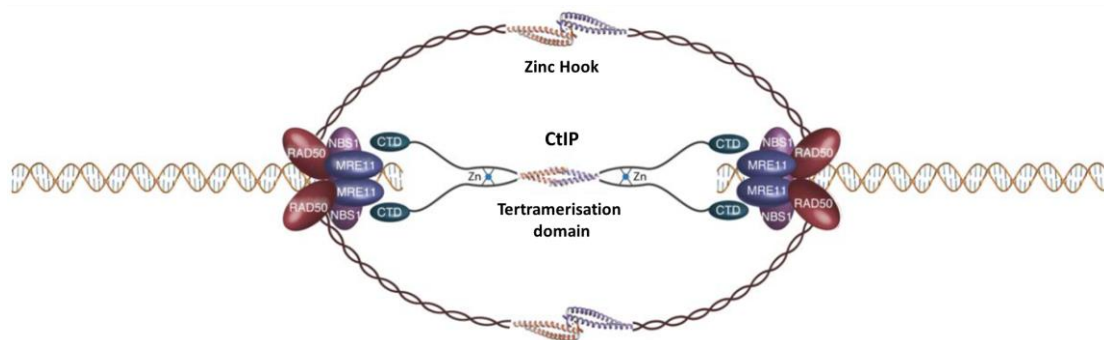


Figure 15 : Modèle du maintien des extrémités des CDBs par MRN et CtIP. La formation du tétramère CtIP permet de maintenir les extrémités de la cassure proches tandis que les domaines de fixation à l'ADN (CTD, C-Terminal Domain) stimulent la résection. D'après Forment et al., 2015.

Chez *S. pombe*, Ctp1 a été identifiée par (Limbo et al., 2007) comme étant l'orthologue de Sae2 et CtIP. Son expression est régulée au niveau transcriptionnel par le facteur de transcription MBF qui contrôle l'expression des gènes de la phase S (Limbo et al., 2007). Ctp1 n'est pas une nucléase, mais comme CtIP, elle agit sous forme de tétramère et a la capacité de maintenir les extrémités des CDBs physiquement proche (Andres et al., 2015). Au niveau de sa séquence, Ctp1 est dépourvue de sites consensus pour une phosphorylation par Cdk2 (Limbo et al., 2007). Ctp1 est cependant phosphorylée au niveau des répétitions SXT/SDT par CK2 (*Casein kinase II*), ce qui lui permet d'interagir avec le domaine FHA de Nbs1 et d'être recrutée sur les CDBs (Lloyd et al., 2009; Williams et al., 2009). Ctp1 est impliquée, avec l'activité nucléase de Mre11, dans l'élimination de Spo11 (Hartsuiker et al., 2009). Il a été montré que les fonctions de Ctp1 pouvaient être génétiquement découplées: La partie N-terminale assure la stimulation de la résection par MRN tandis que la région C-terminale assure l'incision initiale par MRN afin d'éliminer les adduits protéiques, dont Spo11, de la CDB (Ma et al., 2015). Une étude plus récente a cependant montré que, la région C-terminale de Ctp1 est certes nécessaire à l'élimination de Ku mais une fois éliminée, ce n'est pas la région N-terminale qui est responsable de la résection des CDBs. Celle-ci est exclusivement due à Exo1, remettant ainsi en cause une possible séparation de fonction de Ctp1 (Jensen and Russell, 2016). Il est à noter que les observations rapportées dans (Ma et al., 2015) sont basées sur l'étude de cassures induites en méiose (par I-SceI ou Spo11) tandis que Jensen et Russell ont étudié le rôle de la région C-terminale en présence de clastogènes (CDBs

mitotiques). Il n'est donc pas exclu que la dualité des activités d'incision et de résection par MRN-Ctp1 diffère en fonction de la nature des CDBs.

Malgré une différence de séquences importante, Ctp1/Sae2/CtIP ont donc gardé ou convergé vers des fonctions similaires : Stimulation de la résection par MRN et maintien de la proximité des extrémités des CDBs (Andres et al., 2015; Clerici et al., 2005; Davies et al., 2015; Forment et al., 2015). Cette dernière fonction rappelle curieusement celle du sous-complexe Mre11-Rad50 (De Jager et al., 2001). Il reste à définir si cela dénote juste une redondance fonctionnelle entre MRN/X et Ctp1/Sae2/CtIP ; ou si MRN/X recrute Ctp1/Sae2/CtIP pour le suppléer dans son rôle de rapprochement des extrémités et lui permettre de s'adonner à ses activités nucléases.

2.1.2. La résection extensive

Une fois la résection initiale accomplie par MRN/X et Ctp1/CtIP/Sae2, les CDBs deviennent accessibles à d'autres nucléases et hélicases (Langerak et al., 2011; Shim et al., 2010; Zhu et al., 2008). Il en résulte une résection extensive des CDBs favorisant les étapes ultérieures de la RH.

Deux voies sont impliquées dans la résection extensive, avec une polarité 5'>3'. La première implique l'exonucléase Exo1, et la seconde fait intervenir l'hélicase Sgs1 (BLM chez l'homme et Rqh1 chez *S. pombe*) et la nucléase Dna2. Plus processifs, Exo1 et le complexe Rqh1/Sgs1/BLM-Dna2 sont responsables de la résection extensive de la CDB afin d'exposer de plus longs segments d'ADNs (de plusieurs kilobases) (Gravel et al., 2008; Langerak et al., 2011; Mimitou and Symington, 2008; Zhu et al., 2008).

Il est à noter que sans l'intervention de MRN et Ctp1/CtIP, la présence de Ku sur les extrémités empêche une résection directe des CDBs par Exo1. Au-delà de l'incapacité à initier la résection, les défauts de réparations des CDBs dans les mutants MRN peuvent donc

s'expliquer par un défaut de recrutement de Exo1 (Langerak et al., 2011; Mimitou and Symington, 2010).

2.1.2.1. La voie Exo1

Exo1 est une exonucléase avec une polarité 5'>3' appartenant à la famille des nucléases Rad2/XPG. Exo1 est impliquée dans divers processus incluant la prise en charge des fragments d'Okazaki durant la réplication, le maintien des télomères ainsi que dans la réparation de l'ADN par le MMR et des CDBs par la RH (Tran et al., 2004).

L'absence de Exo1 ne confère qu'une légère sensibilité aux agents génotoxiques. Le mutant nul *exo1* ne montre pas de défauts dans l'initiation de la résection mais plutôt un défaut partiel dans la résection extensive (Llorente and Symington, 2004; Mimitou and Symington, 2008). Toutefois, la résection extensive par Exo1 représente la voie majoritaire chez *S. pombe* (Langerak et al., 2011).

Les brèches simple-brin, internes ou à l'extrémité des CDBs, sont un des substrats de Exo1, ce qui explique sa capacité à intervenir dans le MMR en aval de la résection initiale. *In vitro*, Exo1 dégrade préférentiellement le brin 5' d'un ADNdb avec une extrémité 3' protubérante (Cannavo et al., 2013). L'activité de Exo1 serait donc optimisée par MRN/X en accomplissant la résection initiale. En effet, MRN/X stimule le recrutement de Exo1 *in vivo et in vitro* (Eid et al., 2010; Nicolette et al., 2010; Shim et al., 2010) et augmente sa processivité *in vitro* (Nimonkar et al., 2011). Cependant, le complexe MRN/X devient dispensable à l'activité de Exo1 en absence de Ku (Langerak et al., 2011; Mimitou and Symington, 2010; Shim et al., 2010). Des études *in vitro* ont montré que Sae2 stimule la résection par Exo1 tandis que CtIP interagit avec Exo1 mais limite ses activités de résection (Eid et al., 2010; Nicolette et al., 2010). La résection par Exo1 est régulée à la fois positivement et négativement par RPA (Cannavo et al., 2013; Nicolette et al., 2010). Au contraire de Sgs1, BLM, indépendamment de son activité hélicase, stimule la résection par Exo1 (Cannavo et al., 2013; Nimonkar et al., 2008).

2.1.2.2. La voie Rqh1/Sgs1/BLM-Dna2

Dna2 possède des activités hélicase et endonucléase mais seule son activité nucléase est requise pour la résection (Bae et al., 1998; Niu et al., 2011). Dna2 joue un rôle essentiel dans la maturation des fragments d'Okazaki (Bae et al., 2001).

La résection des CDBs par Dna2 requiert une ouverture préalable de l'ADN par des ReqQ hélicases : Rqh1 chez *S. pombe*, Sgs1 chez *S. cerevisiae* et BLM et WRN chez les mammifères (Cejka et al., 2010; Gravel et al., 2008; Nimonkar et al., 2011; Niu et al., 2011; Sturzenegger et al., 2014). Chez *S. pombe*, la voie Rqh1-Dna2 joue un rôle mineur dans la résection extensive des CDBs (Langerak et al., 2011).

Sgs1 forme avec Top3 et Rmi1 le complexe STR (Sgs1-Top3-Rmi1). Les 3 membres du complexe sont importants pour la résection extensive par la voie Sgs1-Dna2 (Niu et al., 2011; Zhu et al., 2008). Sgs1 est recrutée aux CDBs *via* son interaction avec Mre11, indépendamment de l'activité nucléase de cette dernière (Cejka et al., 2010; Shim et al., 2010). Bien que dotée d'une activité nucléase bipolaire, Dna2 n'opère que sur le brin 5'. En effet, la résection par Sgs1-Dna2 nécessite la présence de RPA qui oriente Dna2 vers la dégradation du brin 5' tout en protégeant le brin 3' (Cejka et al., 2010; Niu et al., 2011).

Le complexe STR est l'équivalent du complexe BTB chez les mammifères, formé par BLM, TopoIII α et BALP75. MRN participe au recrutement de BLM et stimule la résection par BLM-DNA2-RPA (Nimonkar et al., 2011). Il est à noter que les fonctions pro-résections de BLM sont spécifiques à la phase S du cycle cellulaire. En phase G1, BLM limite la résection par MRN/CtIP afin de limiter la réparation par le Alt-NHEJ (Grabarz et al., 2013).

2.1.3. Régulation de la résection par RPA

RPA intervient une fois la résection initiale accomplie. RPA se fixe sur l'ADNsb, le stabilise (en prévenant la formation de structures secondaires) et stimule la résection extensive du brin

5' (Figure 16) (Chen et al., 2013; Deng et al., 2014). Ainsi, les deux voies de la résection extensive sont impactées en l'absence de RPA (Chen et al., 2013).

RPA stimule l'activité de Sgs1 (Cejka et al., 2010; Niu et al., 2011). De plus, RPA est requise pour la localisation de Dna2 sur la CDB (Chen et al., 2013) et l'orientation de son activité nucléase vers le brin 5' (Cejka et al., 2010; Niu et al., 2011).

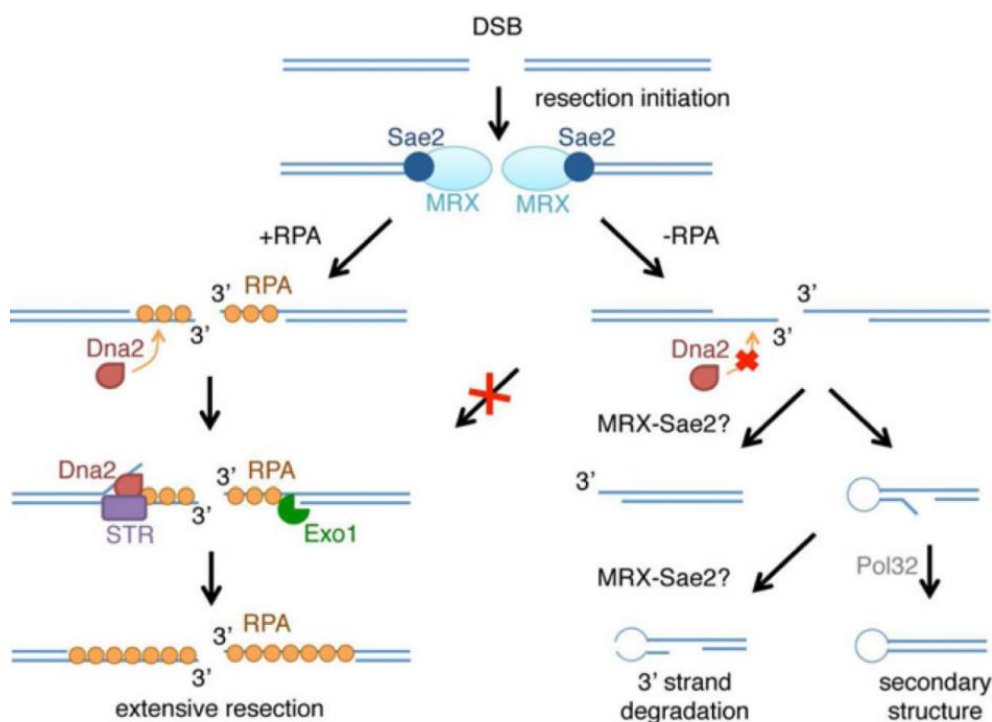


Figure 16 : Rôle de RPA dans coordination de la résection des CDBs chez *S. cerevisiae*. MRX et Sae2 génèrent un ADNsb sur lequel RPA se fixe et stimule la résection extensive par Dna2 et Exo1. En absence de RPA, Dna2 n'est pas recrutée et l'ADNsb généré par MRX/Sae2 forme des structures secondaires. D'après Chen et al., 2013.

La relation entre RPA et Exo1 est plus complexe. Des rôles stimulant et inhibant la résection par RPA ont été décrits chez l'homme et *S. cerevisiae in vitro* (Cannavo et al., 2013; Myler et al., 2016; Nicolette et al., 2010; Nimonkar et al., 2011; Yang et al., 2013). Il a été montré, *in vivo*, que RPA est nécessaire pour la stimulation de la résection extensive par la voie Exo1 mais n'est pas requise pour la localisation de Exo1 aux CDBs chez les deux organismes (Chen et al., 2013; Myler et al., 2016). Des études sur molécules-uniques montrent que l'effet inhibiteur de RPA s'explique par une délocalisation rapide de Exo1 de l'ADNsb

(Myler et al., 2016). En délocalisant Exo1, RPA prévient les interactions non-spécifiques entre Exo1 et l'ADNsb, ce qui stimulerait la résection (Cannavo et al., 2013).

Deux niveaux de régulation de la résection sont donc assurés par RPA : (i) en orientant la polarité de la résection, et (ii) en inhibant la dégradation du brin 3' et la formation de structures secondaires afin d'assurer le recrutement de la recombinaise Rad51 et la réparation par la RH.

2.1.4. Résection des CDBs dans un contexte chromatinien

La chromatine est le siège de nombreux processus cellulaires tels que la signalisation des CDBs et la régulation de l'expression des gènes. Toutefois, la chromatine peut constituer une barrière à certaines transactions qui doivent s'opérer sur l'ADN. De ce fait, la chromatine environnant les CDBs subit plusieurs modifications incluant des modifications post-traductionnelles des histones et un déplacement mécanique ou une éviction des nucléosomes.

Des facteurs de remodelage de la chromatine sont donc recrutés aux CDBs. Ils agissent de manière ATP-dépendante et sont impliqués dans le glissement ou l'éviction de nucléosomes. Cela permet notamment de rendre la chromatine moins réfractaire à l'action des nucléases. En effet, il a été montré *in vitro* que la dégradation d'un ADN nucléosomal par Sgs1-Dna2 requière la présence d'une région à proximité de la CDB dépourvue de nucléosomes. De son côté, la résection par Exo1 *in vitro* peut être partiellement restaurée par l'élimination des dimères H2A-H2B du substrat chromatinien. Cela montre que les nucléosomes constituent une barrière à la résection par Exo1 (Adkins et al., 2013).

De ce fait, plusieurs facteurs impliqués dans le remodelage de la chromatine sont recrutés aux CDBs afin d'optimiser les étapes de la résection. C'est le cas notamment des complexes RSC et INO80 qui interagissent avec MRN/X. Fun30 est impliquée dans la résection extensive des CDBs (Figure 17).

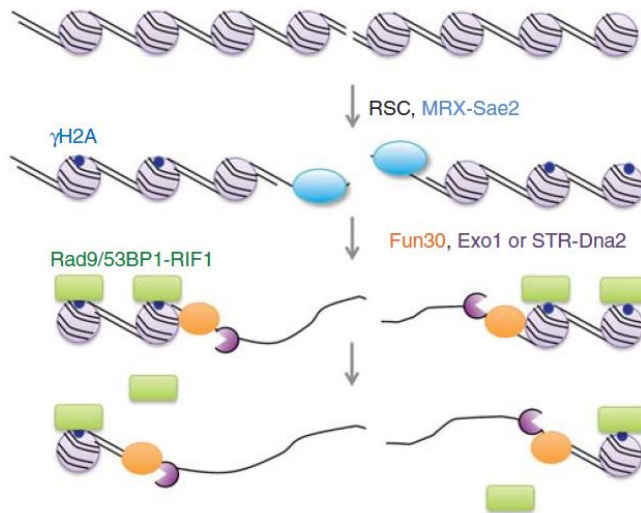


Figure 17: Résection des CDBs dans un contexte chromatinien chez *S. cerevisiae*. Les facteurs de remodelage de la chromatine sont recrutés aux CDBs et stimulent la résection initiale (RSC) et extensive (Fun30). D'après Symington, 2014.

2.1.4.1. Rôle du complexe MRN dans le remodelage de la chromatine

Avant d'exercer ses fonctions dans la résection, MRN/X joue un rôle important dans la signalisation des dommages qui conditionne la formation de γ H2AX/ γ H2A. En réponse aux CDBs, MRN est rapidement recruté *via* le complexe RFC-like Rad17 (senseur de dommages qui interagit avec Nbs1) sur le site de la cassure et agit avec ATM, qu'il active, pour signaler l'existence de la CDB (Falck et al., 2005; Grenon et al., 2001; Jazayeri et al., 2008; Lee and Paull, 2004; Shroff et al., 2004; Uziel et al., 2003; Wang et al., 2014b). Il en résulte alors une rapide phosphorylation de H2AX/H2A permettant d'amplifier l'activité de ATM et de recruter, chez les mammifères, MDC1 (Mediator of DNA Damage Checkpoint 1) via son interaction avec Nbs1, ce qui permet l'accumulation et la stabilisation de MRN (Chapman and Jackson, 2008; Lukas et al., 2004; Spycyher et al., 2008; Wu et al., 2008b).

Des études ont montré que MRN/X peut également être important pour le remodelage de la chromatine et l'éviction des nucléosomes autour de la CDB. En effet, MRN/X stimule le recrutement et l'activation des complexes RSC et INO80, respectivement (Shim et al., 2005; Tsukuda et al., 2005). Cela faciliterait les étapes ultérieures de la réparation de la CDB (Van Attikum et al., 2004; Shim et al., 2005). MRX et ces complexes de remodelage de la chromatine interagissent de manière interdépendante, ce qui génère une boucle de rétroaction positive.

Au contraire de INO80, le complexe RSC est recruté très précocement sur les CDBs avec Mre11 et Ku. Cela intervient en amont de la phosphorylation de H2A. La chromatine étant plus accessible et permissive suite à l'action de RSC, MRN s'accumule et stimule la résection. Par conséquent, cela conduit au recrutement de ATM et ATR et à la phosphorylation de H2A (Figure 18).

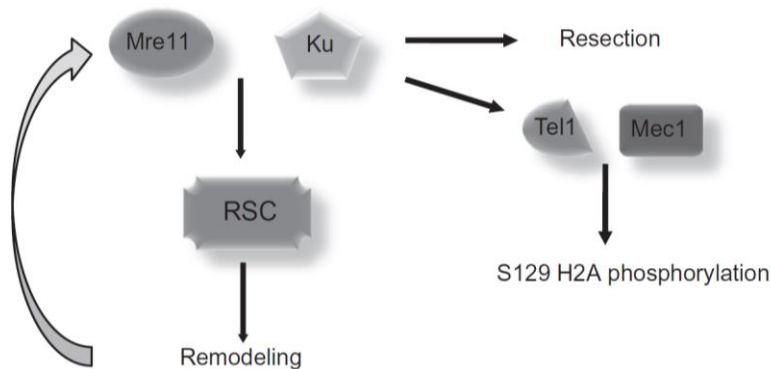


Figure 18 : Mécanisme par lequel MRN/X stimule le remodelage de la chromatine. La fixation de Mre11 et Ku facilite le recrutement du complexe RSC. La chromatine remodelée par RSC permet de recruter plus de Mre11. Il en résulte une signalisation du dommage efficace via Tel1 et Mec1 et la phosphorylation de H2A. D'après Chambers and Downs, 2012.

INO80 est impliquée dans l'incorporation du variant d'histone H2A.Z ainsi que dans la mobilité des nucléosomes à proximité de la cassure, ce qui facilite la résection 5'> 3' (Adkins et al., 2013; Van Attikum et al., 2004). Paradoxalement, H2A.Z semble limiter la résection dans les cellules de mammifères en stimulant le recrutement de Ku (Xu et al., 2013). Le NHEJ étant plus sollicité que la RH chez les mammifères, il se pourrait que des rôles de H2A.Z dans la promotion de la résection soient révélés en absence du NHEJ.

Deux niveaux de régulation des changements de la chromatine sont donc assumés par MRN/X. D'un côté, il participe à l'éviction de nucléosomes pour amorcer le recrutement des facteurs de la réparation et de l'autre, il promeut la phosphorylation de H2A qui module la réponse du DDR.

2.1.4.2. Rôle de Fun30 dans la résection extensive

Fun30 (pour *Function Unknown Now 30*) est un facteur de remodelage de la chromatine appartenant à la famille Snf2 ATP-ase. Il a été caractérisé pour son rôle dans l'inhibition de l'expression des gènes situés dans l'hétérochromatine.

Fun30 chez *S. cerevisiae* et son homologue SMARCAD1 chez les mammifères sont impliquées directement dans la réponse aux CDBs (Chen et al., 2012; Costelloe et al., 2012; Eapen et al., 2012). Leur absence est notamment caractérisée par une sensibilité à certains agents génotoxiques tels que la camptothécine (Costelloe et al., 2012). Fun30 promeut la résection extensive par Exo1 et Sgs1 à travers un mécanisme impliquant l'activité ATPase de Fun30. Son rôle dans la résection est direct, *i.e* il n'implique ni la régulation de la transcription des gènes impliqués dans ce processus ni le changement de la position des nucléosomes (Chen et al., 2012; Costelloe et al., 2012). En effet, Fun30 facilite la résection extensive en augmentant l'accessibilité des nucléases à la chromatine et ce en fragilisant les interactions ADN-histones dans le nucléosome (Figure 19) (Costelloe et al., 2012). Il est à noter que le recrutement de Fun30 et des nucléases impliquées dans la résection extensive est interdépendant. Les nucléases participent au recrutement de Fun30, qui à son tour optimise l'accessibilité de la chromatine à Exo1 et Sgs1-Dna2, créant ainsi une boucle de rétroaction positive.

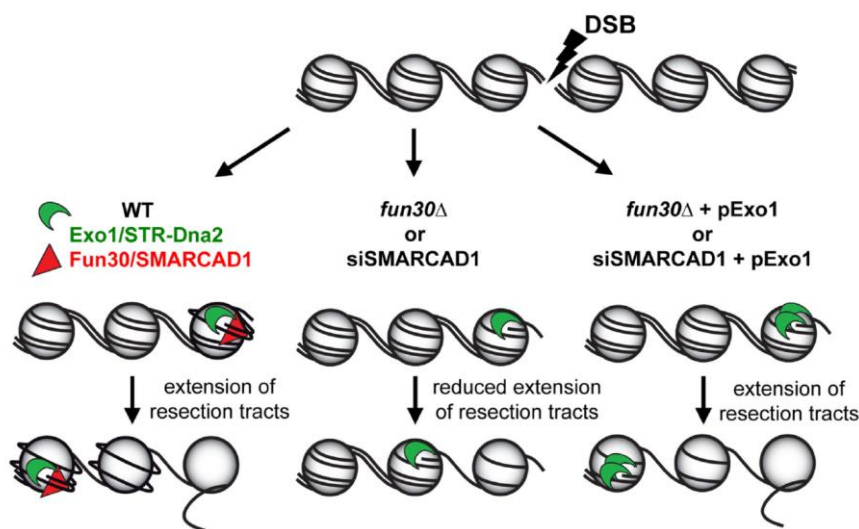


Figure 19 : Modèle illustrant le rôle de Fun30/SMARCAD1 dans la résection extensive des CDBs. Fun30/SMARCAD1 affaiblissent les interactions ADN-histones à proximité de la CDB, ce qui facilite l'extension de la dégradation par Exo1 et Dna2. En absence de Fun30/SMARCAD1, les nucléosomes limitent la résection extensive. Dans ce contexte, la surexpression de Exo1 permet de restaurer le défaut de résection. D'après Costelloe et al., 2012.

De manière surprenante, Fun30 ne stimule pas la résection d'un ADN nucléosomal par Exo1 *in vitro* et ce même en présence de MRX/Sae2/RPA. De plus, Fun30 devient dispensable en absence de Rad9 (53BP1 chez l'homme), connue pour son rôle dans l'inhibition de la résection des CDBs. Cela montre qu'une autre fonction de Fun30 dans la réponse aux CDBs est de contrer l'effet des inhibiteurs de la résection (Chen et al., 2012). Bien que Rad9 soit

recrutée par γ H2A, il est peu probable que Fun30 intervienne au niveau de la chromatine en interagissant avec γ H2A afin de limiter les effets inhibiteurs de Rad9 sur la résection. En effet, Fun30 fixe préférentiellement H2A non phosphorylée (Eapen et al., 2012).

Chez *S. pombe*, trois homologues de Fun30 existent : Fft1, Fft2 et Fft3. Le rôle de Fft3 dans le remodelage de la chromatine a été décrit dans le cadre du maintien de l'hétérochromatine aux centromères et aux régions subtélomériques, la localisation nucléaire de ces dernières et des *tRNA*, l'élongation de la transcription par la RNA polymérase II et le maintien des marques épigénétiques (Lee et al., 2017; Steglich et al., 2015; Strålfors et al., 2011; Taneja et al., 2017). L'implication des homologues de Fun30 chez *S. pombe* dans la résection des CDBs et la RH n'a pas encore été explorée.

2.2. Formation du filament nucléoprotéique et échange de brin: Focus sur la recombinaise Rad51/RecA

L'ADNsb issu de la résection et recouvert par RPA n'a aucune capacité recombinogène. Le chargement de la recombinaise Rad51 (RecA chez *E. coli*) sur l'ADNsb pour former un nucléofilament est nécessaire pour catalyser l'étape la plus caractéristique de la RH : l'échange de brin. Cette étape comprend : l'invasion de l'ADNsb d'un duplex d'ADN homologue, l'appariement du brin envahissant avec le brin complémentaire du duplex et enfin le déplacement du brin non-complémentaire du duplex (San Filippo et al., 2008).

Rad51 a la capacité de se fixer à l'ADNsb *in vitro* mais avec beaucoup moins d'affinité que RPA. *In vivo*, l'ADNsb généré lors de la résection des CDBs est d'abord recouvert par RPA. Le chargement de Rad51 nécessite donc l'action de médiateurs de la recombinaison pour remplacer RPA. Le remplacement de RPA par Rad51 est accompli par Rad52 chez les levures. Chez les vertébrés, c'est BRCA2 et DSS1 qui opèrent le chargement de Rad51 (New et al., 1998; San Filippo et al., 2008; Shinohara and Ogawa, 1998; Zhao et al., 2015).

2.2.1. La recombinaise Rad51

Les fonctions biochimiques et structurales de Rad51/RecA font que ces recombinaises peuvent se nucléer sur l'ADNsb afin de former un filament nucléoprotéique apte à accomplir l'étape d'échange de brin, dépendante de l'ATP.

Les protéines de la famille RecA/Rad51 sont très conservées au cours de l'évolution et sont présentes dans tous les domaines du vivant (RecA chez la bactérie, RadA chez les archées, UvsX chez le bactériophage T4 et Rad51 et Dmc1 chez les eucaryotes) (Tableau 1) (Shinohara et al., 1993). Décrit d'abord chez *E. coli* dans les années 60, ce n'est qu'à partir des années 90 que les gènes codant pour les homologues de RecA ont été décrits chez les eucaryotes (Aboussekhra et al., 1992; Bishop et al., 1992; Clark and Margulies, 1965; Morita et al., 1993; Muris et al., 1993; Shinohara et al., 1992, 1993).

Tableau 2 : Récapitulation de certaines caractéristiques de RecA et Rad51. D'après Baumann and West, 1998; Kowalczykowski et al., 1994; Sauvageau et al., 2005.

Protéine	recA	ScRad51	SpRad51	HsRad51
Masse moléculaire	38 kDa	43 kDa	40 kDa	37 kDa
Acides aminés	352	400	365	339
Substrat préféré	ADNsb>>ADNdb	ADNsb=ADNdb	ADNsb>>ADNdb	ADNsb=ADNdb
Activité ATPase	30 ATP/min	0,7 ATP/min	0,7 ATP/min	0,16 ATP/min
% aa conservés*		59	53	51-56
% aa identique*		33	30	28-30

Sc pour *S. cerevisiae*, Sp pour *S. pombe*, Hs pour *Homo sapiens*.

* pourcentage d'acides aminés conservés ou identiques par rapport à RecA. Ce pourcentage diffère chez l'homme en fonction de la région de RecA utilisée pour la comparaison.

Chez les eucaryotes, Rad51 est très conservée en termes de structure, de biochimie et de mécanisme de réparation. Toutefois, il existe des divergences de fonctions. En effet, chez les vertébrés la délétion du gène *rad51* est létale (et ce à un stade très précoce du développement) (Lim and Hasty, 1996; Sonoda et al., 1998). Chez les levures, la délétion de *rad51* est viable mais confère une sensibilité accrue aux agents génotoxiques. On peut imaginer qu'une prolifération accrue et une taille de génomes assez conséquente, et donc une incidence de CDB plus fréquente, appellent à un système de réparation robuste et fidèle. Cette hypothèse est confortée par le fait que la délétion du gène *p53* retarde la létalité due à l'absence de RAD51 (Lim and Hasty, 1996). Cependant, l'utilisation de formes dominantes négatives de RAD51, déficientes pour la recombinaison mais pas pour la prolifération montre que ces deux fonctions (réparation par la recombinaison et viabilité cellulaire) sont séparables (Lambert and Lopez, 2000). Il est donc probable qu'au cours de l'évolution, Rad51 a pu acquérir de nouvelles fonctions expliquant son rôle essentiel chez les vertébrés. Il a été rapporté que des mutations, hétérozygotes générant une haplo-insuffisance, dans le gène *RAD51* sont associées au syndrome des mouvements en miroir congénitaux (Depienne et al., 2012). Ce syndrome est caractérisé par des mouvements bi-manuels symétriques involontaires issus de problèmes de guidance axonale. Il s'avère que RAD51 est fortement exprimée dans le système moteur à des stades précoces du neuro-développement. RAD51 est impliquée dans le développement corticospinal du système moteur (Depienne et al., 2012; Gallea et al., 2013). Il est à noter que le mécanisme moléculaire expliquant le rôle surprenant et inattendu de RAD51 dans l'organisation du système moteur reste à élucider. Pour l'instant, un lien entre développement neurologique et réparation de l'ADN par la RH n'a pas été établi et ne peut donc pas être exclu.

2.2.1.1. Propriétés structurales et biochimiques de Rad51

La protéine Rad51 comprends trois régions : une région N-terminale (comprenant les acides aminés 1 à 154 chez *S. cerevisiae*), une région centrale appelée le « core domaine » (de 155 à 374) et la région C-terminale (de 375 à 400). Les régions les plus conservées sont représentées par les domaines de Walker A et B situés dans le core domaine. Walker A et

Walker B sont des motifs de liaison de nucléotides où l'ATP se lie et est hydrolysé (Figure 20) (Benson et al., 1994).

Rad51/RecA est dotée d'une activité de fixation à l'ADN et de polymérisation sur l'ADNsb et db formant ainsi un filament hélicoïdal fonctionnellement compétent pour l'échange de brin. La fixation de l'ATP est nécessaire à la fixation de Rad51 sur l'ADN qu'elle étire ; tandis que l'hydrolyse de l'ATP conduit à la dissociation du nucléofilament (Benson et al., 1994).

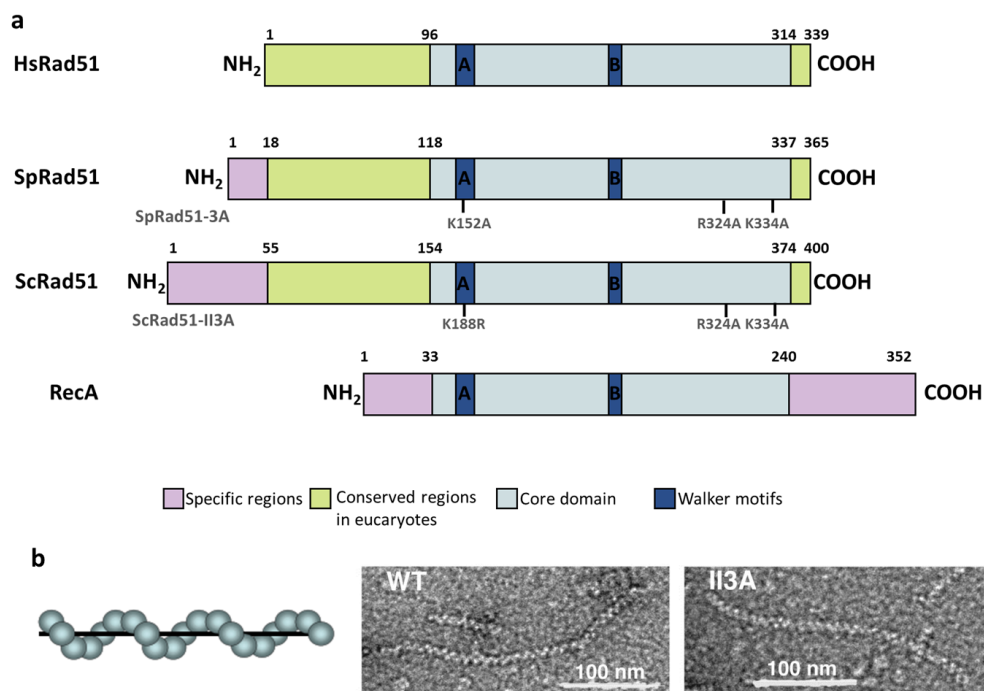


Figure 20 : Structure des homologues de RecA. (a) Représentation des domaines composant RecA (*E. coli*) et Rad51 chez l'homme (Hs), *S. pombe* (Sp) et *S. cerevisiae* (Sc). Le domaine core représente la région la plus conservée entre les différents homologues. La position des résidus mutés dans Rad51-3A chez *S. pombe* et rad51-II3A chez *S. cerevisiae* est indiquée en gris. (b) Représentation schématique (à gauche) et image en microscopie électronique (à droite) du filament hélicoïdal de ScRad51 et ScRad51-II3A sur un ADNsb. Modifié de Shinohara et al., 1993 (a) ; d'après Cloud et al., 2012 et Thorslund and West, 2007 (b).

Les fonctions de Rad51 étant régies par sa capacité à fixer/hydrolyser l'ATP, il a été possible de générer des mutants *rad51* incapables de fixer l'ADN et/ou d'effectuer l'invasion de brin en jouant sur les capacités à fixer/hydrolyser l'ATP. Les mutants ATPases les plus étudiés sont RAD51-K133R et K133A chez les mammifères, Rad51-K191R et K191A chez *S. cerevisiae* et Rad51-K155A chez *S. pombe* (Chi et al., 2006; Kim et al., 2001; Morgan et al.,

2002). La mutation de la lysine en alanine empêche la fixation de l'ATP, et sa mutation en arginine empêche l'hydrolyse de l'ATP sans impacter la capacité de Rad51 à le fixer. Un autre mutant *rad51* (Rad51-II3A, où les résidus R188, K361 et K371 sont mutés en alanine) a été caractérisé chez *S. cerevisiae* et permet d'étudier le rôle du filament Rad51 indépendamment de sa capacité à effectuer l'étape d'invasion de brin (Cloud et al., 2012). Rad51-II3A forme un nucléofilament semblable à Rad51 mais est incapable de former la D-loop *in vitro* et ce même en présence de Rad52. Ce mutant a permis de montrer la relation fonctionnelle entre Rad51 et Dmc1 en méiose : (i) seule l'activité d'échange de brin par Dmc1 est impliquée dans la recombinaison méiotique, et (ii) l'activité de Dcm1 nécessite la fixation de Rad51 sur l'ADNsb (Bishop, 2012; Cloud et al., 2012). Durant ma thèse, j'ai été amenée à utiliser ce mutant de séparation de fonction chez *S. pombe* (Rad51-3A, R152A-R324A-K334A) afin de déterminer les fonctions de Rad51 qui assurent la stabilité génétique en réponse au stress réplicatif.

2.2.1.2. Recherche d'homologie

Avant de procéder à l'étape d'invasion de brin, le duplexe homologue qui servira de matrice pour la réparation doit être trouvé. La recherche d'homologie est médiée par le filament Rad51 sur l'ADNsb. Il est à noter que, parmi les étapes de la RH, la recherche d'homologie est la moins caractérisée, car il est difficile de cibler cette étape dans le génome en temps réel. Lorsque l'invasion de brin s'opère au niveau de la chromatide sœur, le duplexe homologue se trouve à proximité. Par contre, en cas de recombinaison ectopique, le brin envahissant doit explorer le génome afin de trouver la séquence cible adéquate, à moins que les séquences homologues partagent le même territoire chromosomique. Etant donné la taille des génomes, cela revient à trouver une aiguille dans une botte de foin, chose que Rad51 fait avec adresse. Il a été montré qu'en réponse à une CDB, la recherche d'homologie peut être facilitée par l'hyper-mobilité des chromosomes dépendante de Rad51 (et autres protéines telles que Rad9/53BP1, Mec1/ATM et Rad54) (Dion et al., 2012; Krawczyk et al., 2012; Miné-Hattab and Rothstein, 2012). De plus, étant donné que le nucléofilament peut se former sur plusieurs kilobases, la recherche d'homologie peut se faire *via* la formation de courtes synapses (Renkawitz et al., 2013).

2.2.1.3. Réaction d'échange de brin

RecA et Rad51 forment un filament hélicoïdal sur l'ADN révélant un fort degré de conservation structurale (Ogawa et al., 1993). Cependant, le mode d'invasion du duplexe homologue se fait avec des polarités opposées : l'échange de brin médié par RecA est unidirectionnel avec une polarité 5'>3' (par rapport au brin envahissant) tandis que Rad51 a tendance à suivre une direction 3'>5' (Cox, 2003; Sung and Robberson, 1995). Des différences existent également d'un point de vue énergétique. RecA hydrolyse l'ATP avec un taux 40-200 fois supérieur à celui de Rad51 (Baumann et al., 1996; Sauvageau et al., 2005). De ce fait, la réaction d'échange de brin est beaucoup moins extensive avec Rad51. Ces différences étant établies *in vitro*, elles s'expliquent par le fait qu'*in vivo*, Rad51 est assistées par plusieurs protéines. Ces protéines sont pour la plupart dotées d'activité ATPase et qualifiées de « médiateurs de la recombinaison ».

Pendant longtemps, les réactions d'appariement à la séquence homologue et la formation de l'hétéroduplexe d'ADN ont été associées à l'unique capacité de Rad51/RecA à fixer l'ATP indépendamment de son hydrolyse (*via* l'utilisation d'ATP non hydrolysable ou de mutants incapables d'hydrolyser l'ATP) (Chi et al., 2006; Menetski et al., 1990; Sung and Stratton, 1996). Une étude récente a cependant montré chez *E. coli* que l'hydrolyse de l'ATP régule la capacité du nucléofilament à promouvoir l'échange de brin et donc la recombinaison homologue (Zhao et al., 2017). En effet, la dynamique d'assemblage du nucléofilament n'est pas linéaire. Des molécules de Rad51 fixent l'ATP et se lient à l'ADNsb successivement jusqu'à former un nucléofilament saturé et étiré. A ce stade, l'hydrolyse de l'ATP s'opère sur quelques molécules afin de rétablir un nucléofilament insaturé plus efficace pour l'étape d'invasion de brin et plus propice à la RH (Zhao et al., 2017).

2.2.2. Compétition/collaboration entre RPA et Rad51

La fixation de RPA sur l'ADNsb est nécessaire pour la stimulation de la résection extensive et le recrutement de ATR-ATRIP (Zou and Elledge, 2003). Au-delà de ces rôles, RPA est impliqué dans les étapes présynaptiques et synaptiques de la RH.

In vivo, la fixation de RPA sur l'ADNsb précède la formation du filament présynaptique par Rad51. RPA a une plus grande affinité pour l'ADNsb que Rad51 et inhibe la formation du nucléofilament *in vitro* (Sigurdsson et al., 2001; Sung, 1997). L'effet inhibiteur de RPA peut être surmonté en présence de médiateurs de la RH, tels que Rad52, suggérant que ces protéines aident à remplacer RPA par Rad51 (New et al., 1998; Shinohara and Ogawa, 1998; Sung, 1997).

D'un autre côté, RPA stimule les activités de Rad51. En effet, RPA promeut la RH en éliminant les structures secondaires de l'ADNsb pouvant gêner la fixation de Rad51. De plus, ajoutée après Rad51 dans la réaction *in vitro*, RPA stimule l'invasion de brin par Rad51 et fixe l'ADNsb déplacé (Shinohara and Ogawa, 1998; Sigurdsson et al., 2001).

RPA possède donc des rôles opposés en ce qui concerne la stimulation de la RH, dénotant ainsi l'importance de la coordination de la machinerie de recombinaison.

2.3. Médiateurs de la RH

Chez les eucaryotes, Rad51 a des fonctions limitées *in vitro* en termes d'appariement et d'échange de brin comparativement à RecA. Ces étapes peuvent être stimulées par les médiateurs de la RH (Figure 21) (Sigurdsson et al., 2001; Sugawara et al., 2003; Sugiyama and Kowalczykowski, 2002). Ces médiateurs facilitent le chargement de Rad51 sur l'ADNsb, abrogent l'effet inhibiteur de RPA, stabilisent le filament présynaptique et empêchent l'éviction de Rad51 de l'ADNsb par des hélicases qualifiées d'anti-recombinases (Figure 21).

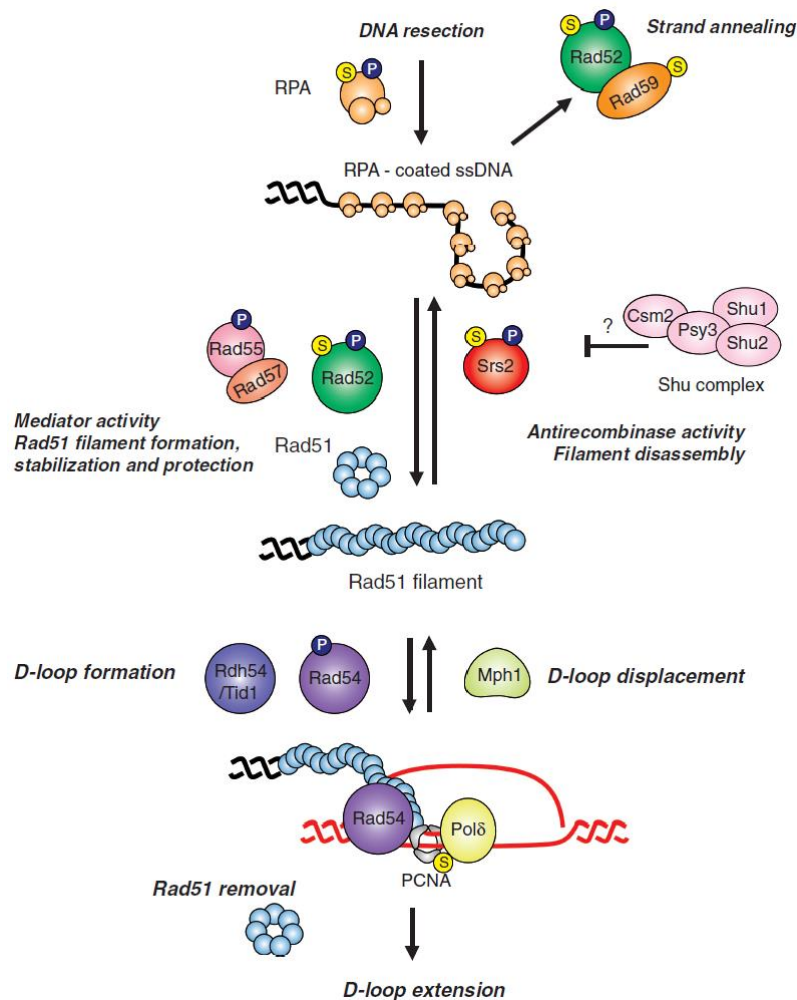


Figure 21 : Régulation des fonctions de Rad51 par les médiateurs de la recombinaison chez *S. cerevisiae*. Rad52 et Rad55-Rad57 stimulent la fixation de Rad51 sur l'ADNsb et le remplacement de RPA. Ils stabilisent le filament Rad51 en contrant sa dissociation par l'hélicase Srs2. Le complexe Shu stimule la formation du nucléofilament en interagissant avec Rad52 et Rad55-Rad57 et peut être en inhibant l'action de Srs2. Rad54 assiste le filament présynaptique durant la recherche d'homologie et stimule la formation de la D-loop. Mph1 (*Fml1* chez *S. pombe* et *FANCM* chez l'homme) promeut la dissolution de la D-loop et limite les événements de crossovers. En plus de son rôle de médiateur, Rad52 s'associe avec Rad59 et stimule la réparation indépendamment de rad51 (via l'appariement de brins). D'après Krejci et al., 2012.

2.3.1. Rad52 et BRCA2

Chez les levures, le médiateur principal de la RH est Rad52. En plus de son rôle de médiateur de la RH, Rad52 est impliquée dans l'hybridation de brins d'ADNsb complémentaires (Sugiyama et al., 1998). Rad52 interagit avec RPA et Rad51 et (i) facilite la nucléation de Rad51 sur l'ADNsb en déplaçant RPA, (ii) participe à la stabilité du nucléofilament et (iii) stimule l'étape d'invasion de brin (New et al., 1998; Shinohara and Ogawa, 1998). En chargeant Rad51 sur l'ADNsb, Rad52 limite également la séquestration de Rad51 sur l'ADNdb (New and Kowalczykowski, 2002). Rad52 interagit avec Rad51 *via* sa région C-terminale mais la plupart des activités de Rad52 est assurée par sa région N-terminale (fixation à l'ADN, hybridation de séquences homologues et homodimérisation) (Milne and

Weaver, 1993; Shen et al., 1996). Ainsi, il a été montré que la région interagissant avec Rad51 est indispensable pour ses activités de médiateur de la RH mais dispensable pour ses activités de fixation à l'ADNsb, l'hybridation des brins et l'oligomérisation (Krejci et al., 2002; Shinohara and Ogawa, 1998).

Le médiateur principal de la RH chez les mammifères est BRCA2, une protéine dont la déficience prédispose aux cancers du sein et de l'ovaire. BRCA2 est un gène essentiel mais des lignées tumorales déficientes pour BRCA2 existent. BRCA2 interagit avec RAD51, facilite sa nucléation sur l'ADNsb, stabilise le nucléofilament formé et stimule l'échange de brin (Jensen et al., 2010). Contrairement à Rad52 chez les levures, BRCA2 n'est pas impliquée dans l'hybridation de brins d'ADNsb.

Il est à noter que RAD52 est présente chez les mammifères mais ses fonctions sont indépendantes de Rad51. En effet, RAD52 est impliquée dans l'appariement d'ADNsb mais pas dans le chargement de RAD51 et le remplacement de RPA (Jensen et al., 2010). Toutefois, des rôles de RAD52 dans la RH dépendante de RAD51 ont pu être révélés en absence de BRCA2, suggérant ainsi que RAD52 peut être un médiateur alternatif dans le recrutement de Rad51 (Figure 22) (Feng et al., 2011). Cette idée est confortée par le fait que la région C-terminale de RAD52 interagit avec RAD51 et que l'inactivation de RAD52 dans des lignées tumorales déficientes pour BRCA2 confère une létalité synthétique (Feng et al., 2011; Kagawa et al., 2001).

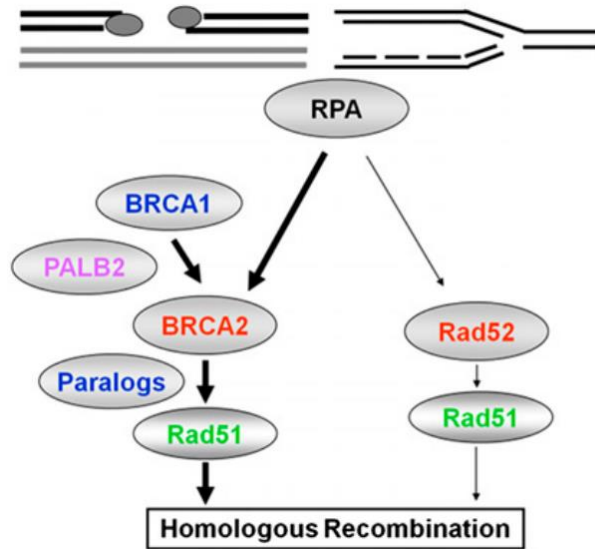


Figure 22 : Stimulation de la recombinaison homologue dépendante de Rad51 selon deux voies chez les mammifères. La voie majoritaire est représentée par BRCA2-Rad51. En absence de BRCA2, Rad52 peut être utilisée pour la réparation impliquant Rad51. D'après Feng et al., 2011.

2.3.2. Les paralogues de Rad51

Chez les levures, les paralogues de Rad51 sont représentés par Rad55 et Rad57 qui forment un hétérodimère (Rad55-Rad57) impliqué dans la formation et la stabilisation du filament présynaptique. La plupart des rôles de Rad55 et Rad57 ont été déterminés *in vitro* chez *S. cerevisiae*. Rad55-Rad57 s'associe avec le nucleofilament formé par Rad51, le rendant ainsi plus résistant à une dissociation par l'hélicase Srs2 (Liu et al., 2011). De plus, l'hétérodimère Rad55-Rad57 participe, avec RPA, à promouvoir l'étape d'échange de brin (Sung, 1997). Chez *S. pombe*, Rad55 et Rad57 sont importants pour contrecarrer les effets des anti-recombinases Srs2 et Fbh1 (Doe and Whitby, 2004; Osman et al., 2005). Les rôles de Rad55-Rad57 sont retrouvés en méiose, où le complexe stimule la formation de crossovers en atténuant l'action de Fml1 (homologue de FANCM chez l'homme) et Rqh1 (Lorenz et al., 2014).

Chez les mammifères, les paralogues de Rad51 sont représentés par deux complexes : RAD51B-RAD51C-RAD51D-XRCC2 et RAD51C-XRCC3 (Masson et al., 2001). RAD51B et RAD51C sont les homologues de Rad55 et Rad57 respectivement et stimulent la réaction d'échange de brin (Sigurdsson et al., 2001).

Il est à noter que chez *S. pombe* et les mammifères, d'autres médiateurs de la RH, représentés par le complexe Swi5-Sfr1, fonctionnent en parallèle des paralogues de Rad51 dans la stimulation des activités de Rad51 (Akamatsu et al., 2003; Haruta et al., 2006; Tsai et al., 2012).

2.3.3. Rad54

Rad54 est une protéine de la famille Swi2/Snf2 impliquée dans le remodelage de la chromatine de façon ATP-dépendante et joue un rôle à chaque phase de la RH (Figure 23). Durant la phase présynaptique, Rad54 interagit avec Rad51 et stabilise le nucléofilament formé par celui-ci (Mazin et al., 2003). Durant la phase synaptique, Rad54 facilite notamment la formation de la D-loop en induisant des changements topologiques dans le duplexe d'ADNdb homologue. Dotée d'une activité ATPase, Rad54 facilite l'invasion du duplexe par le nucléofilament Rad51 grâce à sa capacité de remodelage de la chromatine (Wolner and Peterson, 2005). Durant la phase postsynaptique, Rad54 favorise plutôt la dissociation de Rad51 liée à l'hétéroduplexe afin de libérer l'accès à l'extrémité 3'-OH du brin envahissant pour les polymérase (Li and Heyer, 2009; Solinger et al., 2002; Sugawara et al., 2003).

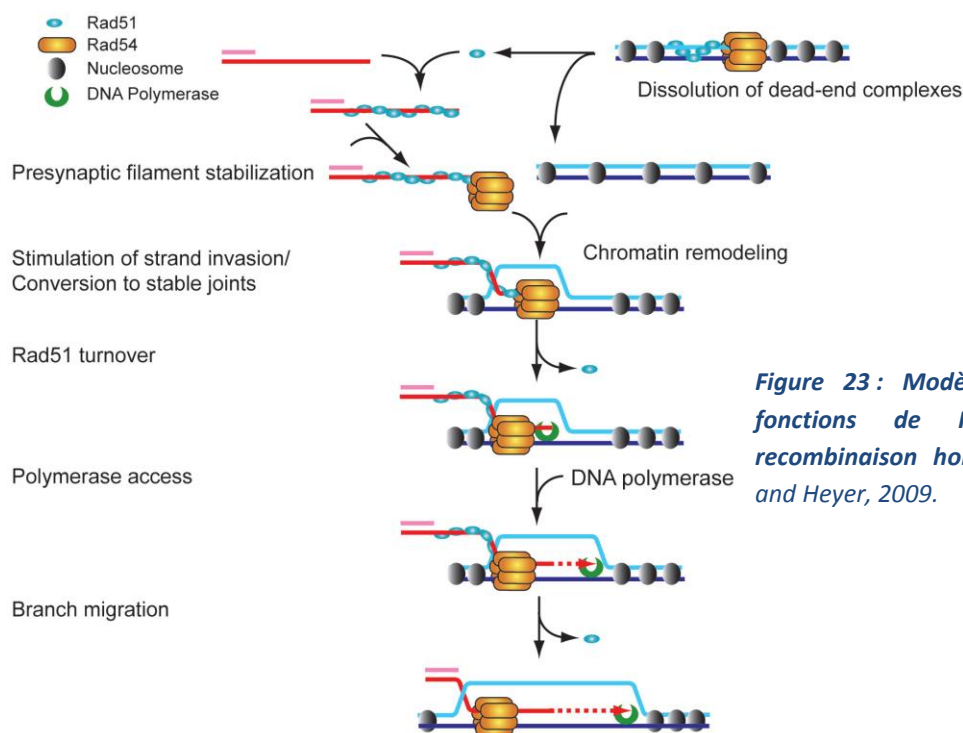


Figure 23: Modèle représentant les fonctions de Rad54 durant la recombinaison homologue. D'après Li and Heyer, 2009.

2.4. Modèles de la recombinaison homologue

L'accomplissement de la RH peut s'opérer selon plusieurs modèles (Figure 24): DSBR (pour *Double Strand Break Repair*), SDSA (pour *Synthesis Dependant Strand Annealing*), BIR (pour *Break-Induced Replication*) et SSA (pour *Single-Strand Annealing*). Au niveau moléculaire, tous ces modèles sont initiés par une dégradation 5'-3'. Cependant, malgré l'universalité des recombinases Rad51, celles-ci ne sont pas requises pour toutes les formes de recombinaison. On peut donc distinguer deux voies de RH, une dépendante de Rad51 et une autre indépendante (mais dépendante de Rad52) (Bai and Symington, 1996; Bärtisch et al., 2000; Krejci et al., 2012). Il est à noter que les modèles de la RH dépendant de Rad51 ne diffèrent que dans l'issue de l'étape postsynaptique (Figure 24).

Les modèles décrits ci-dessous sont tous initiés à partir d'une CDB. Il est à rappeler que les tous premiers modèles de RH impliquent des CSBs ou des brèches simple-brin. Dans le premier modèle proposé par Robin Holliday, une CSB est formé sur les deux duplexes homologues (Holliday, 1964). La première extrémité de chaque brin est ressoudée avec la deuxième extrémité du brin contenu dans le duplexe homologue. Suite à cet échange de brin, une jonction de Holliday est formée. Deux produits de recombinaison sont alors possibles : produits avec ou sans crossovers (COs). Meselson et Radding ont par la suite proposé un autre modèle pour la formation de la structure de Holliday. Dans ce modèle, la RH est initiée à partir d'une seule CSB convertie en une brèche simple brin (Meselson and Radding, 1975; Szostak et al., 1983).

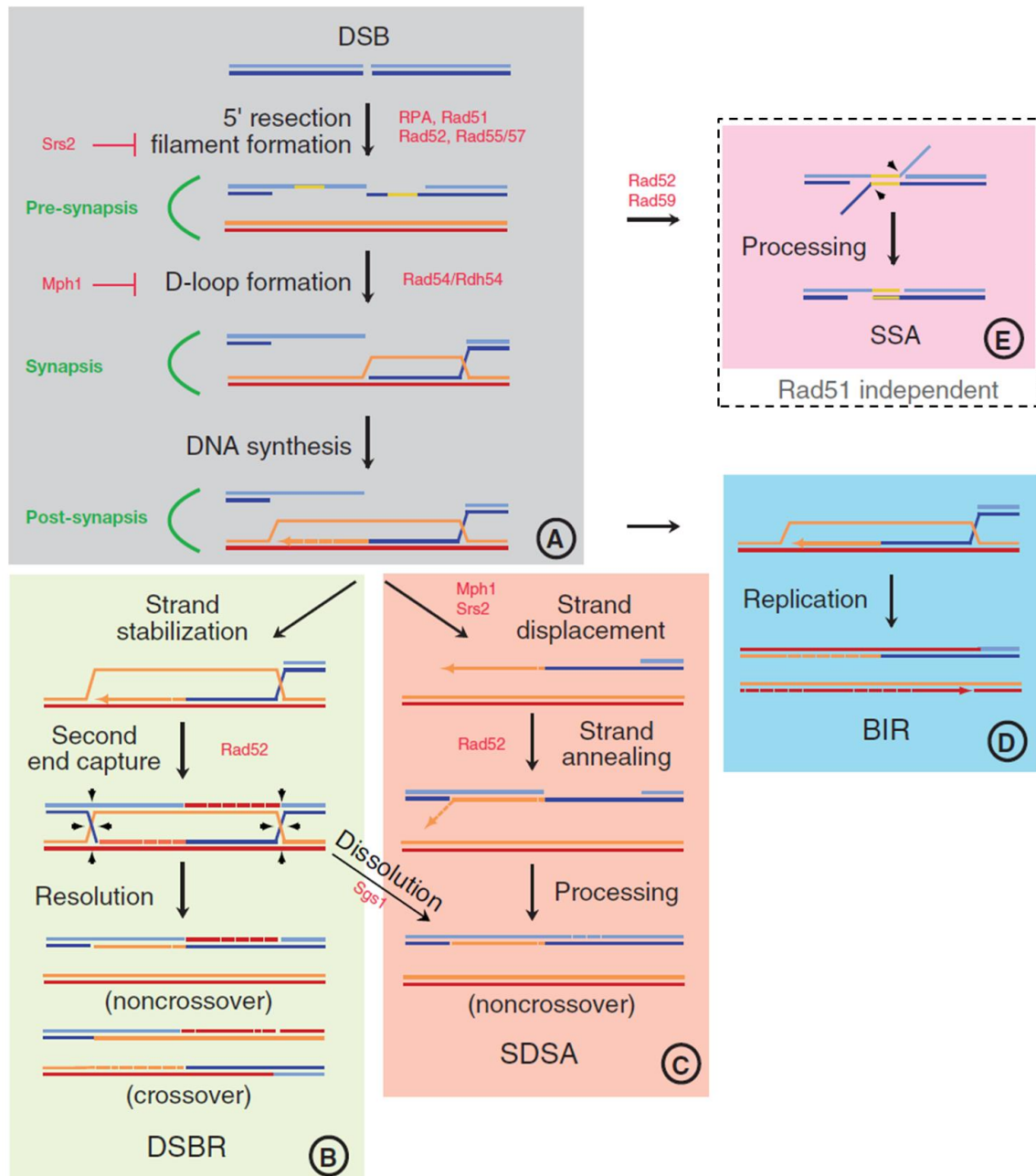


Figure 24 : Modèles de la recombinaison homologue. (A) La réparation par la RH est initiée par une résection générant un brin 3' sur lequel Rad51, aidée par les médiateurs de la RH, forme un filament nucléoprotéique capable d'envahir le duplexe homologue. Une fois la synthèse de l'ADN entamée, la réparation peut se poursuivre selon trois voies distinctes. (B) Le DSBR implique la capture de la deuxième extrémité de la CDB et la formation d'une double jonction de Holliday (JH). Les jonctions de Holliday peuvent être résolues par des nucléases (Yen1/GIN1) qui, selon le plan d'incision des jonctions, donnent naissance à des produits avec ou sans crossovers (noncrossover sur la figure). L'intervention de Sgs1-Top1-Rmi1 permet la dissolution de la double JH et élimine la possibilité de crossover. (C) Le SDSA est caractérisé par le déplacement du brin envahissant en cours de synthèse et son appariement avec le brin 3' de la CDB. La réparation se poursuit par la synthèse de l'ADN sur les gaps restants. (D) Le BIR se caractérise par le fait que la synthèse du brin envahissant peut se poursuivre sur de très grandes régions d'ADN via la conversion de la D-loop en fourche de réplication. (E) Le SSA est utilisé lorsque la CDB se produit entre deux séquences répétées. Dans ce cas, la résection extensive de la CDB révèle des séquences complémentaires qui s'apparient. Cette dernière voie de réparation est indépendante de Rad51 et fait intervenir Rad52 et Rad59. Modifié de Krejci et al., 2012.

2.4.1. Le DSBR

Le modèle de la réparation de cassures double-brin ou DSBR est le modèle canonique de la RH initialement suggéré par Resnik, qui a proposé une réparation des CDBs par la RH dépendante de Rad52 chez *S. cerevisiae*, et étayé par Szostak (Resnick, 1975; Szostak et al., 1983). Le DSBR se différencie des autres modèles par la formation d'une double jonction de Holliday (JH) (Figure 24B). Dans ce modèle, les extrémités 5' de la CDB sont dégradées et un des deux ADNsb généré (3' sortant) envahit le duplexe homologue (duplexe donneur). La D-loop ainsi formée peut-être élargie, grâce à la synthèse d'ADN, de façon à ce que la deuxième extrémité de la CDB soit capturée. Ainsi, l'extrémité 3' du brin non-envahissant s'apparie au brin déplacé du duplexe donneur qui lui sert de matrice pour la synthèse d'ADN. Les extrémités 3' des brins néo-synthétisés sont alors liguées avec les extrémités 5' de la CDB et deux JHs sont formées. Les deux molécules d'ADN sont séparées, suite à la résolution ou la dissolution des JHs par des résolvases. En fonction de la manière dont les JHs sont résolues, la conversion génique (GC) peut s'accompagner d'événements de crossovers ou de non-crossovers (COs et NCOs) (Szostak et al., 1983).

Ce modèle explique la fréquence des COs observés en méiose. Bien que considéré comme le modèle canonique de la RH, le DSBR ne permet pas d'expliquer la faible fréquence des COs en mitose. En effet, les produits issus de la réparation des CDBs mitotiques par la RH correspondent le plus souvent à des événements de non-crossovers issus du SDSA plutôt que d'une dissolution de la double JH (Mehta and Haber, 2014; Wu et al., 2008c).

2.4.2. Le SDSA

Dans ce modèle, les étapes antérieures à la formation de la D-loop sont les mêmes que pour le DSBR mais la plupart du temps la double JH n'est pas formée. En effet, la D-loop est formée et la synthèse d'ADN à partir du brin 3' envahissant est amorcée, mais le brin néo-synthétisé se dissocie du duplexe donneur et s'apparie avec le brin exposé de la deuxième extrémité de la CDB. Une synthèse d'ADN, suivie d'une ligature, continue alors sur les brèches restantes (Ferguson and Holloman, 1996; Formosa and Alberts, 1986; Nassif et al., 1994).

Etant donné que le duplexe homologue reste inchangé, les produits associés au SDSA sont des non-crossovers (Figure 24 C).

Rad51 et les médiateurs de la RH sont importants pour le DSBR et le SDSA (Krejci et al., 2012; Wu et al., 2008c) mais leur implication n'est pas du même ordre :

1- Rad51 oriente vers une réparation type SDSA alors que Rad52 favorise, en présence de RPA, la capture de la deuxième extrémité de la CDB et favorise donc le DSBR (Bärtsch et al., 2000; Sugiyama et al., 2006). Le fait que le SDSA soit la voie la plus sollicitée pour la réparation des CDBs mitotiques, est probablement dû à la capacité de Rad51 à minimiser l'activité d'appariement de Rad52, bien que cette activité soit nécessaire durant la dernière étape du SDSA (Wu et al., 2008c).

2- Tandis que le SDSA est exclusivement dépendant de Rad51 avec la participation des autres médiateurs de la RH, une forme minoritaire du DSBR ne dépend que de Rad52. En effet, en absence de Rad51, Rad52 peut catalyser des échanges de brin résiduels dont l'issue est le plus souvent associé à des événements de CO (Bärtsch et al., 2000).

2.4.3. Le BIR

La réplication induite par une cassure ou BIR est un mécanisme proposé pour la réparation des CDBs lorsqu'une seule extrémité est disponible. Cette situation est retrouvée au niveau de fourches de réplication cassées ou des télomères érodés. Le BIR peut être sollicité pour la réparation des CDBs dont une seule des extrémités partage une homologie avec le duplexe homologue. De façon similaire aux deux précédents modèles de la RH, le BIR est initié par la résection 5'>3' de la CDB et une invasion de brin médiée par Rad51. Cependant, il semblerait qu'une résection extensive (par Exo1 et Sgs1) soit un facteur limitant pour l'accomplissement du BIR (Lydeard et al., 2010a; Marrero and Symington, 2010). De plus, le BIR s'opère avec une cinétique plus lente due à un retard dans l'initiation de la synthèse d'ADN (Malkova et al., 2005). Ce temps de latence est imposé par un système de surveillance, le REC (pour

Recombination Execution Checkpoint). Le REC empêche la réparation par le DSB/SDSA lorsqu'une seule extrémité est disponible ou lorsque les deux extrémités ciblent deux duplexes donneurs différents (Jain et al., 2009).

Le BIR est associé à une synthèse d'ADN qui requiert tous les facteurs de la machinerie de réplication, exceptés ceux impliqués dans l'assemblage du complexe pre-RC, ce qui pourrait également expliquer une cinétique plus lente (Lydeard et al., 2010b). L'assemblage du réplisome se fait indépendamment d'une activation d'origines, ce qui soulève des questions sur son mode de recrutement et l'établissement de fourches de réplication en absence d'origines. Néanmoins, la synthèse de l'ADN fait appel aux mêmes facteurs impliqués dans la synthèse des brins précoce (le brin envahissant dans le BIR) et tardif (le brin complémentaire) : Pol α -primase et Pol δ pour l'extension initiale de la synthèse, et Pol ϵ pour continuer la synthèse après 30Kb (Lydeard et al., 2007). Il semblerait que Pol32 (sous unité non catalytique de Pol δ , dispensable lors de la réplication, du DSB et du SDSA chez *S. cerevisiae*) soit particulièrement requise lors du BIR (Lydeard et al., 2007, 2010b). Des études *in vitro* montrent que Pif1 stimule la synthèse d'ADN par Pol δ à partir de la D-loop formée par Rad51 et facilite la migration de la D-loop en libérant le brin nouvellement synthétisé (Wilson et al., 2013).

Dans ce modèle, deux situations sont envisageables suite à la formation de la D-loop. La première situation implique la résolution de la jonction entre le fragment envahissant et le brin déplacé du duplexe homologue par des nucléases (Pardo and Aguilera, 2012; Smith et al., 2007). Il en résulte une conversion de la D-loop en fourche de réplication sur laquelle la synthèse d'ADN se fait de façon semi-conservative (Figure 25) (Donnianni and Symington, 2013). La seconde situation implique la migration de la D-loop (*bubble-like*) rappelant une bulle de réplication. Ce mode de réplication non-canonique est dépendant de l'hélicase Pif1 et la synthèse de l'ADN se fait, dans ce cas, de manière conservative (*i.e.* les brins néo-synthétisés se retrouvent sur la même molécule d'ADN) sur plusieurs milliers de paires de bases, voire sur le chromosome entier (Figure 25) (Donnianni and Symington, 2013; Formosa and Alberts, 1986; Saini et al., 2013). Plusieurs rounds de dissociations et d'invasion de

duplexes différents sont toutefois possibles, ce qui souligne la nature instable de ses intermédiaires (Smith et al., 2007).

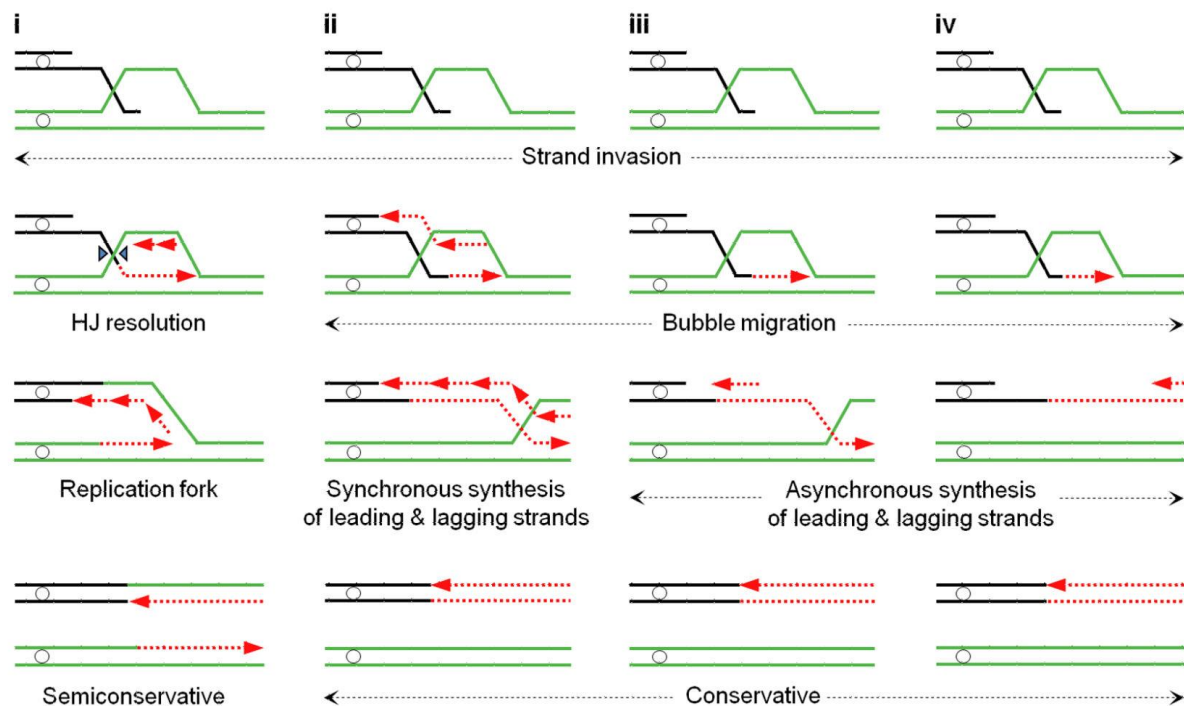


Figure 25 : Les modes de synthèse de l'ADN au cours du BIR. (i) Le clivage de l'intermédiaire de recombinaison formé par le brin envahissant et le brin déplacé du duplexe donneur permet d'établir une fourche de réplication. La synthèse de l'ADN se fait de manière semi-conservative. (ii-iv) La progression de la bulle de migration fait que les brins néosynthétisés se retrouvent sur la même molécule d'ADN. La synthèse des brins précoce (leading strand) et tardif (lagging strand) est dite conservative. (ii) Les deux brins sont synthétisés de façon synchronisée, chacun à partir du brin donneur complémentaire. (iii) et (iv) La synthèse se fait de manière asynchrone. La bulle de migration progresse et le brin tardif est synthétisé à partir du brin précoce. Quel que soit le mode de synthèse, la perte d'hétérozygotie est inévitable. D'après Saini et al., 2013.

Le BIR requiert la même machinerie pour l'invasion de brin que le SDSA ou le DSBR (Rad51, Rad52, Rad54, Rad55 et Rad57). Cela suggère que le facteur limitant pour la réparation par un des deux mécanismes les plus conservatifs (*i.e.* DSBR et SDSA), soit la présence d'une seule extrémité double-brin. La seconde extrémité de la CDB serait donc une barrière pour l'initiation du BIR. L'intervention de Rad51 est observée dans 95% des cas où la réparation se fait *via* le BIR. Toutefois, une voie dépendante de Rad52 peut être engagée indépendamment de Rad51 (Davis and Symington, 2004; Malkova et al., 1996). En plus de ses activités d'appariement de brins, Rad52 possède également des activités d'échange de brins expliquant sa capacité à accomplir le BIR (Bi et al., 2004; Davis and Symington, 2004; Kagawa et al., 2001).

Bosco et Haber ont montré que 72pb d'homologie suffisent lorsque Rad52 engage une réparation par le BIR (Bosco and Haber, 1998). Lorsque la réparation implique l'utilisation de séquences répétées inversées sur la même molécule d'ADN, une homologie impliquant 29 à 37pb est suffisante pour une réparation intra-chromosomique dépendante de Rad52 (Ira and Haber, 2002). L'utilisation de micro-homologies par Rad52 en absence de Rad51 suggère que ce dernier oriente la réparation vers l'utilisation d'homologies franches (>100pb) plutôt que des micro-homologies qui accroissent les possibilités de translocations.

Le *modus operandi* du BIR fait qu'il est une source de perte d'hétérozygotie et explique les évènements de CG sur de très grandes régions d'ADN (>100Kb) (Malkova et al., 1996). De plus, la synthèse de l'ADN lors du BIR, notamment lorsqu'elle est conservative, est plus mutagène que la synthèse normale au cours de la phase S (Deem et al., 2011; Donnianni and Symington, 2013; Saini et al., 2013).

2.4.4. Le SSA

Ce modèle a été découvert chez les mammifères et extensivement étudié chez *S. cerevisiae* lors de la réparation de CDBs (Fishman-Lobell et al., 1992; Lin et al., 1984; Maryon and Carroll, 1991). Il survient le plus souvent sur des séquences répétées directes. Parmi tous les modèles de RH, le SSA est le plus simple mais aussi le plus mutagène. Une fois la résection 5'>3' accomplie, les deux brins d'ADNs générés s'apparient au niveau de régions complémentaires (>30pb), générant inévitablement des délétions (McVey and Lee, 2008). Un appariement inter-chromosomique est, quant à lui, une source majeure de translocations (Lin et al., 1990; Pannunzio et al., 2008). L'invasion de brin n'étant pas une étape dans ce processus, le SSA est indépendant de Rad51, Rad54, Rad55 et Rad57 ; il est même favorisé en absence de ces derniers (Ivanov et al., 1996; Sugawara et al., 2000). En revanche, il est exclusivement dépendant de Rad52 avec l'aide de Rad59 (Bai and Symington, 1996; Sugawara and Haber, 1992).

Une fois l'appariement accompli par Rad52-Rad59, les brins 3' non complémentaires flottants sont clivés par les nucléases du complexe Rad1-Rad10 ou Msh2-Msh3 (Ivanov and

[Haber, 1995](#); [Sugawara et al., 1997](#)). Les brèches simple-brin sont comblées par une synthèse d'ADN suivie d'une ligature.

3. Régulation de la RH au cours du cycle cellulaire

La réparation par la RH n'est pas sollicitée de manière équivalente au cours du cycle cellulaire. En phase G1, l'utilisation de RH est fortement réduite car l'utilisation du chromosome homologue pour la réparation se fait au détriment du polymorphisme génétique (perte d'hétérozygotie). Pour cela, la résection et le recrutement de certains facteurs de la RH (tels que BRCA2) sont inhibée en phase G1 ([Ira et al., 2004](#); [Orthwein et al., 2015](#)). Il est à noter que la RH peut tout de même survenir en G1 ([Fabre, 1978](#)).

La RH est donc préférentiellement sollicitée en phase S/G2 lorsque la chromatide sœur est disponible pour servir de matrice lors de la réparation. Pour autant, ce n'est pas la présence de la chromatide sœur en soi qui active la RH ([Aylon et al., 2004](#); [Fabre, 1978](#)).

La RH est toujours initiée par une résection 5'>3' ; la régulation de la RH est donc fortement liée à la régulation de la résection. Une résection inappropriée en G1 favorise les événements de recombinaison ectopique et le Alt-NHEJ ([Daley et al., 2015](#)). L'expression et l'activité des facteurs de la résection sont régulées au cours du cycle cellulaire. En phase G1, la résection est réduite du fait de la faible activité de CDK et de la fixation de Ku sur les extrémités des CDBs. Chez *S. cerevisiae*, l'élimination de Ku ou l'activation de CDK en phase G1 permettent à Mre11 d'initier la résection des CDBs ([Mathiasen and Lisby, 2014](#)).

Plusieurs acteurs de la résection, initiale et extensive, sont la cible d'une phosphorylation par CDK. De ce fait, CDK joue un rôle important dans la régulation des mécanismes de réparation ([Aylon et al., 2004](#); [Ira et al., 2004](#)). Chez l'homme, Nbs1 est impliquée dans la RH et le NHEJ ; sa phosphorylation par CDK promeut la résection et favorise la réparation par la RH ([Falck et al., 2012](#)). Sae2 et CtIP sont constitutivement exprimées mais leur activation se produit essentiellement en phase S durant laquelle elles sont phosphorylées. CDK induit la

phosphorylation de Sae2/CtIP sur les résidus S267/T847, stimulant ainsi la résection des CDBs (Huertas and Jackson, 2009; Huertas et al., 2008).

De la même manière, Dna2 n'est pas active en phase G1. Sa phosphorylation par CDK permet son recrutement sur les CDBs et la mise en place de la voie Sgs1-Dna2. Chez l'homme, la phosphorylation de Exo1 par CDK en phases S et G2 favorise son recrutement et par conséquent la résection (Tomimatsu et al., 2014). Chez les levures, aucune phosphorylation de Exo1 par CDK n'a été décrite.

4. La recombinaison homologue, une source de mutations

La recombinaison homologue est un processus important dans la vie d'une cellule ; son absence est associée à des défauts de croissance chez les eucaryotes unicellulaires et à une létalité chez certains métazoaires. La RH est perçue comme étant un mécanisme de réparation fidèle et conservatif. L'utilisation de la chromatide sœur favorise l'occurrence d'événements génétiquement silencieux. Cependant, la matrice homologue ne correspond pas toujours à la chromatide sœur (Figure 26). En effet, la recombinaison peut se produire entre les deux allèles portés sur les chromosomes homologues (recombinaison inter-allélique). Dans ce cas de figure, le DSBR, le SDSA et le BIR peuvent générer une perte d'hétérozygotie *via* la conversion génique qui peut se limiter à la région avoisinant la CDB. Dans le cas du BIR, l'ampleur de la conversion génique s'étend sur tout le chromosome à partir du point de cassure. Il s'avère que l'accumulation de ces intermédiaires est toxique pour la cellule incapable de les résoudre (Elango et al., 2017; Gangloff et al., 2000).

La recombinaison survient également entre des régions non-alléliques, qui souvent correspondent à des répétitions en tandem ou dispersées. Les produits de ce type de recombinaison sont très hétérogènes allant de la simple perte d'hétérozygotie aux réarrangements complexes du génome (Figure 26) (Purandare and Patel, 1997). En somme, l'utilisation d'une séquence homologue pour la réparation n'est pas sans conséquence, d'autant plus que cela implique une synthèse d'ADN accroissant les probabilités de mutations.

En effet, la synthèse d'ADN associée à la RH est mutagène quel que soit le mode opératoire de la réparation, DSBR, SDSA ou BIR (Deem et al., 2011; Saini et al., 2013; Strathern et al., 1995). Le SDSA qui est considéré comme la voie de réparation la plus fidèle, génère un taux élevé de mutations, dû à des erreurs produites par les polymérase δ et ϵ (Hicks et al., 2010).

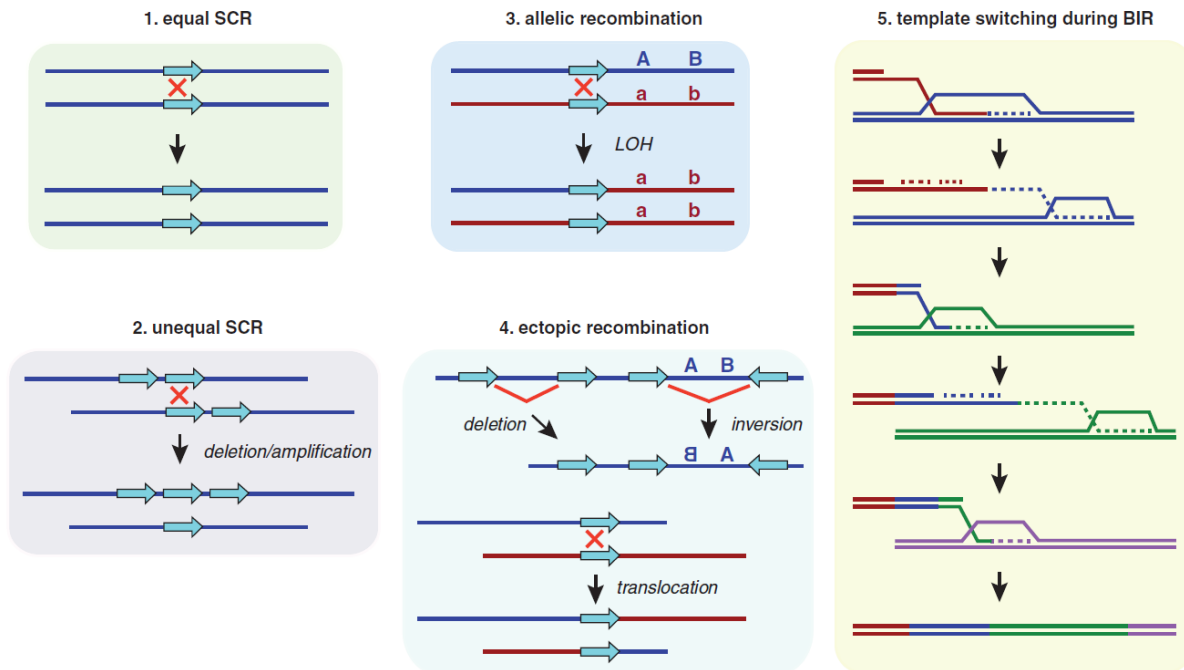


Figure 26 : Mécanismes par lesquels la recombinaison homologue peut être mutagène. (1) La RH est un mécanisme conservatif lorsque la séquence de la chromatide sœur est utilisée comme matrice pour la réparation (SCR, Sister Chromatid Recombinaison). Dans le cas contraire, la RH peut générer de l'instabilité génétique en fonction de la séquence utilisée comme matrice. (2) La recombinaison inégale entre deux chromatides sœurs génère une amplification sur un chromosome et une délétion sur l'autre. (3) La recombinaison entre deux chromosomes homologues (recombinaison allélique) est synonyme d'une perte d'hétérozygotie. (4) La recombinaison ectopique ou non-allélique (i.e. la séquence matrice ne correspond ni à la chromatide sœur, ni au chromosome homologue) conduit à la formation de délétions, inversions ou translocations en fonction de la localisation du duplexe homologue. (5) Durant le BIR, le brin envahissant peut connaître plusieurs cycles d'invasion/synthèse/dissociation. De plus, la synthèse de l'ADN au cours du BIR est plus mutagène qu'au cours d'une réplication classique. D'après Prado, 2014.

III. Réplication de l'ADN et stress réplcatif

La vie d'une cellule est régie par des cycles de réplication et de mitose au cours desquels le matériel génétique est dupliqué avant d'être réparti entre les deux cellules filles. De ce fait, la transmission de l'information génétique requiert une duplication fidèle des chromosomes en phase S et leur correcte ségrégation en mitose (phase M). Ces deux phases, avec les phases G1 et G2 qui les séparent, constituent le cycle cellulaire ([Blow and Tanaka, 2005](#)).

Au cours de la phase S, l'ADN est répliqué une seule fois à partir de régions définies comme étant des origines de réplication. Les bactéries en possèdent généralement une seule pour répliquer leur chromosome circulaire. Les chromosomes eucaryotes sont trop grands pour être répliqués à partir d'une seule origine de réplication. Ainsi, chaque chromosome possède plusieurs origines, et même plus qu'il n'en faut, pour leur réplication. L'activation des origines est orchestrée par un programme spatiotemporel. L'efficacité d'activation des origines est variable et seule une partie des origines est effectivement activée au cours d'une phase S ([Fragkos et al., 2015](#)).

Une fois activée, une origine de réplication donne naissance à deux fourches de réplication progressant de façon bidirectionnelle. Chaque fourche progresse grâce au réplisome (ou machinerie de la réplication) jusqu'à ce qu'elle rencontre une autre fourche arrivant en sa direction. Cette convergence de fourches se produit au niveau de sites de terminaison de la réplication. Ces sites sont répartis plutôt aléatoirement dans les génomes eucaryotes. Par contre, chez *E. coli*, la terminaison se produit au niveau de sites spécifiques appelés *Ter* ([Dewar and Walter, 2017](#)).

La section qui suit est consacrée au processus de la réplication de l'ADN. Elle est suivie d'une deuxième section qui s'intéresse aux facteurs perturbant le déroulement de ce processus qui s'avère être aussi fragile que robuste.

1. Réplication de l'ADN

La réplication de l'ADN génomique est le prélude de chaque division cellulaire. La réplication constitue pour les cellules une étape complexe, hautement contrôlée et dont la fidélité assure la stabilité des génomes. Quelle que soit la nature de l'ADN à répliquer, la réplication est toujours initiée à partir d'origines de réplication qui jalonnent les chromosomes. Les régions où se localisent ces origines sont souvent caractérisées par une tendance à exclure les nucléosomes (Eaton et al., 2010; Lubelsky et al., 2011). Les origines de réplication ont été extensivement étudiées chez *S. cerevisiae* et sont définies par des séquences spécifiques relativement courtes (allant de 100 à 200pb) appelées ARS (pour *Autonomously Replicating Sequences*) (Xu et al., 2006). Chez *S. pombe* et les mammifères, les origines ne sont pas aussi bien caractérisées que chez *S. cerevisiae*. Les séquences définissant ces origines semblent être riches en A-T chez *S. pombe* et se positionnent souvent près des îlots CpG chez les mammifères (Cadoret et al., 2008; Delgado et al., 1998; Segurado et al., 2003). Contrairement à *S. cerevisiae*, ces origines s'étendent sur de plus grandes régions (0,5 à 1kb chez *S. pombe* et 0,5 à 50kb chez les mammifères) sans qu'une séquence consensus ait pu être mise en évidence à ce jour (Vashee et al., 2003).

Chez tous les eucaryotes, plusieurs origines sont réparties le long des chromosomes mais seules certaines sont activées au cours de la réplication. Tandis que l'activation de l'ensemble des origines de réplication conduirait à un épuisement en facteurs de réplication, l'excès en origines de réplication constitue un réservoir d'origines potentiellement sollicitées en cas de problèmes au cours de la réplication (Brambati et al., 2018; Doksani et al., 2009; Ge et al., 2007; Kawabata et al., 2011; Woodward et al., 2006).

Les origines de réplication sont reconnues par le complexe ORC en fin de mitose et en G1 et seule une partie des origines est effectivement activée en phase S (*origin firing*) (Fragkos et al., 2015) (Figure 27). L'activation des origines survient en phase S et se fait de manière séquentielle et régulée dans le temps et l'espace (Fragkos et al., 2015; Taylor, 1960). La réplication suit trois étapes définies comme suit : initiation, élongation et terminaison (Figure 27). Un joueur central impliqué dans ces trois étapes est représenté par l'hélicase répliquative

CMG (Cdc45-Mcm2-7-GINS). Pendant longtemps l'identité de l'hélicase répliquative a été controversée. *In vitro*, le complexe CMG possède une forte activité hélicase (Moyer et al., 2006). Cela dit, depuis la mise en évidence des protéines Mcm chez *S. cerevisiae* en 1984 (Maine et al., 1984), l'activité hélicase des protéines du complexe MCM fut difficile à prouver. A part une faible activité portée par le complexe Mcm4-6-7, presque aucune activité de déroulement de la double hélice par les protéines du complexe n'a pu être observée *in vitro* (Ishimi, 1997). Ce n'est qu'en 2008 qu'une activité hélicase du complexe Mcm2-7 a été prouvée *in vitro* (Bochman and Schwacha, 2008).

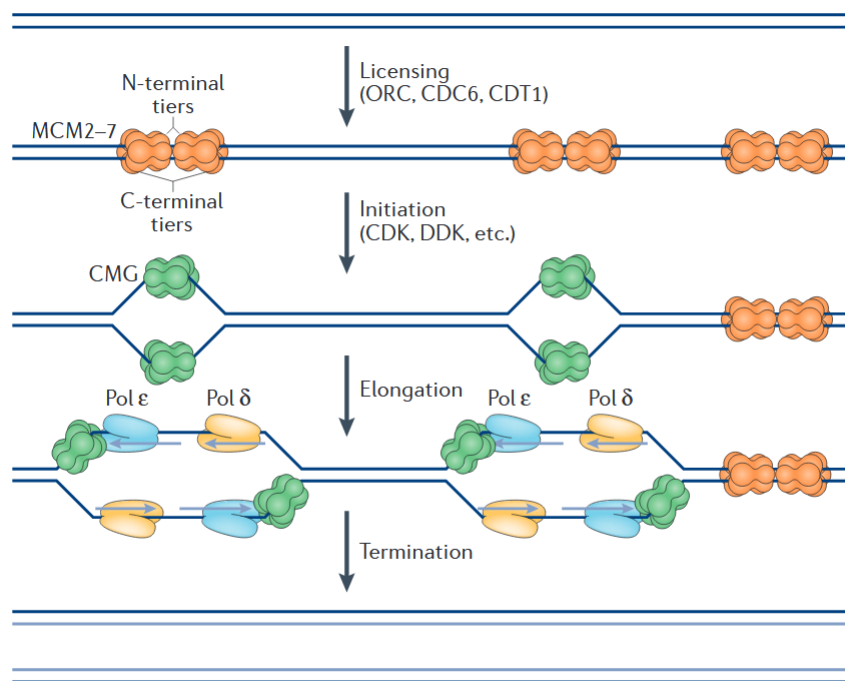


Figure 27 : Etapes principales de la réplication chez les eucaryotes. D'après Dewar and Walter, 2017.

1.1. Initiation

La réplication de l'ADN commence par l'assemblage des complexes pre-RCs (formés de ORC, Cdc6, Cdt1-Mcm9 et Mcm2-7) sur les origines de réplication durant la phase G1 du cycle cellulaire (*origin licensing*). D'abord, le complexe ORC (hexamère composé des protéines Orc1 à 6) reconnaît les origines de réplication sur lesquelles il reste fixé durant tout le cycle cellulaire. En phase G1, Cdc6, Cdt1 et Mcm9 fixent le complexe ORC et stimulent le

recrutement de deux complexes Mcm2-7 (l'hélicase est inactive à ce stade) (Lutzmann and Méchali, 2008; Truong and Wu, 2011). Le complexe pre-RC est ainsi formé et les origines sont dites autorisées ou « *licensed* ». A la transition G1/S le complexe pre-RC est converti en complexe pre-IC (pour *pre-Initiation Complex*) via l'action des protéines kinases DDK (pour *Dbf4-Dependant Kinase*, ou Dbf4-Cdc7) et CDK (Labib, 2010; Zou and Stillman, 1998, 2000). A ce moment-là, l'activation des origines culmine lorsque les hélicases répliquatives (CMG) sont activées et le réplisome est formé. Comme mentionné plus haut, Mcm2-7 représente le cœur catalytique du complexe CMG mais son activité hélicase requiert absolument la présence de Cdc45 et GINS (Moyer et al., 2006). Une fois l'origine activée, le recrutement de RPA, de la polymérase α , du complexe RFC (pour *Replication Factor C*), de PCNA et de la polymérase δ permet l'initiation de la réplication. La fixation de RPA sur l'ADNsb, inhérent à l'ouverture de la double hélice et à la progression des fourches, permet de le stabiliser et de prévenir la formation de structures secondaires inhibitrices de la progression des ADN polymérases (Fragkos et al., 2015).

Le défi lors de la réplication est d'assurer un seul cycle de réplication et d'éviter les phénomènes de re-réplication. Cela passe par la régulation de la formation du complexe pre-RC par CDK et par l'action de Geminin qui interagit avec Cdt1 et inhibe la reformation du complexe pre-RC après le recrutement de Mcm2-7 (Diffley, 1996; Lutzmann et al., 2006; Wu et al., 2014). Grâce à ces mécanismes (et d'autres non cités), une origine de réplication connaîtra au mieux une seule activation au cours d'un cycle cellulaire (Fragkos et al., 2015; Truong and Wu, 2011).

1.2. Elongation

L'activation des CMGs permet l'ouverture de la double hélice d'ADN et la formation d'une bulle de réplication à partir de laquelle deux fourches de réplication, qui progressent de façon bidirectionnelle, émergent. Après l'initiation de la réplication, les CMGs voyagent avec les fourches de réplication (sur l'ADNsb générant le brin continu) et dirigent la progression de la réplication (Fu et al., 2011; Ishimi, 1997). L'ADN est dupliqué de manière semi-conservative. La nature antiparallèle des brins d'ADN d'une double hélice et la directionnalité des ADN

polymérase font que les deux brins néosynthétisés sont synthétisés différemment. La synthèse du brin précoce suit la même direction que la progression de la fourche et se fait de manière continue. Le brin tardif est synthétisé de façon discontinue en formant de courts fragments d'Okazaki qui seront ligaturés par la suite pour former un brin continu (Balakrishnan and Bambara, 2013). Trois polymérases principales sont impliquées dans la synthèse des nouveaux brins. La primase amorce la synthèse en générant un court fragment d'ARN à partir duquel Pol α synthétise l'ADN sur de courtes distances. Cette synthèse est nécessaire à l'activation de polymérases répliquatives plus processives. Ces polymérases, représentées par Pol δ et Pol ϵ , sont très conservées chez les eucaryotes (Burgers, 2009; Miyabe et al., 2011). Pol δ synthétise généralement le brin tardif (discontinu) et Pol ϵ étend la synthèse du brin précoce (continu). L'organisation du réplisome présente une certaine plasticité car : (i) le rôle essentiel de Pol ϵ au cours de la réplication semble être indépendant de son activité catalytique (Kesti et al., 1999) ; et (ii) Pol δ peut synthétiser le brin précoce dans certaines conditions (Prelich and Stillman, 1988; Yeeles et al., 2017).

La processivité des polymérases répliquatives requiert la présence de PCNA. PCNA agit sous forme de trimère dont la structure en anneau lui permet d'entourer et de coulisser le long du brin d'ADN qu'il fixe, ce qui lui vaut sa qualification de « clamp coulissant ». Le recrutement de PCNA sur l'ADN nécessite l'intervention de son complexe de chargement (ou *clamp loader*) RFC. Il est à noter que PCNA montre des effets différentiels sur les polymérases. D'un côté, PCNA stimule fortement la processivité de Pol δ et maximise celle de Pol ϵ (Devbhandari et al., 2017; Prelich and Stillman, 1988; Yeeles et al., 2017). De l'autre, RFC-PCNA limitent les activités de Pol α sur les brins précoces et tardifs chez *S. cerevisiae in vitro* (Devbhandari et al., 2017).

1.3. Terminaison

La réplication s'achève lorsque : (i) les fourches de réplication convergentes fusionnent, (ii) le réplisome se dissocie et (iii) les tensions topologiques accumulées entre les chromatides sœurs sont éliminées (décaténation) (Figure 28). Ce processus, dit de terminaison, a représenté pendant longtemps une étape énigmatique de la réplication. Toutefois, une

avancée majeure dans le monde de la réplication a été possible grâce à des travaux menés ces quatre dernières années. Ces travaux ont mis en évidence les évènements moléculaires survenant durant les étapes finales de la réplication. Cela a permis d'apporter un éclairage considérable en ce qui concerne le mécanisme de la terminaison (Figure 28). En 2014, l'identification des enzymes impliquées dans le désassemblage des CMGs a représenté un pas important dans l'établissement des premiers modèles élaborés de la terminaison. Il a été montré que la dissociation du réplisome repose essentiellement sur le désassemblage des hélicases répliquatives (CMG) par Cdc48/p97 suite à l'ubiquitination de Mcm7 (Lengronne and Pasero, 2014; Maric et al., 2014; Moreno et al., 2014). Les E3 ubiquitine ligases responsables de cette modification ont été identifiées récemment. Il s'agit de SFC(Dia2) chez *S. cerevisiae* et de CRL2^{Lrr1} chez les vertébrés (Figure 28e) (Dewar et al., 2017; Maculins et al., 2015; Maric et al., 2014). De manière intéressante, le déchargement des CMGs est un des derniers évènements caractérisant la terminaison de la réplication. En effet, du fait de la fixation préférentielle des CMGs sur le brin parental précoce, les CMGs convergentes se croisent, ne s'entrechoquent pas et continuent leur progression le long de l'ADNdb du fragment d'Okazaki de la fourche opposée (sans procéder à l'ouverture de la double hélice) (Dewar et al., 2015). Ce mécanisme observé chez le Xénope suggère que l'ubiquitination de Mcm7 se produit lorsque le complexe CMG encercle l'ADNdb sur la fourche opposée. Toutefois, la question reste posée quant au mécanisme sous-tendant la reconnaissance des hélicases en phase de terminaison. Il n'est pas exclu que la nature de l'ADN (simple- ou double-brin) fixé par le complexe CMG oriente vers le maintien ou la dissociation du complexe (Dewar and Walter, 2017).

L'étape de terminaison s'accompagne d'une libération des contraintes topologiques générées par l'ouverture de la double hélice. Ces contraintes sont surmontées grâce à l'action des topoisomérases. La dissipation des torsions s'opère également *via* la rotation des fourches de réplication en cours d'élongation. Il en résulte des enchevêtrements de chromatides sœurs, appelés également caténanes ou SCI (pour *Sister Chromatid Intertwines*), maintenus par des cohésines et résolus par la topoisomérase II en phase S (Baxter and Diffley, 2008; Mariezcurrena and Uhlmann, 2017). Un défaut de résolution de ces structures perturbe le

processus de terminaison de la réplication et est une source d'instabilité génétique (Baxter and Diffley, 2008; Charbin et al., 2014).

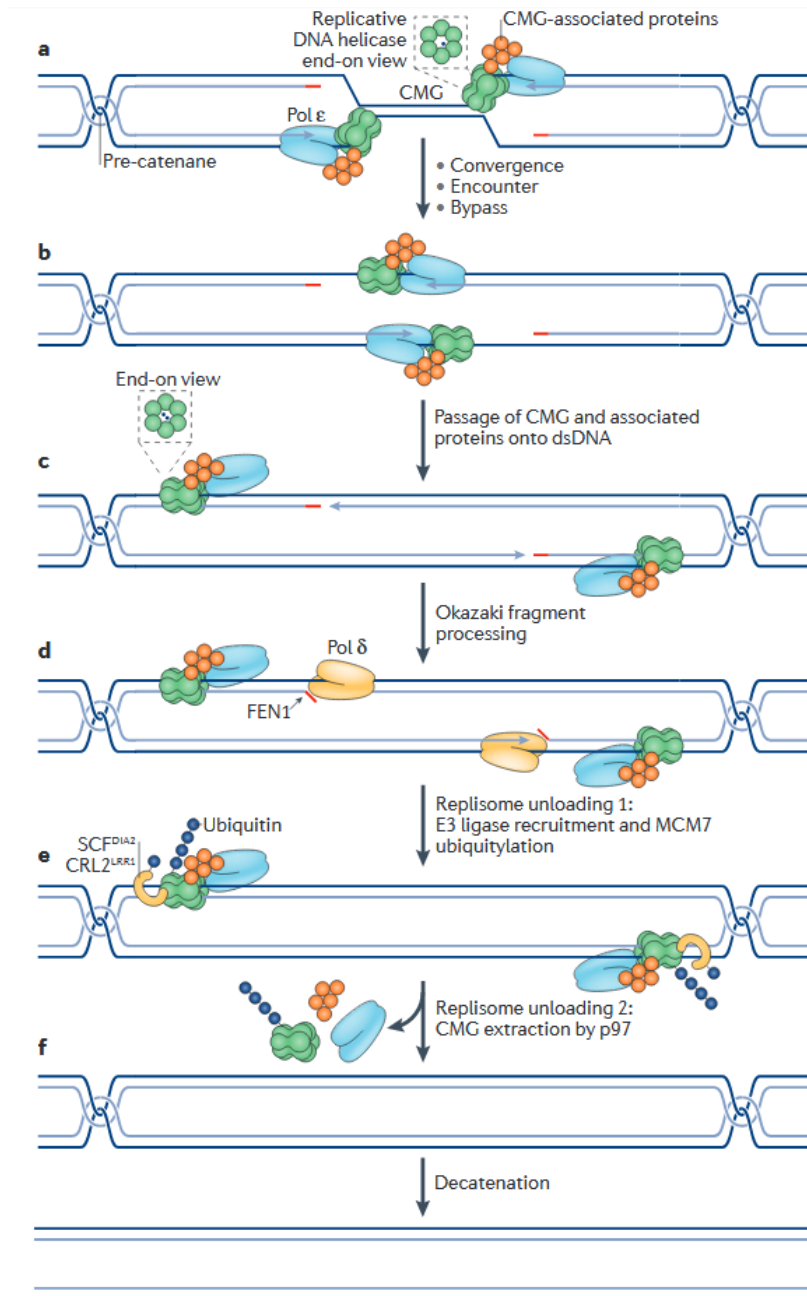


Figure 28: Modèle de la terminaison de la réplication chez les eucaryotes. (a) La progression des fourches convergentes génère des super-tours au niveau de l'ADN non répliqué. Le stress topologique ainsi généré est absorbé par la formation de pré-caténanes. **(b)** Rencontre des CMGs et passage sur la fourche opposée. **(c)** Les CMGs continuent à progresser jusqu'à traverser la jonction ADNs_b-ADN_{db} du fragment d'Okazaki en aval. **(d)** Maturation des fragments d'Okazaki. **(e)** Une fois que les CMGs encerclent l'ADN_{db}, la sous-unité MCM7 est ubiquitinylée par SCF^{DIA2} (pour Skp, Cullin, F-box-containing complex associated with DIA2) ou CRL2^{LRR1} (pour Cullin RING ligase 2 associated with LRR1). MCM7 ubiquitinylée est ainsi extraite de la chromatine par l'ATPase p97. **(f)** Les caténanes sont éliminées. D'après Dewar and Walter, 2017.

2. Le stress réplicatif

Le défi pour chaque cellule en prolifération est de maintenir la stabilité de son génome en garantissant une duplication fidèle des chromosomes et leur correcte ségrégation en mitose. Comme nous venons de le voir, la réplication du génome est un processus assez bien orchestré. Cependant, une fois mis sur les rails, le réplisome doit faire face à différents facteurs menaçant sa progression. Cela m'amène à introduire la notion de « stress réplicatif ».

De nombreuses définitions du stress réplicatif existent. Je choisis de donner celle-ci: le stress réplicatif peut être défini comme tout évènement perturbant la réalisation du programme spatiotemporel de la réplication.

Les cellules expérimentant un stress réplicatif voient la progression de leurs fourches altérée, la fidélité de duplication de leurs génomes menacée, la ségrégation de leurs chromosomes compromise et un climat d'instabilité génomique s'installer (Figure 29). C'est ainsi que le stress réplicatif a émergé comme une source majeure d'instabilité des génomes dans la biologie des cancers (Gaillard et al., 2015). En effet, au cours des stades précoces du développement tumoral, les cellules souffrent de stress réplicatif chronique à l'origine des altérations de l'ADN et de l'évolution tumorale (Bakhoun et al., 2018; Bester et al., 2011; Burrell et al., 2013; Gorgoulis et al., 2005). Avant d'arriver à des stades où le stress réplicatif crée des situations pathologiques, les cellules déploient plusieurs mécanismes qui prennent en charge les fourches de réplication entravées afin de tamponner les effets délétères de ce stress (Figure 29).

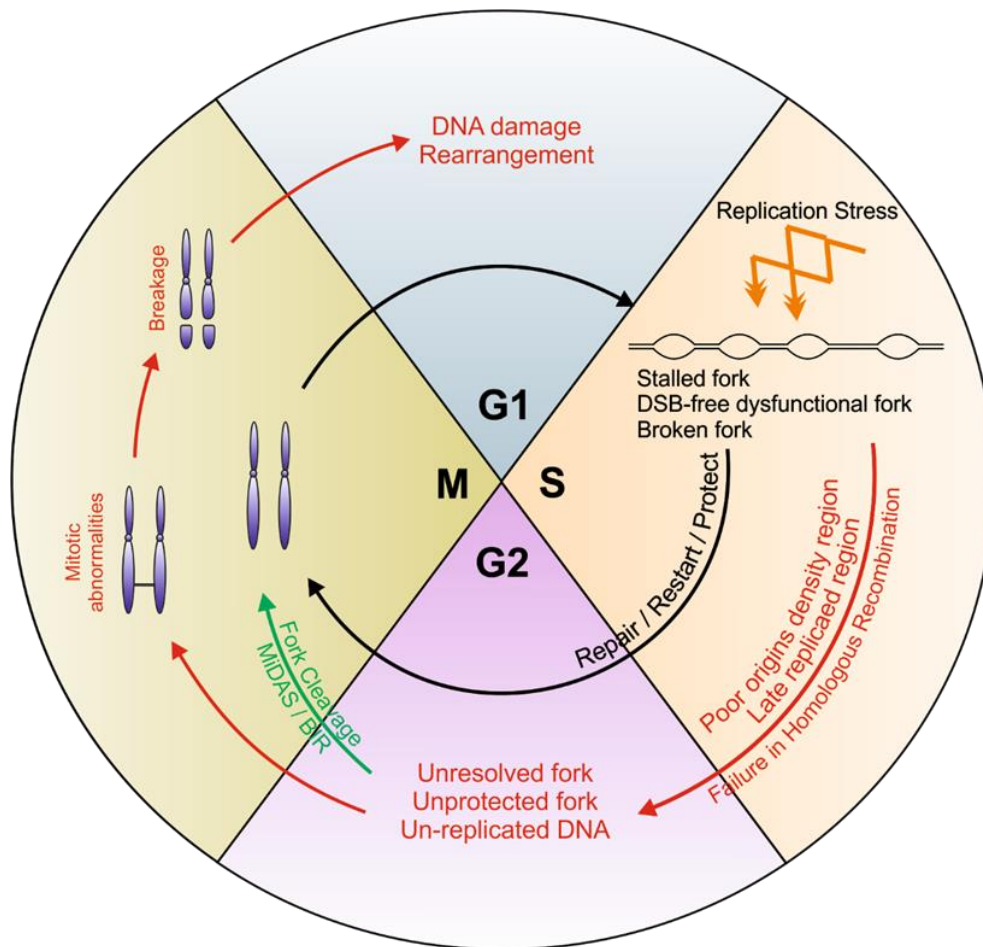


Figure 29 : Voies prévenant l'instabilité génomique en réponse au stress répliatif. Les fourches de répliation dont la progression est altérée sont prises en charge par des mécanismes orchestrant leur réparation, redémarrage ou protection afin d'achever la répliation. Les intermédiaires de répliation/recombinaison non résolus peuvent être pris en charge par des mécanismes de réparation tardifs en G2/M (MiDAS/BIR). L'absence de ces deux voies de sauvetage de fourche en phase S et en G2/M conduit les cellules à entrer en mitose avec des intermédiaires de répliation/recombinaison anormaux qui génèrent des défauts de ségrégation et des cassures en mitose transmissibles au cycle cellulaire suivant.

La présence d'un stress répliatif se traduit au niveau des fourches de répliation par le ralentissement ou l'arrêt de leur progression. Dans ces situations on distingue deux types de fourches : fourche en pause ou *stalled fork* et fourche dysfonctionnelle ou *collapsed fork*. La distinction entre ces deux états (*stalled* versus *collapsed*) n'est pas claire et les définitions qui leur sont attribuées restent peu informatives quant à la structure des fourches. La définition la plus simple semble être leur compétence à reprendre la répliation. Une fourche en pause est définie par sa capacité à reprendre la répliation une fois l'obstacle levé car l'intégrité du réplisome est maintenue grâce au checkpoint de la phase S ou DRC (pour *DNA Replication*

Checkpoint) (Chanoux et al., 2009; Cobb et al., 2003; Colosio et al., 2016; Cotta-Ramusino et al., 2005; De Piccoli et al., 2012; Lopes et al., 2001; Segurado and Diffley, 2008). Au contraire, une fourche de réplication dysfonctionnelle perd sa compétence de réplication. On parle d'effondrement de la fourche. Souvent, le prolongement de l'état de pause d'une fourche la convertit en fourche dysfonctionnelle, associée ou non à une cassure (Cobb et al., 2003; Cortez, 2015; Lopes et al., 2001; Petermann et al., 2010). Dans cette situation, le blocage est irréversible et nécessite l'intervention des voies de la réparation pour relancer la réplication (Figure 29). Des hélicases et des facteurs de la réparation préservent l'intégrité de ces fourches afin de faciliter leur fusion avec une fourche convergente ou d'exécuter leur redémarrage ou leur réparation par des mécanismes tels que la RH. La prise en charge de ces fourches s'accompagne souvent d'un remodelage de leur structure par des hélicases/translocases et/ou des nucléases (cf. 2.2 de ce chapitre).

Le but des transactions moléculaires qui s'opèrent aux fourches de réplication altérées est de garantir l'achèvement de la phase S et l'entrée en mitose avec un ADN complètement répliqué. Une dérégulation du processus de la réplication peut conduire à l'accumulation d'intermédiaires de réplication (IRs) inhabituels et/ou qui persistent jusqu'en G2. Les cellules se donnent une dernière chance pour résoudre ces IRs avant d'entrer en mitose en invoquant des mécanismes tels que le BIR en phase G2/M (cf. 3.1 de ce chapitre) (Figure 29). Par contre, l'entrée en mitose avec ce type d'intermédiaires compromet la ségrégation fidèle des chromosomes et engendre différentes aberrations mitotiques (cf. 3 de ce chapitre) potentiellement transmissibles aux cycles cellulaires suivants (Figure 29).

Dans la suite de cette section je donnerai, brièvement, quelques exemples de sources du stress réplicatif avant d'introduire deux points essentiels reliés à l'objet de mon projet de thèse : (i) les événements impliqués dans le remodelage et la réactivation des fourches de réplication en réponse au stress réplicatif et (ii) les conséquences que peut avoir le stress réplicatif sur la mitose lorsqu'il est mal géré. En ce qui concerne les mécanismes qui permettent de prendre en charge les fourches de réplication bloquées, les fonctions répliquatives de la RH sont détaillées dans le chapitre suivant.

2.1. Sources du stress réplicatif

Le stress réplicatif peut être d'origine endogène ou exogène et affecter la dynamique de réplication de façon locale ou sur l'ensemble du génome.

Une carence en facteurs de réplication peut conduire à un ralentissement des fourches de réplication. De même, une carence en origines de réplication est une source de stress réplicatif. La progression des fourches de réplication peut être entravée par différents obstacles naturels appelés RFB (pour *Replication Fork Barrier*). Certaines de ces barrières sont programmées (telles que les sites de pause au niveau du *rDNA* chez les eucaryotes), mais la majorité est accidentelle et résulte du métabolisme cellulaire. Par exemple, la progression de la machinerie de réplication peut être altérée par : (i) une rencontre infortunée avec des complexes protéiques fortement liés à l'ADN, (ii) la présence de bases endommagées, de brèches simple-brin ou de structures secondaires telles que les G quartettes (G4), ou encore (iii) des interférences avec la machinerie de transcription et la formation d'hybrides ADN/ARN (R-loop), une structure décrite comme promotrice de l'instabilité des génomes (Bester et al., 2011; Kawabata et al., 2011; Lambert and Carr, 2013a, 2013b; Poli et al., 2012; Técher et al., 2017). Il s'avère qu'une source endogène de stress réplicatif est représentée par l'activation d'oncogènes, on parle d'OIS (pour *Oncogenes-Induced Replication Stress*) (Dominguez-Sola et al., 2007; Gorgoulis et al., 2005; Jones et al., 2013; Neelsen et al., 2013; Sotiriou et al., 2016). Une des caractéristiques des cellules subissant un OIS est la présence d'une instabilité génomique préférentiellement retrouvée au niveau des régions chromosomiques appelées CFSs (pour *Common Fragile Site*) (Negrini et al., 2010).

Parmi les sources de stress réplicatif exogènes on retrouve généralement des agents génotoxiques souvent utilisés en chimiothérapie. Comme mentionné précédemment ces drogues sont connues pour induire des CDBs. Toutefois, en fonction des doses utilisées, ces agents peuvent induire un stress réplicatif qui se manifeste par un ralentissement des fourches de réplication et leur réversion (voir section suivante) non accompagné de CDBs (Ray Chaudhuri et al., 2012; Zellweger et al., 2015). C'est le cas lorsque des doses sub-létales de

CPT et de MMS, parmi d'autres, sont utilisées pour induire un stress réplicatif ([Ray Chaudhuri et al., 2012](#); [Zellweger et al., 2015](#)).

Dans les travaux que je présente, le stress réplicatif est induit au niveau d'une RFB où la fourche de réplication est bloquée lorsqu'elle se heurte à la présence d'un complexe protéique fortement fixé à sa séquence (cf. chapitre VI).

2.2. Prise en charge des fourches de réplication bloquées

Le sauvetage des fourches de réplication arrêtées fait intervenir deux options en compétition. La première option repose sur l'arrivée de la fourche convergente qui fusionne avec la fourche bloquée. La seconde option repose sur la reprise de la réplication *via* différents mécanismes permettant, entre autres, la réparation et le redémarrage des fourches endommagées ou dysfonctionnelles ([Blow et al., 2011](#); [Ge et al., 2007](#); [Ibarra et al., 2008](#); [Kawabata et al., 2011](#); [Mayle et al., 2015](#); [Woodward et al., 2006](#); [Yeeles et al., 2013](#)).

Chez *E. coli*, la présence d'une seule origine de réplication (*oriC*) et d'un seul site de terminaison rend les événements de blocage de fourches létaux en absence de mécanismes de réactivation. L'activation d'autres origines et l'arrivée de la fourche opposée étant impossibles chez cet organisme, l'achèvement de la réplication repose sur la capacité des cellules à éliminer l'obstacle, réparer la fourche et réassembler le réplisome ([Windgassen et al., 2018](#)).

Chez les mammifères, l'excès en origines de réplication joue un rôle important dans le sauvetage des fourches de réplication bloquées ([Ge et al., 2007](#); [Ibarra et al., 2008](#); [Kawabata et al., 2011](#); [Woodward et al., 2006](#)). La convergence de fourche peut même s'opérer une fois que le redémarrage de fourche a été amorcé ([Nguyen et al., 2015](#)). Cependant, certaines situations imposent à la cellule de faire appel à des mécanismes de redémarrage car la convergence de fourche est limitée. On peut citer les régions pauvres en origines de réplication (représentées typiquement par les CFSs), les régions télomériques où la réplication

est unidirectionnelle ou encore les régions où les deux fourches convergentes sont bloquées (Lambert and Carr, 2005; Letessier et al., 2011; Le Tallec et al., 2011).

Une fourche de réplication bloquée subit différents remodelages avant de pouvoir devenir apte à reprendre la réplication. Par exemple, la réversion de fourche (passage d'une structure à trois branches à une structure à quatre branches suite à la régression de la fourche) a été décrite chez *E. coli* comme un processus important pour la reformation d'un replisome fonctionnel (Michel et al., 2007; de Septenville et al., 2012). Les fourches de réplication dysfonctionnelles, réversées ou non, sont la cible de la machinerie de résection (Colosio et al., 2016; Cotta-Ramusino et al., 2005; Hu et al., 2012; Tsang et al., 2014).

2.2.1. Réversion des fourches de réplication

La conversion de la fourche de réplication en fourche réversée est due à la ré-hybridation des brins parentaux et l'hybridation des brins néosynthétisés. Il en résulte une structure à 4 branches ressemblant à la jonction de Holliday et surnommée « *chicken foot* » (Figure 30). Ce phénomène peut se produire : (i) passivement *via* des contraintes topologiques favorisant le retour en arrière de la fourche de réplication, (ii) spontanément lorsque la fourche de réplication pause au niveau de séquences d'ADNs répétées, ou (iii) résulter de l'action de translocases/hélicases remodelant la structure de la fourche (Atkinson and McGlynn, 2009; Follonier et al., 2013; Fouché et al., 2006; Nguyen et al., 2017; Postow et al., 2001; Sidorova, 2017). Cette structure a été initialement proposée par Higgins et al., comme étant une voie de contournement et de tolérance de dommages dans les cellules de mammifères (Berti and Vindigni, 2016; Higgins et al., 1976; Neelsen and Lopes, 2015; Vujanovic et al., 2017). D'autres études suggèrent que la réversion de fourche est un intermédiaire de réplication favorisant la stabilisation et le redémarrage de fourche, notamment par la RH (Ahuja et al., 2016; Atkinson and McGlynn, 2009; Berti et al., 2013; Ray Chaudhuri et al., 2012; Zellweger et al., 2015). Il n'est donc pas exclu que la réversion de fourche puisse coordonner différents processus en réponse au stress réplcatif.

Chez *E. coli*, plusieurs facteurs promouvant la réversion de fourche, tels que RecA et RuvAB, ont été identifiés *in vivo* et *in vitro*. La réversion de fourche permet le recrutement de PriA et du primosome afin de réactiver la fourche de réplication (Atkinson and McGlynn, 2009; Courcelle et al., 2003; Michel et al., 2007; de Septenville et al., 2012).

Chez les eucaryotes, la réversion de fourche a été rapportée chez de nombreux organismes en réponse à une multitude de stress réplicatifs exogènes (MMS, CPT, HU) et endogènes (Ahuja et al., 2016; Hu et al., 2012; Lopes et al., 2001; Ray Chaudhuri et al., 2012; Zellweger et al., 2015). Plusieurs modèles suggèrent que la réversion de fourche est une étape critique dans la réparation/redémarrage de fourches de réplication bloquées.

Des travaux chez *S. cerevisiae* indiquent que la réversion de fourche est une forme de fourche dysfonctionnelle et pathologique révélée suite à un traitement à l'hydroxyurée en absence de checkpoints de la réplication (Lopes et al., 2001; Sogo et al., 2002). Chez les levures, une des fonctions du DRC est de prévenir la réversion de fourche en recrutant des nucléases qui vont dégrader des précurseurs de la réversion de fourche (Colosio et al., 2016; Cotta-Ramusino et al., 2005; Hu et al., 2012). Chez *S. pombe*, la kinase effectrice Cds1 cible Dna2 afin de réguler son recrutement au niveau des fourches dysfonctionnelles et de prévenir la réversion de fourche (Hu et al., 2012). Il est à noter que l'apparente absence de réversion de fourches dans les cellules sauvages traitées à l'hydroxyurée pourrait simplement refléter le caractère transitoire et dynamique de ce phénomène et sa rapide résolution (Colosio et al., 2016; Cotta-Ramusino et al., 2005; Lopes et al., 2001; Osborn et al., 2002; Sogo et al., 2002). De plus, il a été rapporté chez *S. cerevisiae* que de faibles doses de CPT induisent la réversion des fourches indépendamment de l'activation du DRC, ce qui contraste avec les contextes pathologiques dans lesquels les fourches réversées ont été observées (Ray Chaudhuri et al., 2012).

De même, la réversion de fourche chez les métazoaires est observée en réponse à de faibles doses d'hydroxyurée, de CPT et de MMS, entre autres (Ray Chaudhuri et al., 2012; Zellweger et al., 2015). La réversion de fourche émerge comme une stratégie générale pour protéger l'intégrité des chromosomes en réplication. Un modèle proposé chez les

mammifères implique l'intervention de RAD51 et FBH1 dont les rôles ont été montrés *in vivo* dans la promotion de la réversion de fourche (Ahuja et al., 2016; Fugger et al., 2015; Zellweger et al., 2015) (Figure 30). Cependant, des études plus récentes montrent que la formation d'un nucléofilament stable de RAD51 n'est pas requise pour promouvoir la réversion de fourche (Kolinjivadi et al., 2017a; Mijic et al., 2017).

Parmi les déterminants moléculaires impliqués dans la réversion de fourche, plusieurs hélicases/translocases ont été identifiées (telles que ZRANB3, SMARCAL1, HTLF, FBH1 et RAD54) (Tableau 3) (Berti et al., 2013; Bugreev et al., 2011; Couch et al., 2013; Gari et al., 2008; Kile et al., 2015; Kolinjivadi et al., 2017a; Taglialatela et al., 2017; Vujanovic et al., 2017). Deux voies de redémarrage à partir de fourches réversées ont été mises en évidence. La première fait intervenir l'hélicase RECQ1 et la seconde implique la nucléase DNA2 avec l'assistance de l'hélicase WRN (Berti et al., 2013; Thangavel et al., 2015) (Figure 30). Toutefois, il n'est pas connu dans quelle mesure la réversion de fourches est un prérequis au redémarrage des fourches.

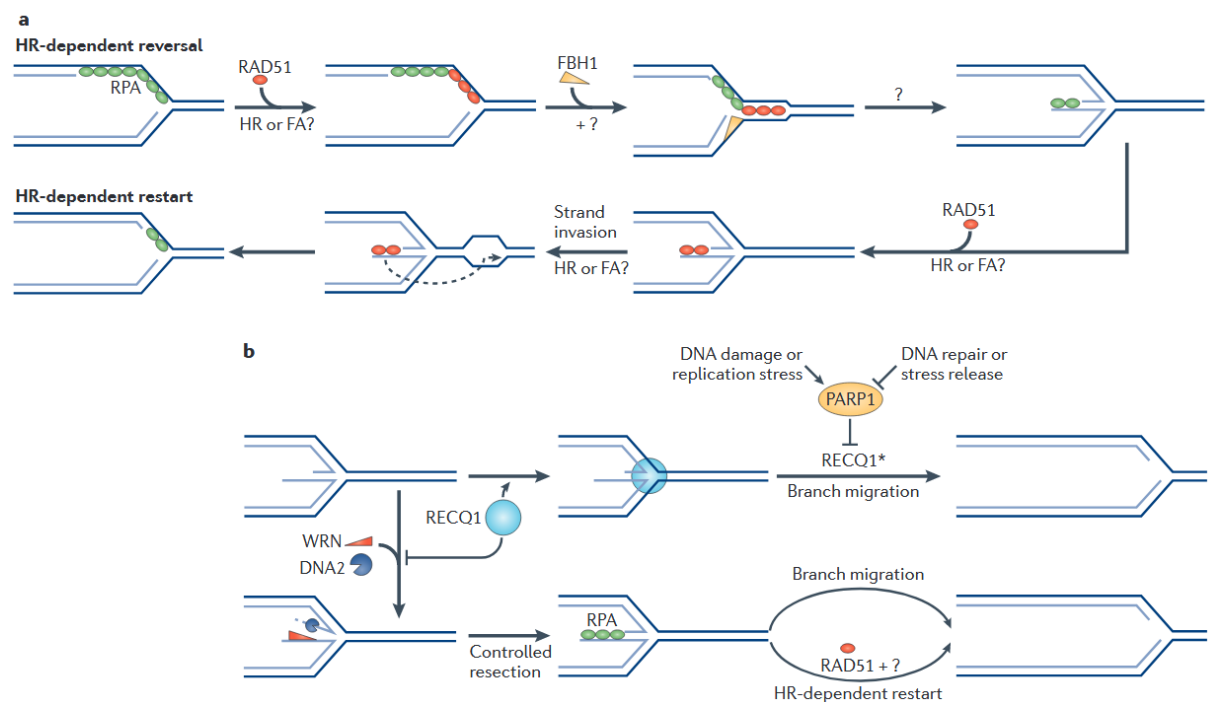


Figure 30 : Mécanismes proposés pour la formation et la prise en charge des fourches réversées chez les mammifères *in vivo*. (a) Implication des facteurs de la RH dans la réversion des fourches et leur redémarrage. (b) Mécanismes de redémarrage des fourches réversées. L'hélicase RECQ1 se fixe à la fourche réversée et initie leur redémarrage via la migration de branche. RECQ1 est transitoirement inhibée par PARP1. Suite à l'inactivation de PARP1, RECQ1 est activée (RECQ1*). La fixation de RECQ1 inhibe la seconde voie de redémarrage de la fourche réversée. Cette seconde voie fait intervenir les activités hélicase et nucléase de WRN et DNA2 respectivement. La

résection du bras réversé permettrait le redémarrage par la RH comme dans (a). D'après Neelsen and Lopes, 2015.

Tableau 3 : Protéines capables d'induire la réversion de fourche et leur restauration après réversion. D'après Sidorova, 2017.

Protéine	Activité enzymatique sur l'ADN	Contribution dans le remodelage de la fourche	Activité sur RAD51
BLM	Hélicase	Réversion/restauration (<i>in vitro</i>)	Stabilisation du filament
FANCM	Hélicase	Réversion (<i>in vitro</i>)	
FBH1	Hélicase	Réversion (<i>in vitro et in vivo</i>)	Dissolution du filament
HTLF	Translocase E3 ubiquitin ligase	Réversion (<i>in vitro et in vivo</i>)	
RAD54	Translocase	Réversion/restauration (migration de branche) (<i>in vitro</i>)	Eviction de RAD51 de l'ADNdb. Stabilisation de RAD51 sur l'ADNsb
RECQ1	Hélicase	Restauration (<i>in vivo</i>)	
SMARCAL1	Hélicase	Réversion/restauration (<i>in vitro et in vivo</i>)	
WRN	Hélicase exonucléase	Migration de branches/restauration (<i>in vitro</i>)	Son absence est associée à une réduction du chargement de RAD51
ZRANB3	Hélicase	Réversion/restauration (<i>in vitro et in vivo</i>)	Dissolution de la D-loop

En l'absence de checkpoints, les fourches réversées sont la cible d'attaques nucléasiques par Mus81 et Slx4, ce qui augmente le nombre de cassures chromosomiques (Couch et al., 2013; Froget et al., 2008; Fu et al., 2015; Neelsen et al., 2013). Il est à noter qu'en présence d'un DRC fonctionnel, les fourches réversées ou non peuvent être également clivées par MUS81 (Fugger et al., 2015; Hanada et al., 2007; Lai et al., 2017; Di Marco et al., 2017; Minocherhomji et al., 2015; Murfuni et al., 2013; Neelsen et al., 2013; Rondinelli et al., 2017; Ying et al., 2013).

Les données récentes concernant la réversion de fourche suggèrent que ce phénomène n'est pas pathologique en soi, mais la régulation des facteurs impliqués dans sa formation et sa résolution est importante pour prévenir les effets délétères associés à la réversion (Kolinjivadi et al., 2017a; Lemaçon et al., 2017; Mijic et al., 2017).

Il n'est pas exclu que le rôle de la réversion en réponse à un blocage de fourche soit sous-estimé. En effet, jusqu'à présent, la réversion de fourche a principalement été étudiée dans un contexte de stress réplicatif global (suite à un traitement génotoxique exogène). Cela ne permet pas de définir quel type de fourche (fonctionnelle ou dysfonctionnelle) est réversée et dans quelle mesure la réversion de fourche est un prérequis au redémarrage. Un autre champ qui reste à explorer concerne le devenir du réplisome suite à la réversion de fourche.

2.2.2. Résection

Plusieurs facteurs impliqués dans la résection des CDBs sont impliqués dans le métabolisme des fourches de réplication et l'activation de ATR (Cotta-Ramusino et al., 2005; Murina et al., 2014; Sasaki and Kobayashi, 2017; Thangavel et al., 2015; Tsang et al., 2014; Wu et al., 2015). La résection des fourches de réplication permet d'exposer un ADNsb sur lequel Rad51 peut se fixer pour amorcer le redémarrage par la RH (Tsang et al., 2014). La résection des fourches peut s'opérer indépendamment de la formation de CDBs (Hashimoto et al., 2010; Kolinjivadi et al., 2017a; Tsang et al., 2014).

L'action de nucléases a souvent été révélée en absence de DRC fonctionnel ou de protection de fourche de réplication (cf. chapitre IV) (Chow and Courcelle, 2004; Cotta-Ramusino et al., 2005; Courcelle et al., 2003; Hashimoto et al., 2010; Higgs et al., 2015; Iannascoli et al., 2015; Karanja et al., 2014; Schlacher et al., 2011). Cela montre que cette étape nécessite un degré de régulation assez élevé pour permettre la réparation/le redémarrage des fourches de réplication perturbées.

Différents acteurs moléculaires agissent en contrecarrant l'action des nucléases aux fourches de réplication. Chez *S. cerevisiae*, Rad53^{CHK2} prévient la dégradation des fourches de réplication par Exo1 dans les cellules traitées à l'hydroxyurée (Cotta-Ramusino et al., 2005; Segurado and Diffley, 2008). Dans le mutant nul *rad53*, Exo1 est impliquée, en collaboration avec Dna2 et Sae2, dans la résection des fourches de réplication réversées afin de limiter leur accumulation (Colosio et al., 2016). Hu et al., ont également montré chez *S. pombe* que l'activité nucléase de Dna2 est requise pour prévenir la réversion des fourches de réplication suite à un traitement à l'hydroxyurée ; cette action de Dna2 est promue par Cds1^{CHK2} (Hu et al., 2012). Chez les mammifères, EXO1 et MRE11 sont impliquées dans la résection extensive des brins néosynthétisés dans les cellules déficientes pour l'activité exonucléase de WRN (Iannascoli et al., 2015). BOLD1 a été identifiée comme un facteur de protection de fourches en prévenant leur dégradation par DNA2. L'absence de BOLD1 confère une sensibilité au stress réplcatif (Higgs et al., 2015). De même, il a été montré que FANCD2 protège les fourches de réplication contre la dégradation par DNA2. La déplétion de DNA2 dans les cellules déficientes pour FANCD2 sauve même leur sensibilité aux pontages inter-brins ou ICLs (pour *Interstrand CrossLink*) induits par le cisplatine (Karanja et al., 2014). BRCA2 et RAD51 limitent également la dégradation extensive des fourches de réplication par MRE11. Ainsi, plusieurs facteurs agissent en limitant l'action d'enzymes spécifiques aux fourches et constituent le « protectosome » (Higgs and Stewart, 2016).

Les travaux accomplis récemment, incluant ceux présentés dans Teixeira et al., 2017 (voir partie résultats), soutiennent que la réversion des fourches de réplication fournit un point d'entrée aux nucléases *via* la génération d'une extrémité double-brin (Couch et al., 2013; Kolinjivadi et al., 2017b; Lemaçon et al., 2017). Les travaux de Thangavel et al., ont montré

que DNA2 cible les fourches réversées afin d'amorcer leur redémarrage (Thangavel et al., 2015). L'inhibition de ATR favorise la réversion des fourches dysfonctionnelles médiée par SMARCAL1 et leur clivage par SLX4. Les fourches dysfonctionnelles ainsi clivées sont dégradées par CtIP (Couch et al., 2013). En parallèle, il a été montré que l'intervention de CtIP et MRE11 au niveau des fourches dysfonctionnelles cassées est nécessaire afin de s'affranchir de la fixation de Ku (Chanut et al., 2016).

Chez *S. pombe*, il a été montré que MRN (indépendamment de l'activité nucléase de Mre11) et Exo1 participent à la formation de l'ADNsb au niveau des fourches de réplication bloquées non cassées (Mizuno et al., 2009; Tsang et al., 2014). Le DRC régule localement la résection accomplie par Exo1. A l'instar de *S. cerevisiae*, Rad3 (ATR) restreint l'activité de Exo1 à la fourche bloquée. Le complexe 9-1-1 et son chargeur Rad17, quant à eux, stimulent la résection par Exo1 (Tsang et al., 2014). Toutefois, il n'a pas été établi de lien entre la résection extensive en absence de Rad3 et la réversion de fourche dans le système utilisé dans Tsang et al., 2014 (voir Chapitre VI pour la description du système).

2.2.3. Réactivation/Redémarrage/Réparation

La reprise de la progression des fourches de réplication repose sur la capacité des cellules à réactiver, redémarrer ou réparer les fourches stressées, et ce lorsque la convergence de fourche n'a pas ou ne peut pas avoir lieu. Plusieurs mécanismes contribuent au redémarrage de fourches, la plupart d'entre eux impliquent des facteurs de la RH (cf. chapitre IV).

Certains mécanismes permettent le contournement des dommages à la fourche et de différer leur réparation (réparation post-réplivative). Il s'agit des mécanismes de tolérance des dommages ou DDT (pour *DNA Damage Tolerance*) (Figure 31). Chez *E. coli*, le réamorçage de la synthèse d'ADN (ou *repriming*) en aval de la lésion permet de contourner celle-ci lorsqu'elle survient sur le brin précoce. Le réplisome bactérien est capable de réamorcer et de ré-initier la réplication en réponse aux UVs grâce à l'intervention de DnaB (recrutée *via* PriC) et DnaG (Heller and Marians, 2006a; Yeeles and Marians, 2011). Un mécanisme similaire a été découvert chez les eucaryotes (Lopes et al., 2006; Rudd et al., 2014). PrimPol

(primase/polymérase trans-lésionnelle) permet le *repriming* des fourches altérées en réponse aux UVs dans les cellules de mammifères (Rudd et al., 2014). PrimPol n'est pas conservée chez les levures, ce qui soulève des interrogations quant au mécanisme permettant un réamorçage efficace chez ces organismes. En plus du *repriming*, le contournement des lésions par la fourche de réplication peut se faire *via* l'intervention de polymérases trans-lésionnelles ou le changement de matrice médiée par la recombinaison homologue (*template switch*) (Sale, 2012) (Figure 31).

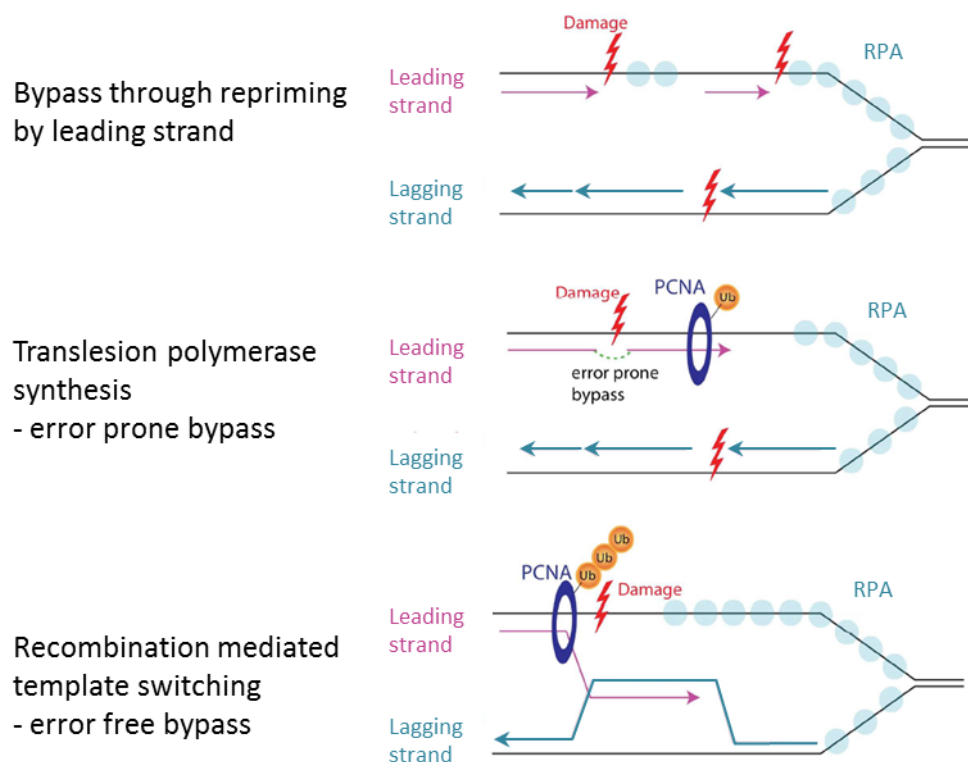


Figure 31 : Mécanismes de tolérance des dommages au cours de la réplication. D'après Iyer and Rhind, 2017.

Les fourches de réplication dysfonctionnelles, incapables de contourner l'obstacle rencontré, font appel à des mécanismes plus sophistiqués pour redémarrer la réplication. Ces mécanismes impliquent souvent une recombinaison associée à un risque d'instabilité. Toutefois, la RH arbore plusieurs casquettes en réponse au stress réplcatif (cf. chapitre IV). Il est donc important de comprendre par quel moyen la RH assure le maintien de la stabilité des génomes au cours du stress réplcatif.

3. Conséquences du stress répliatif sur la mitose

L'enjeu principal pour les cellules souffrant de stress répliatif est de garantir la complétion de la réplication et la résolution des intermédiaires de la réplication et de la recombinaison avant l'entrée en mitose. La perturbation d'une des deux voies de sauvetage des fourches bloquées (convergence et redémarrage de fourche) compromet la ségrégation des chromosomes en mitose et, de ce fait, la stabilité des génomes. Les conséquences du stress répliatif sur la mitose sont de deux types (Gelot et al., 2015):

- 1- Les défauts mitotiques peuvent résulter de l'altération locale des fourches qui conduit à des cassures, à des réarrangements ou à la persistance de liens physiques entre les chromatides sœurs. Ces altérations à la fourche se traduisent en mitoses par la ségrégation aberrante de fragments chromosomiques (chromosomes retardés) et la formation de ponts anaphasiques.
- 2- L'effet du stress répliatif sur la mitose peut être plus global et se manifester par la ségrégation aberrante du génome entier suite à des mitoses multipolaires (dues à la formation de centrosomes surnuméraires).

Il a été montré que de faibles doses d'hydroxyurée sont suffisantes pour que les cellules expriment ces défauts mitotiques, causes de ségrégations chromosomiques inégales et d'aneuploïdie (Wilhelm et al., 2014). Ces défauts sont exprimés en mitose et ce, même en présence d'un DDR fonctionnel en phase S et G2.

En réponse à un stress répliatif global, les défauts mitotiques émanent souvent de régions spécifiques du génome. En effet, toutes les régions du génome n'ont pas la même propension à engendrer des défauts de ségrégation. La nature de certaines régions fait qu'elles sont difficiles à répliquer et donc plus sensibles au stress répliatif que d'autres (Mankouri et al., 2013). Parmi ces régions, on peut citer les séquences centromériques et télomériques et les CFSs. Les CFSs correspondent à des *loci* susceptibles de casser lorsque les cellules sont exposées à de faibles doses d'aphidicoline (Glover et al., 1984). En accord avec cette

description, ces régions sont particulièrement sensibles au stress réplicatif induit par des oncogènes (Negrini et al., 2010).

La plupart des CFSs sont répliqués tardivement au cours de la phase S. Leur localisation au niveau de régions pauvres en origines impose une progression des fourches sur une longue région excluant la possibilité de sauvetage par l'activation d'origines dormantes. De surcroît, la majorité des CFSs se logent au niveau de longs gènes (>300kb), ce qui potentialiserait les collisions entre les machineries de réplication et de transcription. La difficulté à répliquer ces *loci* fait que les cellules sont susceptibles d'entrer en mitose avec des régions d'ADN qui ne sont pas complètement répliquées (Letessier et al., 2011; Mankouri et al., 2013; Oestergaard and Lisby, 2017; Le Tallec et al., 2011).

3.1. La synthèse d'ADN mitotique (MiDAS)

La complétion de la réplication de l'ADN peut se poursuivre en dehors de la phase S dans les cellules exposées à un stress réplicatif (Bergoglio et al., 2013; Minocherhomji et al., 2015; Pedersen et al., 2015). En effet, une synthèse mitotique en prométaphase a récemment été décrite au niveau des CFSs et des télomères en réponse au stress réplicatif (Bhowmick et al., 2016; Dilley et al., 2016; Minocherhomji et al., 2015; Roumelioti et al., 2016). Il s'agit du MiDAS (pour *Mitotic DNA Synthesis*) (Minocherhomji et al., 2015).

Les intermédiaires de réplication aberrants, notamment au niveau des CFSs, peuvent être résolus avant la progression des cellules en anaphase. Il est proposé que la synthèse mitotique reflète des événements de BIR médiés par de la micro-homologie (MMBIR, pour *Microhomology Mediated BIR*) (Bhowmick et al., 2016; Minocherhomji et al., 2015). Dans cette situation, le MMBIR est dépendant de RAD52 et indépendant de RAD51 et BRCA2. En effet, RAD51 et BRCA2 agissent plutôt en phase S/G2 et réduiraient probablement le recours à la voie du MiDAS (Bhowmick et al., 2016; Sirbu et al., 2011; Zellweger et al., 2015). L'endonucléase MUS81, dont le recrutement est dépendant de RAD52 et de l'hélicase RECQ5 (Bhowmick et al., 2016; Di Marco et al., 2017), est retrouvée au niveau des CFSs en prophase et opère un clivage afin d'initier le BIR et d'amorcer une synthèse d'ADN par POL δ . Cette

synthèse est dépendante de l'activité endonucléase de MUS81 et de POLD3 (sous unité non catalytique de POL δ) (Di Marco et al., 2017; Minocherhomji et al., 2015; Naim et al., 2013; Ying et al., 2013).

Au niveau des télomères, le BIR dépendant et indépendant de Rad51 et dépendant de POLD3/Pol32 a été décrit comme le mécanisme sous-tendant le processus alternatif du maintien des télomères *via* le phénomène du ALT (pour *Alternative Lengthening Telomere*) (Dilley et al., 2016; Min et al., 2017; Olivier et al., 2018; Roumelioti et al., 2016; Sobinoff et al., 2017). Il a été montré que le phénomène du ALT peut s'opérer *via* le MiDAS, qui offre une chance aux cellules d'allonger les télomères lorsque les fourches de réplication sont confrontées au stress répliatif (*R-loop* et G4 par exemple) (Min et al., 2017).

3.2. Les ponts anaphasiques

Les ponts anaphasiques correspondent à des structures émanant de la séparation de deux chromatides sœurs interconnectées. La non-disjonction des chromatides sœurs peut être due : (i) à leur caténation (*i.e* présence de deux duplexes d'ADNdb enchevêtrés), (ii) à la présence d'ADN non répliqué en phase S (Figure 32), et (iii) à leur fusion formant un chromosome dicentrique (Liu et al., 2014; Mohebi et al., 2015). Les ponts anaphasiques peuvent donc refléter la transmission du stress répliatif à la mitose.

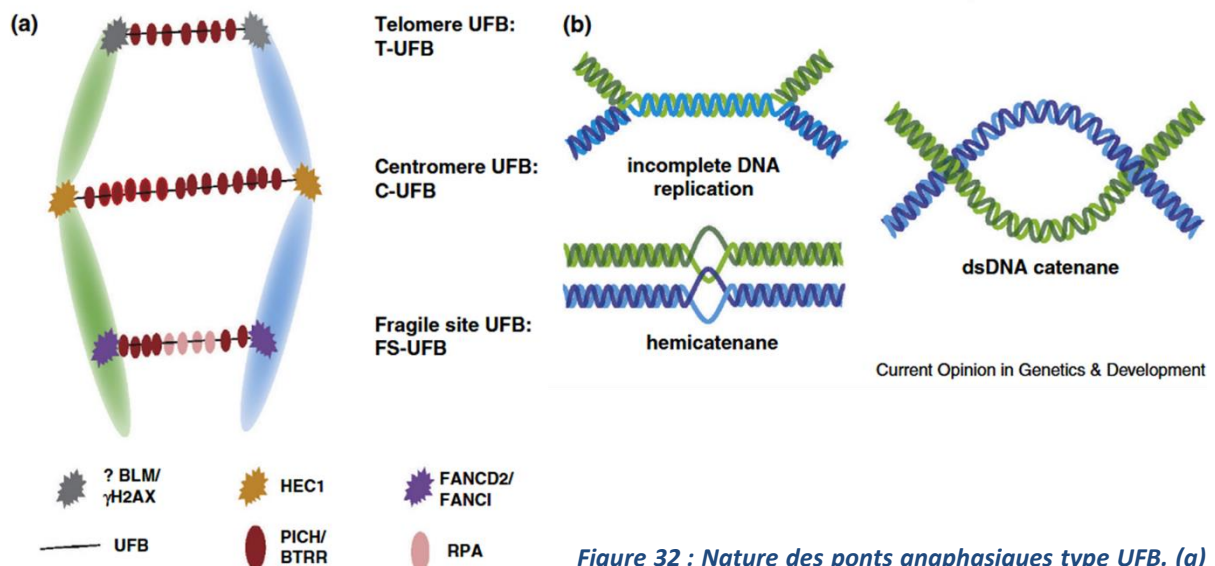


Figure 32 : Nature des ponts anaphasiques type UFB. (a) Les différentes sous-classes d'UFBs. La formation des UFBs résulte d'une séparation incomplète des chromatides sœurs. Trois types d'UFBs existent en fonction de la localisation des loci à partir desquels les UFBs émergent : T-UFB aux télomères, C-UFB aux centromères et FS-UFB aux CSFs. Les trois types d'UFBs sont fixés par PICH et le complexe BTRR (BLM/TOPOIII α /RMI1/RMI2). RPA se fixe sur les FS-UFBs au niveau de régions dépourvues de PICH. **(b)** Structures d'ADN possibles expliquant la formation des UFBs. Modifié de Liu et al., 2014.

Il existe deux classes de ponts anaphasiques. La première classe correspond aux ponts chromatiniens appelés aussi ponts conventionnels car ils contiennent des histones et peuvent être révélés grâce à des agents intercalant de l'ADN tels que le DAPI (Chan et al., 2007, 2009; Mohebi et al., 2015; Wilhelm et al., 2014). La seconde classe de ponts mitotiques est représentée par les UFBs (pour *Ultrafine Bridges*). Les UFBs sont réfractaires à un marquage au DAPI et correspondent à des structures d'ADN étirées. Les UFBs peuvent être détectés grâce à leur fixation par PICH (pour *Plk1-interaction checkpoint helicase*) (Baumann et al., 2007; Biebricher et al., 2013; Chan et al., 2007). Les UFBs peuvent être subdivisés en trois sous-classes : C-UFB (pour *centromeric UFB*), T-UFB (pour *telomeric UFB*) et FS-UFB (pour *fragile site UFB*) (Figure 32). Les C-UFBs comprennent des caténanes d'ADNdb et correspondent plutôt à des structures physiologiques résolues en mitose par la topoisomérase II (Liu et al., 2014; Rouzeau et al., 2012). Les UFBs émanant des régions télomériques ou T-UFBs sont moins bien caractérisés. Ils sont préférentiellement observés dans les cellules exposées à un stress réplcatif (aphidicoline) et comprennent probablement des régions

d'ADN non-répliquées (Liu et al., 2014; Sfeir et al., 2009). Les FS-UFBs sont formés lorsque les cellules entrent en mitose avec un ADN non répliqué aux CFSs. En plus de PICH, les FS-UFBs sont caractérisés par la présence de régions d'ADNs b révélées par la fixation de RPA. Souvent les FS-UFBs sont bornés par deux foyers FANCD2 (Chan et al., 2009). La résolution des UFBs implique l'intervention de différentes hélicases/translocases (telles que BLM, PICH et RIF1) dont l'absence conduit à une augmentation de la fréquence des UFBs et de leur cassure (Baumann et al., 2007; Chan et al., 2007; Hengeveld et al., 2015; Naim and Rosselli, 2009; Rouzeau et al., 2012). Ainsi, des séquelles du stress réplcatif peuvent être retrouvées dans les cellules filles en G1. Cela se traduit par la présence de dommages (révélées par des foyers 53BP1 en G1 appelée « *53BP1 bodies* ») et la formation de micronoyaux (Gelot et al., 2015).

Chez les levures, des structures rappelant les UFBs chez les mammifères (UFB-like) ont été décrites. Ces UFB-like sont la conséquence d'une perturbation de la réplication (Germann et al., 2014; Sabatinos et al., 2015; Sofueva et al., 2011).

Les ponts anaphasiques, chromatiniens et UFBs, sont majoritairement induits par des stress réplcatifs mais ils sont également retrouvés dans les cellules déficientes pour la RH (Germann et al., 2014; Lahkim Bennani-Belhaj et al., 2010; Lai et al., 2017; Laulier et al., 2011; Rodrigue et al., 2013; Wilhelm et al., 2014). Cela souligne l'interconnexion entre la réplication et la machinerie de recombinaison. Toutefois, le mécanisme par lequel la RH prévient la formation des UFBs n'est pas bien compris.

D'un autre côté, il est à noter que des intermédiaires de recombinaison formés en phase S peuvent être convertis en ponts anaphasiques s'ils sont mal ou non résolus avant la mitose (Chan et al., 2018; Germann et al., 2014; Mohebi et al., 2015; Rodrigue et al., 2013; Tiwari et al., 2018). Un nouveau groupe d'UFBs vient d'être décrit chez les mammifères, il s'agit des HR-UFBs (pour *Homologous Recombination UFB*) (Chan et al., 2018; Tiwari et al., 2018). Cela dénote la diversité des rôles que jouent la RH au cours de la réplication. La compréhension des fonctions impliquées dans la gestion du stress réplcatif est nécessaire pour déterminer le mécanisme par lequel la RH fait pencher la balance vers le maintien de la stabilité des génomes plutôt que l'instabilité chromosomique.

3.3. Centrosomes surnuméraires et mitoses multipolaires

Les centrosomes (au nombre de deux avant l'entrée en mitose) ne contiennent pas d'ADN mais leur nombre ainsi que leur stabilité sont clairement affectés en présence d'un stress réplicatif (Wilhelm et al., 2014). Le traitement de cellules avec de faibles doses d'hydroxyurée conduit à un ralentissement des fourches de réplication et à la formation de centrosomes surnuméraires à l'origine de mitoses multipolaires (Wilhelm et al., 2014). Ce phénomène est directement lié au stress réplicatif étant donné que la supplémentation en dNTPs, et donc la restauration de la vitesse des fourches, est suffisante pour assurer la correcte duplication des centrosomes et éliminer les défauts mitotiques (Wilhelm et al., 2014).

3.4. Micronoyaux

Les micronoyaux correspondent à des structures nucléaires extra-chromosomiques. Ils servent souvent de biomarqueurs de l'instabilité des génomes (Heddle et al., 1991; Jdey et al., 2017). Les micronoyaux peuvent être une conséquence tardive du stress réplication (Chan et al., 2009; Hengeveld et al., 2015; Kawabata et al., 2011; Naim and Rosselli, 2009; Sabatinos et al., 2015; Xu et al., 2011). Ils sont formés à cause d'erreurs survenant au cours de la ségrégation des chromosomes. Par exemple, des chromosomes égarés, tels que les chromosomes retardés ou acentriques, peuvent être empaquetés dans leur propre enveloppe nucléaire pour former un micronoyau (Huang et al., 2011). De même, une résolution inefficace des ponts anaphasiques est parfois associée à la formation de micronoyaux contenant les sites de dommages (sites fragiles dans le cas des FS-UFBs) (Chan et al., 2009; Hengeveld et al., 2015; Naim and Rosselli, 2009; Sabatinos et al., 2015).

Les micronoyaux peuvent être maintenus pendant plusieurs cycles cellulaires. L'ADN qu'ils contiennent peut être pulvérisé et réintégré dans le génome (Crasta et al., 2012). Ce phénomène est à l'origine de réarrangements chromosomiques particuliers appelés chromothripsis (réarrangements chromosomiques massifs générés au cours d'un seul événement cellulaire). L'effet cataclysmique de ce type d'évènements est à l'origine de nombreuses maladies congénitales et de cancers (Crasta et al., 2012; Zhang et al., 2015).

IV. Rôle de la recombinaison homologue dans la réponse au stress réplicatif

La formation des défauts mitotiques décrits dans la section précédente (ponts anaphasiques, mitoses multipolaires et centrosomes surnuméraires) est une des caractéristiques retrouvées dans les cellules déficientes pour la RH (Lai et al., 2017; Wilhelm et al., 2014). Cela dénote un lien étroit entre la RH et la réplication car : (i) les cellules déficientes pour la RH montrent un taux de stress réplicatif endogène élevé (manifesté au niveau des fourches par un ralentissement de leur vitesse), et (ii) les défauts mitotiques observés sont la conséquence de ce stress réplicatif étant donné qu'une supplémentation en dNTP permet de supprimer ces défauts (Daboussi et al., 2008; Wilhelm et al., 2014). Le fait que les cellules déficientes pour la RH montrent spontanément une réduction de la vitesse de progression des fourches de réplication révèle le rôle de la RH dans le soutien à la réplication, et ce même en absence de stress exogène (Daboussi et al., 2008).

Historiquement, la RH a été extensivement étudiée et décrite pour sa capacité à promouvoir la réparation des CDBs. Depuis les années 2000, des fonctions indépendantes de la réparation ont commencé à lui être attribuées. Grâce aux travaux menés ces dernières années, les fonctions de la RH au cours de la réplication sont de plus en plus appréhendées (ces fonctions sont résumées dans la Figure 33 et détaillées dans les sections de ce chapitre). En particulier, la fonction de protection des fourches de réplication a émergé ces dernières années comme une des fonctions importantes de la RH en réponse au stress réplicatif ; grâce notamment aux travaux de Schlacher et al., chez les mammifères (cf. 4 de ce chapitre) (Schlacher et al., 2011, 2012). Toutefois, les mécanismes par lesquels la RH prévient l'instabilité des génomes liée au stress réplicatif ne sont pas complètement élucidés. C'est ce point en particulier qui fait l'objet de ma thèse.

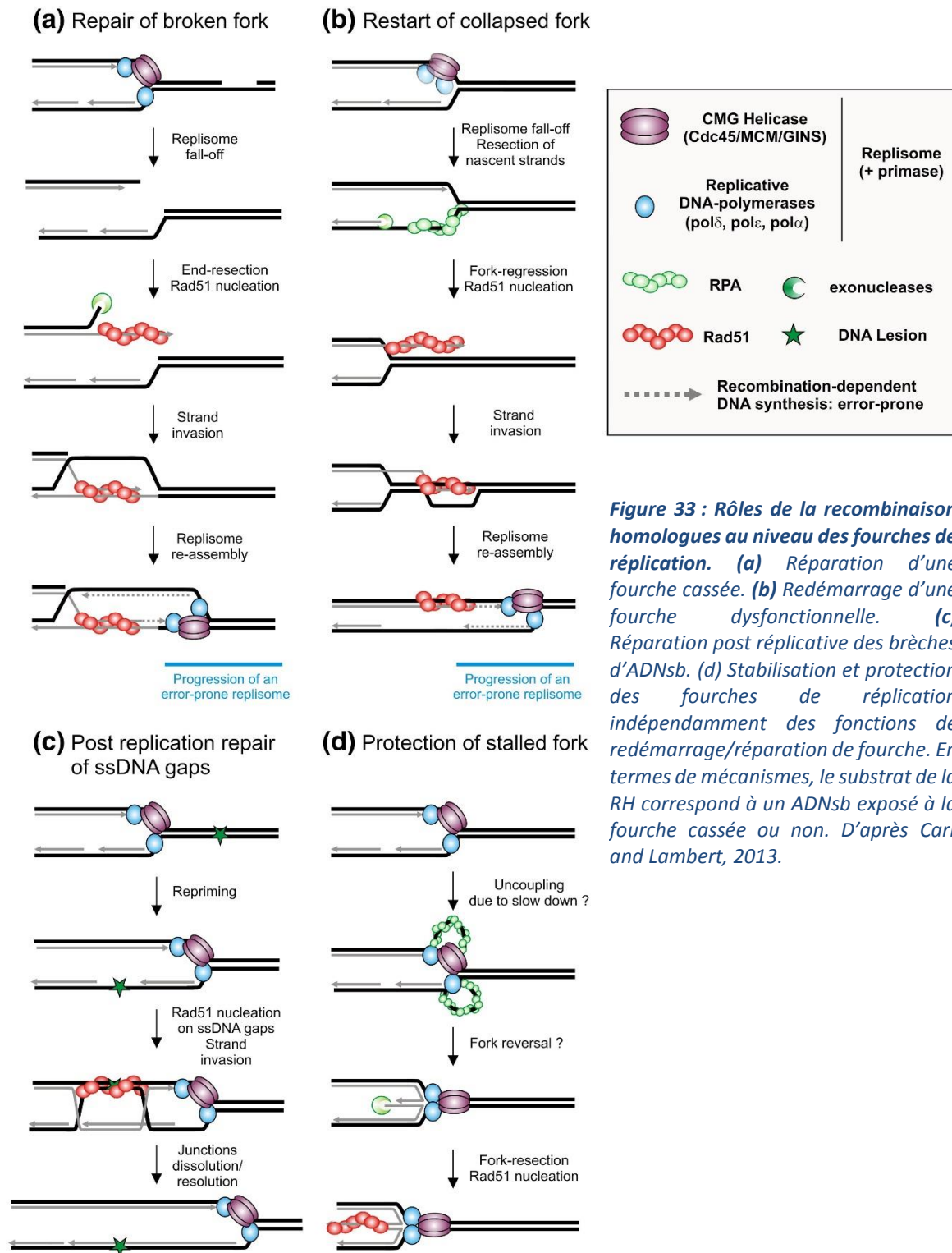


Figure 33 : Rôles de la recombinaison homologues au niveau des fourches de réplication. (a) Réparation d'une fourche cassée. (b) Redémarrage d'une fourche dysfonctionnelle. (c) Réparation post réplivative des brèches d'ADNsb. (d) Stabilisation et protection des fourches de réplication indépendamment des fonctions de redémarrage/réparation de fourche. En termes de mécanismes, le substrat de la RH correspond à un ADNsb exposé à la fourche cassée ou non. D'après Carr and Lambert, 2013.

1. La recombinaison homologue est associée à la réplication de l'ADN

Le métabolisme de l'ADN au cours de la réplication génère de l'ADNsb. Il est donc concevable que cela fournisse un point d'ancrage pour Rad51, avec toutefois une régulation fine du potentiel recombinogène de la RH. La réplication de l'ADN et la RH sont deux processus étroitement liés. L'activité de la RH est d'ailleurs retrouvée majoritairement en phase S (Karanam et al., 2012).

Plusieurs autres études ont mis en évidence la connexion entre la réplication et la machinerie de la RH au cours de la phase S normale : (i) il a été observé que certains facteurs de la RH forment spontanément des foyers durant la phase S (Chen et al., 1998; Lisby et al., 2001; Scully et al., 1997; Tarsounas et al., 2003), (ii) Rad51 interagit avec le complexe MCM (Bailis et al., 2008; Shukla et al., 2005), et (iii) RAD51 et BRCA2 sont associées à la chromatine en cours de réplication (Hashimoto et al., 2010; Kolinjivadi et al., 2017a). De plus, il a été montré chez *S. cerevisiae* que Rad51 et Rad52 sont présentes aux fourches non-perturbées (González-Prieto et al., 2013). En accord avec le rôle de la RH dans la réplication de l'ADN, il a été montré que les mutants déficients pour la RH montrent une accumulation d'ADNsb aux fourches et ce, même en absence de stress exogène (cf. 4 de ce chapitre) (Hashimoto et al., 2010). Cela suggère que RAD51 a des fonctions directement liées à la machinerie de réplication (Hashimoto et al., 2010, 2011).

2. Mécanismes de redémarrage des fourches de réplication par la recombinaison homologue et leurs conséquences

Le redémarrage des fourches de réplication bloquées par la RH nécessite l'action coordonnée de nucléases et de Rad51. Le redémarrage médié par la RH permet de recharger un nouveau réplisome ou des facteurs perdus au moment du blocage de fourche (Hashimoto et al., 2011; Miyabe et al., 2015; Mizuno et al., 2013; Petermann et al., 2010).

Les processus de redémarrage de fourches bloquées impliquant la formation d'une D-loop sont connus sous le nom de RDR (pour *Recombination Dependent Replication*) (Heller and Marians, 2006b). Le RDR est initié par la formation d'un nucléofilament RecA/Rad51 à partir d'une fourche cassée (BIR) ou non (Costes and Lambert, 2012).

Le RDR a été extensivement étudié chez *E. coli*. Souvent, la fourche de réplication bloquée est clivée par RuvABC suite à sa réversion. La fourche de réplication ainsi cassée est prise en charge par les facteurs de la RH et la formation de la D-loop permet de présenter un intermédiaire reconnaissable par PriA. PriA se charge alors de recruter le complexe qui permettra la reprise de la réplication (Heller and Marians, 2006b).

2.1. Redémarrage des fourches de réplication cassées

Les fourches de réplication cassées émanent suite à leur passage sur une CSB ou suite à leur clivage par des endonucléases, telles que Mus81, après leur blocage (par exemple en présence de cisplatine, d'aphidicoline ou suite à un blocage prolongé à l'hydroxyurée ou une surexpression d'oncogènes) (Froget et al., 2008; Hanada et al., 2007; Hashimoto et al., 2011; Lemaçon et al., 2017; Long et al., 2011; Murfunj et al., 2013; Petermann et al., 2010). Etant donné la capacité de la RH à promouvoir l'échange de brin lors la réparation des CDBs, l'intervention de Rad51 au niveau de la chromatide sœur physiquement détachée de la fourche de réplication n'est pas étonnante (Figure 34).

Il est admis que le redémarrage de la réplication en phase S à partir d'une fourche cassée fait intervenir le mécanisme du BIR (Hashimoto et al., 2011; Mayle et al., 2015; Moriel-Carretero and Aguilera, 2010; Sotiriou et al., 2016). Le BIR (décrit dans le Chapitre II page 76) a été extensivement étudié dans le contexte de la réparation des CDBs en G2 et diffère quelque peu de ce qui est observé en phase S (Figure 34).

Les premières évidences du BIR en phase S ont été rapportées par Moriel-Carretero and Aguilera chez *S. cerevisiae*. Leurs travaux montrent qu'une fourche de réplication cassée est

majoritairement réparée, en phase S, de façon dépendante de Rad51 (Figure 34A) et dans une moindre mesure *via* un mécanisme dépendant de Pol32 (Moriel-Carretero and Aguilera, 2010). Mayle et al., confirment ces résultats et montrent que les effets mutateurs associés au BIR sont limités grâce à deux mécanismes : le clivage par Mus81 et l'arrivée de la fourche convergente (Figure 34A étapes 3 et 4) (Mayle et al., 2015).

Plusieurs études chez les métazoaires montrent l'implication du BIR au cours de la phase S. Chez le xénope, le redémarrage des fourches dysfonctionnelles cassées *via* le BIR requiert RAD51, MRE11 et Pol η (Hashimoto et al., 2011). Constantino et al., ont montré que POLD3 joue un rôle dans la synthèse de l'ADN en réponse à une surexpression de la cyclin E (OIS) (Costantino et al., 2014). Cela suggère que les cellules subissant un OIS ont recours à des mécanismes tels que le BIR pour une réplication d'ADN efficace. En utilisant la même source de stress réplicatif, Sotiriou et al., révèlent un rôle pour RAD52 dans le redémarrage des fourches cassées et proposent un rôle pour RAD52 et POLD3 dans le BIR en phase S. La même étude a identifié MUS81 et SLX4 comme des facteurs requis pour la progression des cellules sur-exprimant la cycline E en phase S (Sotiriou et al., 2016). Ces facteurs (POLD3, RAD52, MUS81 et SLX4) étant impliqués à la fois dans le BIR en phase S et G2/M suggèrent que ces deux processus partagent le même mode opératoire (Bhowmick et al., 2016; Lemaçon et al., 2017; Minocherhomji et al., 2015; Sotiriou et al., 2016). Il n'est pas exclu que le BIR en phase G2/M (Bhowmick et al., 2016; Minocherhomji et al., 2015) représente simplement des événements de RH non accomplies en phase S.

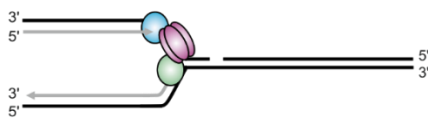
Une étude récente montre l'implication du BIR en phase S dans le redémarrage des fourches dégradées dans les cellules déficientes pour BRCA2 (Lemaçon et al., 2017). Comme mentionné précédemment, RAD52 est nécessaire à la survie des cellules déficientes pour BRCA2 (Feng et al., 2011). Il est donc plausible que le BIR représente un mécanisme de secours pour le sauvetage des fourches de réplication dans certaines conditions.

Il semblerait que toutes les déclinaisons du BIR (en phase S, G2 et G2/M) requièrent l'intervention de Mus81. Mus81 agit en complexe avec Eme1 (Mms4 chez *S. cerevisiae*). L'activité du complexe n'est normalement retrouvée qu'en mitose lorsque EME1 est

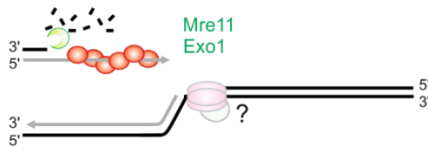
phosphorylée par CDK1 et PLK1 (pour *Polo-like kinase 1*) en G2/M, une phosphorylation requise pour son activation. Le même mécanisme d'activation en G2 est retrouvé chez les levures (Cdc2^{CDK1} et Rad3^{ATR} chez *S. pombe* et Cdc28^{CDK1} et Cdc5^{PLK1} chez *S. cerevisiae* (Dehé et al., 2013; Gallo-Fernández et al., 2012; Matos et al., 2011; Saugar et al., 2013). Pourtant, les études citées soutiennent que MUS81 joue un rôle dans le redémarrage des fourches en phase S en générant des CDBs et en promouvant le BIR. Il est proposé que, dans les cellules de mammifères, les fonctions de MUS81 sont gouvernées par le complexe MUS81-EME2 en phase S et par MUS81-EME1 en G2/M (Amangyeld et al., 2014; Pepe and West, 2014). De plus, il a été montré récemment que l'expression de Plk1 en phase S est augmentée suite à une longue exposition des cellules à l'hydroxyurée, ce qui expliquerait l'activation de Mus81 tardivement en phase S (Xu et al., 2017).

A. Fork-repair by BIR in S-phase

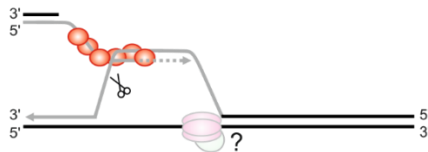
1. Broken fork



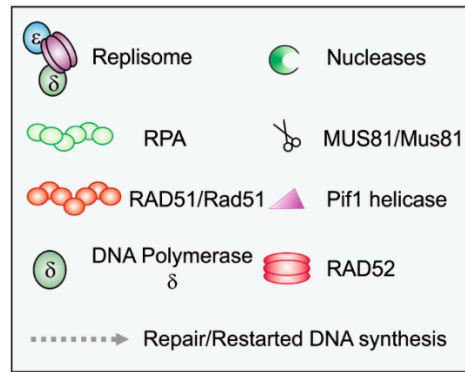
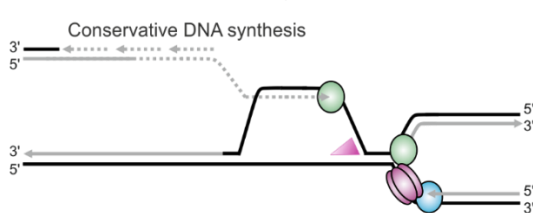
2. End-resection Rad51 loading



3. D-Loop formation



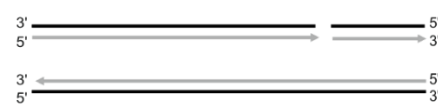
4. BIR by migrating D-loop



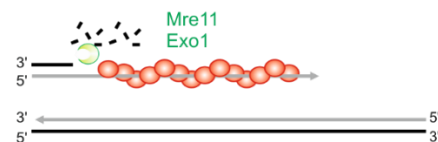
4'. Mus81 cleavage
BIR by fork restoration

B. DSB repair by BIR in G2-phase

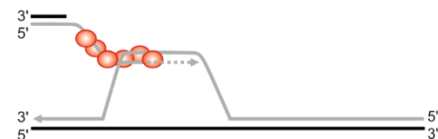
1. DSB



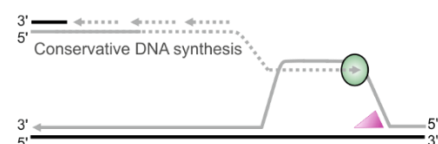
2. End-resection Rad51 loading



3. D-Loop formation

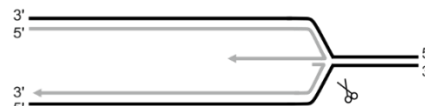


4. BIR by migrating D-loop

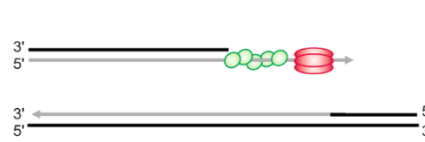


C. Fork-repair in G2/M (MiDAS)

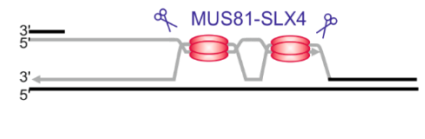
1. Fork cleavage



2. RAD52 recruitment



3. D-loop formation by RAD52-dependent strand annealing



4. BIR by migrating D-loop

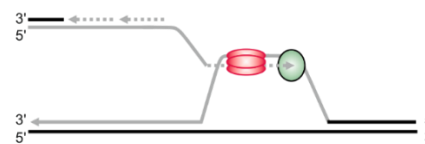


Figure 34 : Le BIR dans tous ses états. (A) Réparation d'une fourche dysfonctionnelle par le BIR en phase S. (B) Réparation d'une CDB par le BIR en G2. (C) Réparation d'une fourche de réplication dysfonctionnelle en G2/M accompagnée d'une synthèse mitotique (MiDAS).

2.2. Redémarrage des fourches de réplication non cassées

Plusieurs études ont permis de mettre en évidence le redémarrage des fourches de réplication indépendamment de la formation de CDBs (Lambert et al., 2005, 2010; Mizuno et al., 2009; Petermann et al., 2010). Dans les modèles proposés, les brins néosynthétisés sont dégradés afin d'exposer un ADNsb suite à la régression ou la réversion de la fourche bloquée (Figure 35). L'emploi de systèmes génétiques basés sur l'utilisation de RFBs de manière contrôlée permet d'étudier le rôle de la RH dans le redémarrage de fourche d'un point de vue moléculaire et structural, mais aussi en termes de mécanisme. Chez *S. pombe* la barrière *RTS1* (*RTS1*-RFB, où un blocage irréversible mais polaire est induit par la fixation d'un complexe protéique) est la RFB la plus utilisée (Ahn et al., 2005; Dalgaard and Klar, 2000, 2001; Lambert et al., 2005). La séquence *RTS1* est placée à un locus défini et différents blocages de fourche peuvent être induits en fonction de l'orientation de la séquence *RTS1*. L'utilisation de ce système a permis de montrer que le RDR peut être indépendant de la formation de CDBs mais aussi que le redémarrage des fourches dysfonctionnelles peut être mutagène (Iraqi et al., 2012; Lambert et al., 2005, 2010, Mizuno et al., 2009, 2013). Les facteurs de la RH (RPA, Rad52, Rad51 et Rad54) sont rapidement recrutés au niveau du site de blocage (Lambert et al., 2005, 2010; Nguyen et al., 2015; Tsang et al., 2014). Ainsi, le redémarrage des fourches bloquées est dépendant de Rad51, Rad52 et de Rad50 (Iraqi et al., 2012; Tsang et al., 2014). Il a été montré que dans ce système, environ 50% des fourches sont redémarrées par la RH avant l'arrivée de la fourche opposée (Nguyen et al., 2015). Toutefois, l'arrivée de la fourche convergente ne représente pas un moyen de sauvetage de fourche efficace en absence de Rad51 et Rad50. En effet, la viabilité optimale des cellules où le blocage de fourche est induit requiert la présence de Rad51 et Rad50 (Lambert et al., 2005).

L'identification des acteurs moléculaires et des structures formées aux fourches dysfonctionnelles a permis de proposer un modèle où : (i) les brins néosynthétisés sont dégradés (sur environ 1kb *via* l'action conjointe de MRN et Exo1) ; (ii) RPA, Rad52 et Rad51 sont recrutées et (iii) l'invasion de brin génère une D-loop permettant le recrutement d'un nouveau réplisome afin de reprendre la synthèse de l'ADN (Figure 35) (Carr and Lambert, 2013).

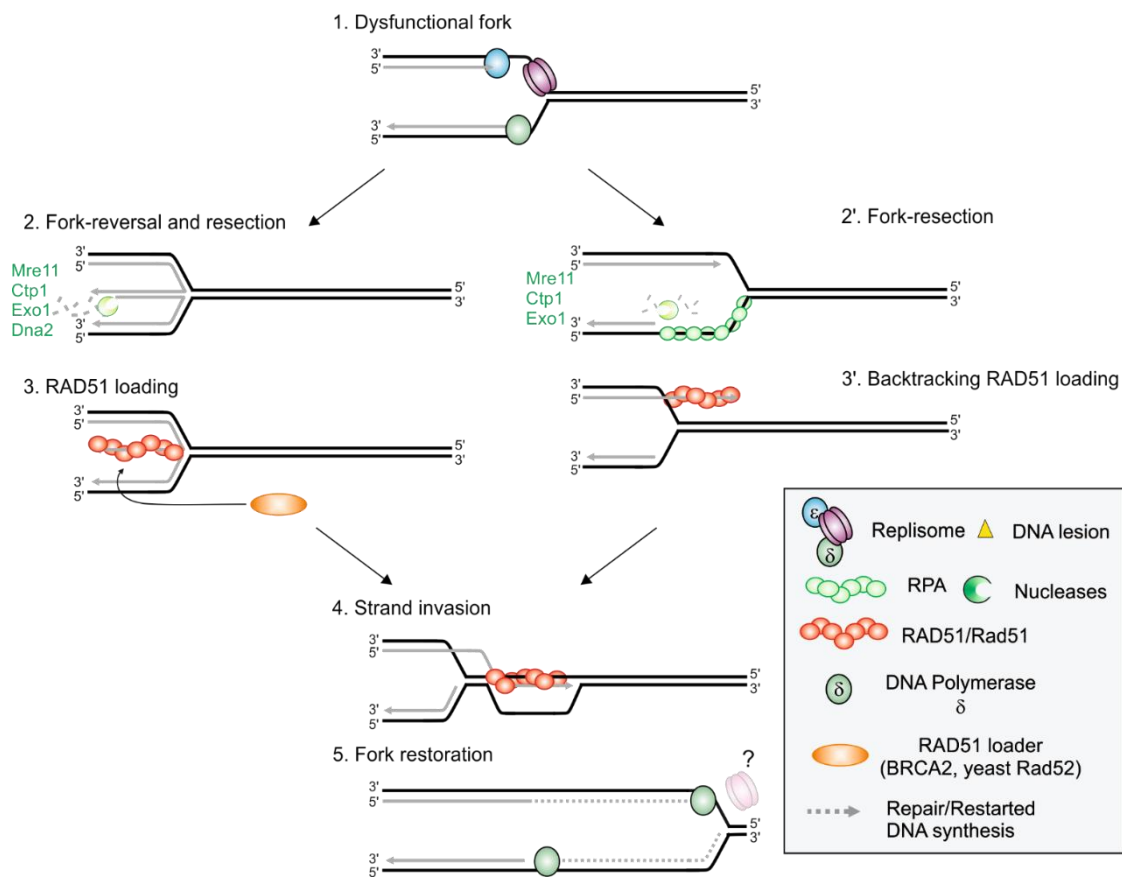


Figure 35 : Modèles de redémarrage des fourches de réplication par la recombinaison homologue chez *S. pombe*.

Le redémarrage des fourches de réplication par la RH n'est pas sans conséquences, étant donné que la fidélité de ce processus n'est pas infaillible. En effet, le redémarrage par la RH peut s'accompagner de mutations et de réarrangements chromosomiques (Carr and Lambert, 2013). Comme pour la réparation des CDBs, la nature de la séquence utilisée comme matrice conditionne le type de produit obtenu après la résolution des intermédiaires de recombinaison. De ce fait, l'utilisation de séquences ectopiques et les changements de matrices sont associés à des événements de réarrangements chromosomiques. Par exemple, une recombinaison non allélique conduit à la formation de chromosomes acentriques et dicentriques lorsque la nouvelle matrice correspond à une séquence répétée inversée située à proximité du site de blocage (Lambert et al., 2010). Des réarrangements sont générés par le RDR dépendant de RAD51, suite à des changements de matrices opérés *via* un phénomène appelé FoSTes (*pour Fork Stalling and Template Switch*) (Ottaviani et al., 2014). Au cours du FoSTes, les brins néosynthétisés changent de matrice de façon réitérative en envahissant des

régions présentant des micro-homologies à partir desquelles une synthèse d'ADN est initiée. La série d'invasion/synthèse s'achève lorsque le brin envahissant rejoint sa matrice originale (Figure 36) (Branzei and Foiani, 2007). Le MMBIR est une sous-classe du BIR indépendante de Rad51 et avec un potentiel plus mutagène que le BIR classique (initié *via* l'invasion de la chromatide sœur par un filament Rad51). Comme son nom l'indique, le MMBIR est initié à partir du bras cassé d'une fourche. Le brin néosynthétisé de la CDB générée s'hybride à des régions présentant des micro-homologies (Hastings et al., 2009). Un ou plusieurs rounds d'hybridation/synthèse peuvent générer des réarrangements dits simples ou complexes respectivement (Figure 36) (Ottaviani et al., 2014).

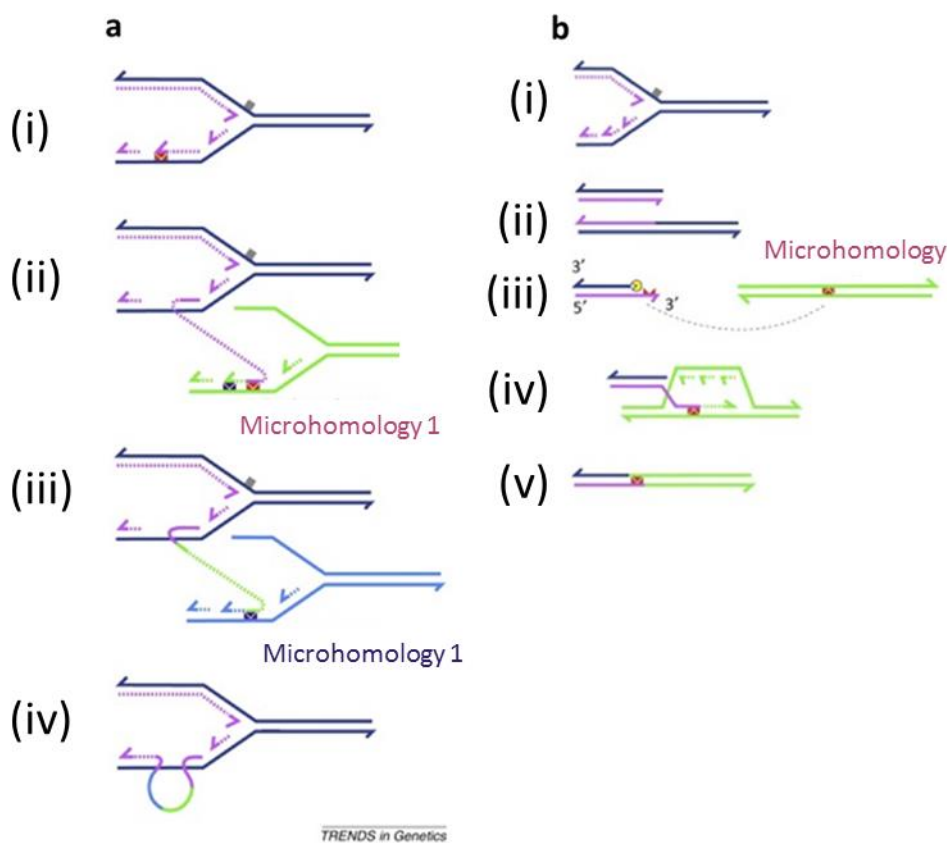


Figure 36 : Modèles de redémarrage de fourche associé aux changements de matrice. (a) Modèle du FoSTeS. (i) Blocage d'une fourche de réplication ayant rencontré un obstacle (représenté en gris). (ii) Le brin tardif s'hybride à une autre fourche en progression au niveau de micro-homologies (en rouge) et amorce une synthèse d'ADN. (iii) De nouveau, le brin tardif quitte sa matrice et s'hybride à une autre fourche active et reprend sa synthèse. (iv) Eventuellement, le brin tardif rejoint sa matrice initiale afin de continuer la réplication jusqu'au site de terminaison le plus proche. (b) Modèle de MMBIR. (i-ii) Blocage d'une fourche de réplication et clivage de la fourche dysfonctionnelle par des endonucléases. (iii) Résection de la CDB formée et (iv) formation d'une D-loop suite à l'invasion d'un duplexe d'ADN présentant une micro-homologie. Une synthèse d'ADN est entamée et peut se poursuivre jusqu'à la fin du chromosome. Modifié de Ottaviani et al., 2014.

Il est à noter que le redémarrage des fourches de réplication par la RH à partir de la matrice correcte est également instigateur de mutations et de réarrangements (insertions, délétions et formation d'isochromosomes). La réplication initiée suite à la recombinaison est semi-conservative mais plus sujette aux mutations qu'une réplication canonique (Carr and Lambert, 2013). En effet, les fourches redémarrées par la RH sont plus enclines aux glissements de la réplication au niveau de micro-homologies et à la réversion de l'orientation de la réplication (appelée *U-turn*) lorsque des séquences répétées inversées sont rencontrées (Iraqui et al., 2012; Mizuno et al., 2013).

3. Fonctions post-réplcatives de la recombinaison homologue

La présence de brèches d'ADNsb derrière la fourche de réplication (brèches internes) est le résultat du passage d'une fourche à travers une lésion et du *repriming* de la réplication (Lopes et al., 2006). D'un côté la RH participe à la formation de ces brèches en favorisant le contournement des lésions et facilite probablement le réamorçage de la synthèse d'ADN en aval de la lésion (González-Prieto et al., 2013). De l'autre, les brèches simple-brin sont scellées par la RH qui procède à la synthèse du brin manquant en utilisant le brin de la chromatide sœur non endommagée (*template switch*) (González-Prieto et al., 2013; Lopes et al., 2006). La formation de molécules jointes inhérente au *template switch* médiée par Rad51 est probablement résolue par Sgs1 et son partenaire Topo3 (Branzei et al., 2008; Mankouri et al., 2011; Vanoli et al., 2010). L'étude de la dépendance génétique de ce mécanisme chez *S. cerevisiae* (Vanoli et al., 2010) suggère que les brèches d'ADNsb sont d'abord élargies par Exo1 avant le recrutement de RPA et des médiateurs de la RH (Rad52, Rad55-Rad57) et la formation du nucléofilament Rad51. Suite à l'invasion de brin, la polymérase δ synthétise la portion d'ADN manquante. Il a été montré qu'en absence de Rad51 et de son chargeur (Rad52 chez *S. cerevisiae* et BRCA2 chez le xénope), les brèches d'ADNsb s'accumulent derrière les fourches de réplication (Hashimoto et al., 2010; Kolinjivadi et al., 2017a; Lopes et al., 2006). Les brèches d'ADNsb initiales sont formées derrière la fourche indépendamment de l'action de nucléases (Hashimoto et al., 2010) et ont tendance à être élargies en absence de Rad51/Rad52 *via* l'action de nucléases telles que MRE11 (Hashimoto et al., 2010; Lopes et al., 2006). Cela

montre, qu'en plus de sa capacité à promouvoir l'échange de brin, Rad51 est impliquée dans le maintien de l'intégrité des brins néosynthétisés.

4. Protection des fourches de réplication par la recombinaison homologue

La fonction la plus caractérisée de Rad51 est sa capacité à promouvoir l'échange de brin. Toutefois, des études plutôt récentes montrent que le chargement de Rad51 de façon stable aux fourches de réplication a pour vertu la stabilisation de ces fourches en prévenant leur dégradation excessive (Hashimoto et al., 2010; Petermann et al., 2010; Schlacher et al., 2011, 2012). Les travaux de Petermann et al., suggèrent que RAD51 protège/redémarre puis répare les fourches cassées *via* des fonctions séparables temporellement et en termes de mécanisme (Petermann et al., 2010). Il s'avère que la protection des brins néosynthétisés contre les attaques de nucléases représente un pan important des fonctions réplcatives de la RH.

La protection des fourches de réplication par les facteurs de la RH (RecA et RecFOR) a été initialement découverte chez *E. coli* (Courcelle and Hanawalt, 2001; Courcelle et al., 2003). Il a été montré qu'en réponse aux UVs, RecA et RecF stabilisent la fourche réversée, prévenant ainsi sa dégradation par des nucléases/hélicases (RecQ et RecJ) (Courcelle et al., 2003). Ainsi, en plus de promouvoir la réactivation des fourches, la RH promeut leur stabilisation. La fonction de stabilisation des fourches de réplication a été proposée chez les mammifères en 2003 par Lomonosov et al., qui ont proposé un rôle pour BRCA2 dans la stabilisation des fourches de réplication au niveau de sites de pause naturels (rDNA) en présence d'hydroxyurée (Lomonosov et al., 2003). Depuis, plusieurs études ont mis en évidence la fonction de protection des fourches de réplication par la RH chez différents organismes (Hashimoto et al., 2010; Kolinjivadi et al., 2017a; Schlacher et al., 2011, 2012).

En l'absence de stress réplcatif exogène, la déplétion de Rad51 (chez le Xénope et *S. cerevisiae*) conduit à l'accumulation d'ADNsb à la fourche (brèches à la fourche) et dernière la fourche (brèches internes) (Hashimoto et al., 2010). Cela a permis de mettre en évidence le rôle de RAD51 au cours de la réplication de l'ADN en absence de stress exogène. Il s'avère que le nombre et la taille des brèches internes sont augmentés en présence d'agents

généotoxiques, ce qui suggère que ces brèches émergent suite à des blocages de fourches. Cela implique que le stress répliatif spontané dont souffrent les cellules déficientes pour la RH (Daboussi et al., 2008; Wilhelm et al., 2014) pourrait inclure des blocages de fourches. L'accumulation de l'ADNsb derrière les fourches de réplication est due à l'action de la nucléase MRE11. Ainsi, RAD51 participe à la stabilisation des fourches en difficulté en protégeant les brins néosynthétisés contre la dégradation par des nucléases (MRE11 et probablement d'autres telles que DNA2) (Hashimoto et al., 2010). L'absence de Rad51/Rad52 a la même conséquence chez *S. cerevisiae* en terme d'accumulation d'ADNsb, mais la dépendance génétique de ce phénomène n'a pas été explorée (Hashimoto et al., 2010). Ces travaux suggèrent que la fonction de protection des fourches de réplication par la RH est conservée au sein des eucaryotes.

BRCA2 et Rad52 sont les chargeurs principaux de Rad51 chez les mammifères et les levures respectivement. Les fonctions de stabilisation et donc de protection des fourches de réplication par Rad51 sont médiées par ses chargeurs. En effet, Schlacher et al., ont montré que BRCA2 prévient la dégradation des brins néosynthétisés en limitant l'activité nucléase de MRE11 aux fourches perturbées en présence d'hydroxyurée (Schlacher et al., 2011). De manière intéressante, cette fonction requiert la formation du nucléofilament RAD51 mais aussi sa stabilisation par BRCA2 et la présence des protéines de la voie FA (pour *Fanconia Anemia*) (Schlacher et al., 2011, 2012). L'utilisation d'une forme de BRCA2 (BRCA2-S3291A) mutée dans sa région C-terminale (abolit l'interaction avec RAD51 en région C-terminale) a permis de révéler que cette région est indispensable pour la protection des fourches de réplication. Cependant, le chargement de RAD51 et la réparation des CDBs ne sont pas affectés dans les cellules exprimant ce même mutant BRCA2. De ce fait, la réparation et la protection des fourches de réplication sont probablement deux fonctions distinctes de la RH (Schlacher et al., 2011).

L'utilisation de mutants RAD51 permet de mieux appréhender les fonctions de protection de fourche par la RH. Le rôle de RAD51 dans ces situations est établi indirectement car ces mutants agissent par dominance négative, dans la condition où ils sont surexprimés. Par exemple, la forme RAD51-T131P est caractérisée par son incapacité à protéger les fourches

de réplication mais la capacité des cellules à réparer les CDBs et à promouvoir la réversion de fourche de sont pas affectées. Cette mutation, retrouvée chez les patients FA (pour *Fanconi Anemia*), confère une sensibilité accrue aux ICLs indépendamment de la capacité des cellules à accomplir l'échange de brin (Wang et al., 2015). A l'opposé, le mutant RAD51-K133R forme un filament stable incapable d'envahir un duplexe homologue. Ce mutant a été utilisé par Schlacher et al., pour montrer que la fixation d'un filament stable est suffisante pour garantir la stabilisation des fourches de réplication (Schlacher et al., 2011, 2012).

Dans le modèle proposé par Schlacher et al., BRCA2 stabilise RAD51 sur les fourches bloquées (réversée ou non). Une fois la contrainte réplivative levée, la réplication reprend et BRCA2 et RAD51 se dissocient de la fourche. La dissociation de BRCA2 est médiée par sa phosphorylation par CDK (Schlacher et al., 2011). Des études plus récentes montrent que, suite à la réversion de fourche, BRCA2 favorise le chargement de RAD51 sur le bras réversé et protège ainsi les fourche contre leur dégradation extensive (Figure 37) (Kolinjivadi et al., 2017a; Lemaçon et al., 2017; Mijic et al., 2017). De manière intéressante, la réversion de fourche est dépendante de RAD51 et indépendante de BRCA2. Cela dénote un rôle dual de RAD51 au niveau des fourches : (i) la réversion des fourches ne nécessitant pas la stabilisation du filament RAD51 (Figure 37 étapes 2 et 3) et (ii) la protection du bras réversé dépendante de la stabilisation/formation du filament par BRCA2 (Figure 37 étape 4). Ainsi, dans le modèle proposé chez les mammifères, c'est RAD51 qui fournit le substrat utilisé par les nucléases pour la dégradation extensive dans les cellules déficientes pour la protection (en absence de BRCA2 ou en présence du mutant RAD51-T131P) (Kolinjivadi et al., 2017a; Lemaçon et al., 2017; Mijic et al., 2017; Zadorozhny et al., 2017). J'attire l'attention du lecteur sur ce modèle qui sera repris dans la discussion et qui diffère quelque peu du modèle qu'on propose chez *S. pombe* (cf. Publication #1, partie résultats).

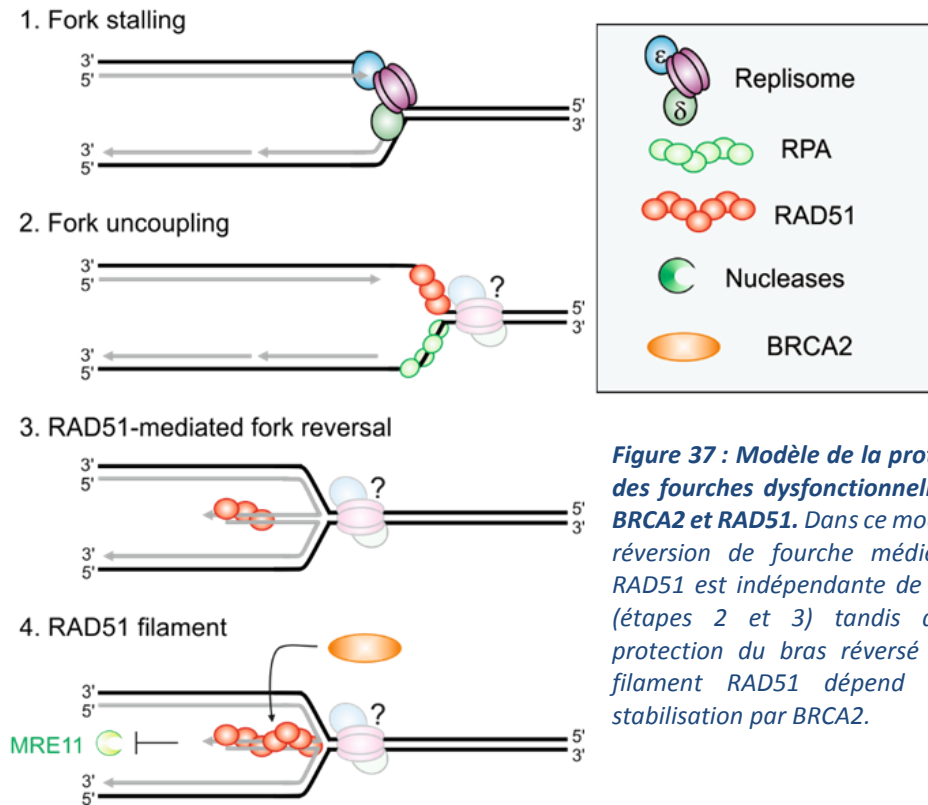


Figure 37 : Modèle de la protection des fourches dysfonctionnelles par BRCA2 et RAD51. Dans ce modèle, la réversion de fourche médiée par RAD51 est indépendante de BRCA2 (étapes 2 et 3) tandis que la protection du bras réversé par le filament RAD51 dépend de sa stabilisation par BRCA2.

L'achèvement de la réplication au niveau des fourches de réplication protégées s'opère probablement *via* l'arrivée de la fourche convergente ou par sa prise en charge par MUS81 suite à la dissolution de RAD51 avant l'entrée en mitose (Di Marco et al., 2017; Schlacher et al., 2011). Une possibilité de sauvetage des fourches de réplication par leur redémarrage par la RH n'est pas clair. En effet, bien que les cellules déficientes pour la voie FA ou pour BRCA2 soient déficientes pour la protection des fourches de réplication, ces cellules ne présentent pas de défauts dans le redémarrage des fourches lorsque la réplication est perturbée en présence d'hydroxyurée (Schlacher et al., 2011, 2012). Toutefois, le rôle de BRCA2 dans le redémarrage est à nuancer car des études divergent quant à sa fonction dans le redémarrage de fourches (Michl et al., 2016).

V. *Schizosaccharomyces pombe*, une levure modèle

Schizosaccharomyces pombe dérive de « *skhizein* » qui veut dire fission en grecque, « *saccharum* » qui veut dire sucre en latin, « *mukes* » qui veut dire champignon et « *pombe* » qui en terme Swahili veut dire bière. *S. pombe* a été isolée pour la première fois en 1893 (Wixon, 2002). C'est dans les années 1950 que *S. pombe* fut utilisée pour la première fois par Urs Leupold pour des études génétiques et par Murdoch Mitchinson pour des études sur le cycle cellulaire. L'étude du cycle cellulaire chez *S. pombe* a contribué à la découverte de protéines impliquées dans ce processus et la division cellulaire, ce qui a valu le prix Nobel de physiologie ou médecine à Paul Nurse (pour la découverte des CDKs chez *S. pombe*), Leland Hartwell (pour ses travaux sur les checkpoints chez *S. cerevisiae*) et Timothy Hunt (pour la découverte des cyclines chez l'oursin) en 2001 (Nurse, 2001). Les caractéristiques de *S. pombe* font qu'une large communauté scientifique l'utilise comme organisme modèle. De ce fait, plusieurs outils moléculaires et génétiques ont été développés chez cet organisme (Murray et al., 2016).

S. pombe ou levure fissipare est un organisme unicellulaire avec une forme cylindrique (Figure 38a). Les cellules mesurent entre 7 à 15 μm de longueur et 3 à 4 μm de diamètre. Au cours du cycle cellulaire, les cellules maintiennent leur forme tandis que leur taille varie en fonction de la phase du cycle. Elles tiennent leur nom de leur mode de division : les cellules forment un septum au centre avant de se diviser par fission transversale. Il en résulte deux cellules filles de tailles identiques. Généralement, *S. pombe* reste à l'état haploïde. L'état diploïde est retrouvé lorsque des cellules de types sexuels opposés (h+ et h-) se croisent pour former un zygote diploïde. Ce phénomène se produit lorsque les cellules sont confrontées à des conditions extrêmes telles qu'un appauvrissement en azote. Le zygote diploïde formé entre rapidement en méiose pour former quatre spores haploïdes contenues dans un asque (formant une tétrade) (Moreno et al., 1991; Sabatinos and Forsburg, 2010).

S. pombe possède un temps de génération d'environ 3h. Près de 70% de ce temps est consacré à la phase G2 (Moreno et al., 1991). Les différentes phases du cycle cellulaire sont

reconnaissables grâce à la taille des cellules, le nombre de noyaux et la présence ou l'absence du septum (Figure 38b). Les cellules en G2 sont mono nucléées et caractérisées par leur petite taille et l'absence de septum. En mitose, les chromosomes ségrégent sans dissolution préalable de l'enveloppe nucléaire. Les deux noyaux fils entament le cycle suivant avant la cytotdiérèse. Ainsi les cellules binucléées comprennent les cellules en phase M, G1 (très transitoire chez *S. pombe*) et S (Figure 38b). Le septum se forme au cours de la phase S du cycle suivant et la cytotdiérèse se produit lors de l'invagination du septum (Knutsen et al., 2011; Sabatinos and Forsburg, 2010).

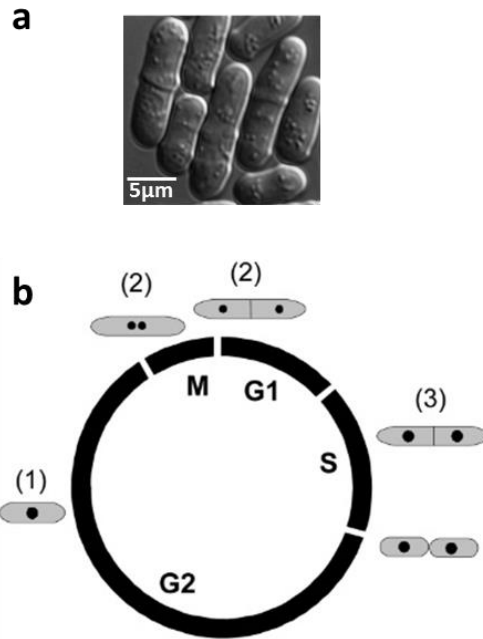


Figure 38 : *Schizosaccharomyces pombe*. (a) Morphologie de la levure fissionnaire. (b) Représentation du cycle cellulaire (au cours de la croissance végétative) de *S. pombe*. D'après Knutsen et al., 2012 (b).

Le génome de *S. pombe* fut complètement séquencé en 2002. Son génome comprend 13,8Mb (à l'état haploïde) organisé en trois chromosomes : I (5,7Mb), II (4,6Mb) et III (3,5Mb) (Wood et al., 2002). *S. pombe* et *S. cerevisiae* sont très éloignées en terme de phylogénie (leur séparation remonte à 10^9 années). Toutefois, les outils et méthodes développés chez *S. pombe* sont conceptuellement similaires à ceux retrouvés chez *S. cerevisiae* (Sabatinos and Forsburg, 2010).

L'utilisation de *S. pombe* en laboratoire offre plusieurs avantages du fait de : (i) son existence à l'état unicellulaire, ce qui facilite les analyses génétiques, (ii) la taille de son génome qui facilite sa manipulation et (iii) de la conservation de la plupart des mécanismes entre *S. pombe* et les métazoaires, notamment en ce qui concerne la réplication de l'ADN (Hoffman et al., 2015). La réplication chez *S. pombe* est initiée à partir de plusieurs origines de réplication dont l'allumage suit un mode qualifié de plutôt stochastique (Heichinger et al., 2006; Kaykov and Nurse, 2015; Patel et al., 2005). Les origines sont qualifiées de « fortes »

lorsqu'elles sont répliquées précocement, par opposition aux origines dites « faibles » qui sont répliquées tardivement en phase S.

VI. Essai génétique pour étudier les conséquences d'un blocage de fourche de réplication chez *S. pombe*

Au cours de la réplication chez les eucaryotes, plusieurs sites de pause naturels et programmés existent pour bloquer les fourches de réplication en fonction de leur directionnalité (Gadaleta and Noguchi, 2017; Lambert and Carr, 2013a). Parmi les sites de pause naturels chez *S. pombe*, la barrière *RTS1* (pour *Replication Termination Sequence*) ou *RTS1*-RFB est retrouvée sur le chromosome II au niveau du locus du changement de sexe (*mat*). L'activation de la barrière *RTS1* permet la réplication unidirectionnelle de ce locus afin de permettre les événements de recombinaison nécessaires au changement de sexe. La fixation d'un complexe protéique (non-histone) à la séquence *RTS1* permet le blocage polaire de la réplication (*i.e* en une seule direction en fonction de l'orientation de la séquence *RTS1*). La protéine caractéristique du complexe est représentée par Rtf1 (pour *Replication termination factor*) (Codlin and Dalgaard, 2003; Dalgaard and Klar, 2000, 2001; Eydmann et al., 2008). L'activation de *RTS1*-RFB dépend de la présence de Rtf1. Utilisées séparément, ni la séquence ni la protéine n'induisent de blocage de fourche.

La barrière *RTS1* correspond à une séquence de 859pb et comprend deux régions (A et B). Les 450pb de la région B sont essentielles pour l'activité de la barrière. En effet, la région B contient quatre motifs de fixation de Rtf1. L'activité de *RTS1*-RFB est effective lorsque Rtf1, en interaction avec les autres protéines du complexe (Rtf2, Swi1 Swi3), se fixe sur la séquence *RTS1*. Les 60pb de la région A servent au renforcement du blocage de fourche dépendant de la région B, somme toute *via* la fixation de Rtf2 (Codlin and Dalgaard, 2003; Dalgaard and Klar, 2000). La fixation de plusieurs molécules Rtf1, ainsi que leur interaction, sur *RTS1* constituerait une contrainte topologique pour l'ouverture de la double hélice par les hélicases répliquatives (Eydmann et al., 2008).

Ce système a été converti en essai génétique contrôlé *via* son introduction au niveau du *locus ura4* sur le chromosome III de *S. pombe* (Figure 39) (Lambert et al., 2005). Cela permet d'étudier le rôle de la RH (résection, redémarrage et protection) en réponse à un blocage de fourche défini (et donc traçable) et unique. Dans ce système, le contrôle de l'activité de la RFB se fait *via* le contrôle de l'expression de Rtf1. Cette protéine est placée sous le contrôle du promoteur *nmt41*, répressible en présence de thiamine. Ainsi, la présence de thiamine dans le milieu de culture empêche l'activation de la barrière (ce qui correspond à *RTS1*-RFB en condition OFF). L'expression de Rtf1 est maximale 16h après l'élimination de la thiamine du milieu. Dans cette condition, dite *RTS1*-RFB ON, plus de 90% des fourches suivant la direction principale de la réplication (*i.e* émanant de l'origine forte, ori 3006/7, située en amont de la séquence *RTS1*) sont bloquées. Les fourches dysfonctionnelles qui en résultent sont redémarrées par la RH ou sauvées par la progression de la fourche opposée. Le redémarrage par la RH survient dans les 20 minutes qui suivent le blocage de fourche à partir d'un ADNsb formé au niveau de la fourche intacte et non à partir d'une CDBs. Le recrutement de Rad51/Rad51 sur l'ADNsb, en grande partie formé par Exo1, est nécessaire au redémarrage de la fourche (Lambert et al., 2005, 2010; Miyabe et al., 2015; Mizuno et al., 2009; Tsang et al., 2014). La réplication se fait de manière semi-conservative avec les deux brins, tardif et précoce, synthétisés par Pol δ (Miyabe et al., 2015). Le réplisome nouvellement formé est plus enclin aux mutations et aux glissements de la polymérase qu'un réplisome canonique (Iraqi et al., 2012).

Le penchant du réplisome vers les événements de glissement de la polymérase, notamment au niveau des régions flanquées par de la micro-homologie, a permis de développer un essai au laboratoire afin de déterminer l'efficacité de redémarrage des fourches par la RH. Cet essai est basé sur l'utilisation de la barrière *RTS1* intégrée au locus *ura4* mais cette fois avec une forme non fonctionnelle du gène *ura4* appelée *ura4sd20* (les cellules portant cet allèle sont auxotrophe pour l'uracile). Cette allèle contient une duplication de 20pb flanquées par 5pb de micro-homologie. Le redémarrage des fourches de réplication par la RH fait que le glissement de la polymérase se traduit par la perte de la duplication de 20 nucléotides et la restauration d'un gène *ura4* fonctionnel (Iraqi et al., 2012; Tsang et al.,

2014). Ainsi, la fréquence des cellules devenues autotrophes pour l'uracile est corrélée à la capacité de redémarrage de fourche par la RH.

L'utilisation du système *RTS1-RFB* permet non seulement d'étudier la dépendance génétique du redémarrage de fourche par la RH mais aussi d'identifier les événements moléculaires survenant sur le site de blocage et ses alentours. En effet, plusieurs techniques ont été développées au laboratoire pour : (i) suivre *in vivo* le devenir du *locus* au cours du cycle cellulaire par microscopie (*via* l'intégration d'un système rapporteur fluorescent à proximité de la RFB) (Figure 39b), (ii) étudier le recrutement de facteurs protéiques (par CHIP et microscopie), et (iii) analyser les intermédiaires de réplication générés sur les fourches bloquées (par 2DGE, pour *bidimensionnal gel electrophoresis*).

Le système *RTS1-RFB* au locus *ura4* se décline sous plusieurs constructions en fonction de l'orientation de la séquence *RTS1* et de l'allèle *ura4* utilisé (*ura4⁺* ou *ura4sdD20*) (Iraqi et al., 2012; Lambert et al., 2005, 2010; Tsang et al., 2014). Le principe de blocage de fourche reste exactement le même mais chaque construction permet d'adresser des questions avec de subtiles différences (voir Figure S1 de Ait-Saada et al., 2017 et Figure 1 de Silva-Teixeira et al., 2017).

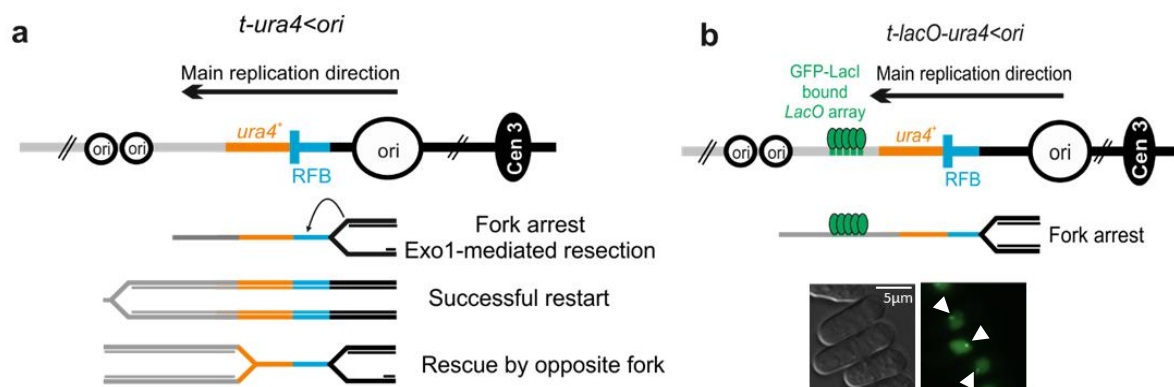


Figure 39 : Schéma du système RTS1-RFB. (a) Construction *t-ura4<ori*. « t » pour le côté télomérique, « < » pour *RTS1* et le sens du blocage de fourche, et « ori » pour l'origine représentée du côté centromérique. **(b)** Association du système décrit en (a) à un système rapporteur fluorescent représenté par les séquences *LacO* et la fixation de son répresseur *GFP-LacI*. L'introduction du système rapporteur à proximité de la barrière *RTS1* permet de visualiser la position de la *RFB* *in vivo* en suivant les foyers *GFP-LacI* (têtes de flèches blanches). Voir la section Résultats pour plus de détails.

Objectifs

Les cellules déficientes pour la RH présentent une forte propension à générer des défauts mitotiques de manière spontanée ou en réponse à des perturbateurs de la réplication exogène. Cependant, le mécanisme par lequel ces défauts sont générés en absence de la RH n'est pas bien appréhendé.

En utilisant un système de blocage de fourche conditionnel chez *S. pombe*, j'ai exploré le rôle de facteurs de la RH, Rad51 et Rad52, dans le maintien de l'intégrité des fourches de réplication et du lien que ça pouvait avoir sur la stabilité du génome. Pour cela, j'ai utilisé des approches de biologie moléculaire pour déchiffrer les événements qui s'opèrent au niveau des fourches de réplication bloquées en absence de Rad52/Rad51. J'ai également utilisé des approches de microscopie pour suivre le devenir de la fourche bloquée *in vivo* et corréler les événements se produisant en mitose avec ceux qui ont eu lieu à la phase S précédente. Enfin,

Dans l'ensemble, ce travail aide à mieux comprendre comment les cellules répondent au stress réplicatif qui peut conduire à une instabilité du génome.

Résultats

Les résultats obtenus au cours de ces mon doctorat sont organisés dans cette section en quatre parties :

- I. Les résultats sont présentés sous forme d'article intitulé : « *Unprotected Replication Forks Are Converted into Mitotic Sister Chromatid Bridges* ».
- II. Les résultats présentés dans cette partie concerne le projet de thèse défendu par Ana Teixeira-Silva, avec qui j'ai collaboré. Cette partie est également présentées sous forme d'article intitulé : « *The end-joining factor Ku acts in the end-resection of double strand break-free arrested replication forks* », que je signe en tant que deuxième auteure. Ces résultats sont nécessaires à la compréhension des questions posées dans la section III des résultats.
- III. Dans cette partie, je présente des données non publiées concernant la réversion des fourches de réplication bloquées
- IV. Je présente dans cette partie des résultats concernant le rôle de Fft3, un remodeleur de la chromatine chez *S. pombe* et homologue de Fun30 chez *S. cerevisiae*, au niveau des fourches de réplication bloquées. Ces travaux s'inscrivent dans le cadre d'une collaboration avec le laboratoire de Karl Ekwall (Karolinka Institute, Suède).

I. Les fourches de réplication non protégées sont converties en ponts mitotiques

1. Résumé

La RH tient un rôle central dans le maintien de la stabilité des génomes notamment au cours de la phase S en réponse au stress réplicatif. La RH est notamment impliquée dans la réactivation, la réparation et la protection des fourches de réplication entravées. Les cellules déficientes pour la RH sont caractérisées par un stress réplicatif chronique et une forte fréquence de défauts mitotiques. Ces deux caractéristiques sont liées car l'atténuation du stress réplicatif *via* une supplémentation de dNTP est suffisante pour éviter la formation de ces défauts. Cependant, le mécanisme sous-tendant la formation des défauts mitotiques en absence de la RH n'est pas complètement élucidé. Dans ce travail, le mécanisme par lequel la RH prévient les défauts mitotiques induits par le stress réplicatif a été exploré en utilisant le système *RTS1*-RFB. Ce projet est né suite à l'observation suivante : en absence des facteurs de la RH, Rad51/Rad52, une seule fourche de réplication bloquée est suffisante pour induire des défauts mitotiques incluant des ponts anaphasiques ressemblant à des UFBs et de l'aneuploïdie. Cette observation nous indique que le phénomène de convergence de fourche n'est pas suffisant pour les fourches de réplication bloquées en absence de la RH. A partir de là, nous nous sommes intéressés au devenir de la fourche dysfonctionnelle *in vivo* et aux événements moléculaires précurseurs de la non-disjonction des chromatides sœurs en mitose.

En combinant la barrière *RTS1* à un système rapporteur fluorescent (*LacO*/GFP-LacI) pour suivre le devenir de la RFB *in vivo*, nous avons montré que la fourche dysfonctionnelle, en absence de Rad51/Rad52, est convertie en ponts anaphasiques recouverts par RPA. Il s'avère que l'ADNsb observé en mitose provient de la phase S précédente. En effet, l'intégrité des fourches de réplication est compromise à cause d'une dégradation non contrôlée des brins néo-synthétisés par la nucléase Exo1 en absence des facteurs de la RH. De manière intéressante, la formation de ponts anaphasiques est corrélée à la persistance d'ADNsb en

amont de la fourche bloquée et reflète vraisemblablement des évènements de terminaisons pathologiques dues à l'excès d'ADNsb. L'utilisation d'un mutant de séparation de fonction de Rad51 (Rad51-3A) a permis de montrer que la capacité de la recombinaise à former un nucléofilament est suffisante pour assurer la terminaison de la réplication par l'arrivée de la fourche convergente. Ces résultats mettent en exergue la fonction importante de la RH dans le maintien de la stabilité génétique en réponse au stress réplcatif : sa fonction de protection de fourche lorsqu'une fourche convergente est disponible.

Ainsi, ces travaux mettent en évidence deux rôles de la RH en réponse au blocage de fourches : (i) le redémarrage des fourches dysfonctionnelles et (ii) leur protection pour assurer la fusion de la fourche bloquée avec la fourche convergente. Ces deux fonctions sont génétiquement séparables. En absence de protection des fourches, les cellules souffrent de défauts de terminaison de la réplication qui conduisent à une non-disjonction de chromatides sœur et la formation de ponts anaphasiques.

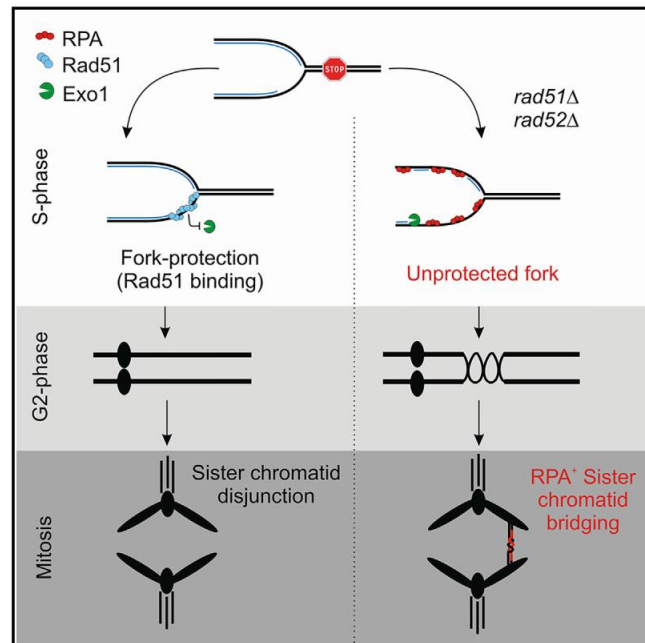
2. Publication #1

Unprotected replication forks are converted into mitotic sister chromatid bridges

Molecular Cell

Unprotected Replication Forks Are Converted into Mitotic Sister Chromatid Bridges

Graphical Abstract



Authors

Anissia Ait Saada, Ana Teixeira-Silva, Ismail Iraqui, ..., Giulia Paoletti, Karine Fréon, Sarah A.E. Lambert

Correspondence

sarah.lambert@curie.fr

In Brief

Recombination factors protect replication forks from degradation. Ait Saada et al. now show that fission yeast Rad52/Rad51 protect forks in a recombination-independent manner. Unprotected forks challenge replication termination and are converted into mitotic sister chromatid bridges.

Highlights

- Unprotected terminally arrested forks are converted into anaphase bridges
- Rad51 restrains Exo1 at arrested forks in a recombination-independent manner
- Rescuing an arrested fork by a converging fork requires Rad51-mediated protection
- Excess ssDNA at unprotected forks causes sister chromatid bridging and breakage



Ait Saada et al., 2017, Molecular Cell 66, 398–410
 May 4, 2017 © 2017 Elsevier Inc.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.molcel.2017.04.002>

CellPress

Unprotected Replication Forks Are Converted into Mitotic Sister Chromatid Bridges

Anissia Ait Saada,^{1,2,3} Ana Teixeira-Silva,^{1,2,3} Ismail Iraqui,^{1,2,3} Audrey Costes,^{1,2,3} Julien Hardy,^{1,2,3} Giulia Paoletti,⁴ Karine Fréon,^{1,2,3} and Sarah A.E. Lambert^{1,2,3,5,*}

¹Institut Curie, PSL Research University

²University Paris Sud, Paris-Saclay University
CNRS, UMR3348, F-91405 Orsay, France

³Labeled Team Fondation pour la Recherche Médicale, UMR3348, F-91405 Orsay, France

⁴Institut Curie, PSL Research University, CNRS, UMR144, F-75248 Paris, France

⁵Lead Contact

*Correspondence: sarah.lambert@curie.fr

<http://dx.doi.org/10.1016/j.molcel.2017.04.002>

SUMMARY

Replication stress and mitotic abnormalities are key features of cancer cells. Temporarily paused forks are stabilized by the intra-S phase checkpoint and protected by the association of Rad51, which prevents Mre11-dependent resection. However, if a fork becomes dysfunctional and cannot resume, this terminally arrested fork is rescued by a converging fork to avoid unreplicated parental DNA during mitosis. Alternatively, dysfunctional forks are restarted by homologous recombination. Using fission yeast, we report that Rad52 and the DNA binding activity of Rad51, but not its strand-exchange activity, act to protect terminally arrested forks from unrestrained Exo1-nucleolytic activity. In the absence of recombination proteins, large ssDNA gaps, up to 3 kb long, occur behind terminally arrested forks, preventing efficient fork merging and leading to mitotic sister chromatid bridging. Thus, Rad52 and Rad51 prevent temporarily and terminally arrested forks from degrading and, despite the availability of converging forks, converting to anaphase bridges causing aneuploidy and cell death.

INTRODUCTION

The completion of eukaryotic DNA replication requires the sequential activation of replication origins and the merging of converging forks. A failure to complete DNA replication before mitosis results in the nondisjunction of sister chromatids and the formation of anaphase bridges through a variety of poorly defined mechanisms (Magdalou et al., 2014; Mankouri et al., 2013). DNA replication completion is continuously threatened by a broad spectrum of unavoidable replication fork barriers (RFBs). RFBs are caused by intrinsic chromosomal features (such as DNA sequence and chromatin), endogenous stress

linked to cellular metabolism (such as transcription), and environmental factors including DNA damage (Lambert and Carr, 2013). RFBs interrupt replication fork elongation, often causing multiple temporary pauses to a single replisome and occasionally causing terminal fork arrest. To avoid these perturbations creating chromosomal aberrations, additional replication-based pathways have evolved to ensure DNA replication completion and, thus, genome stability maintenance.

Stressed replication forks can be either temporarily or terminally arrested. When a fork initially slows down or arrests, it is immediately subject to regulation by the intra-S phase checkpoint. The S phase checkpoint acts to maintain both replisomes and fork structures in a replication-competent state, for example by limiting Exo1 nuclease activity (Berti and Vindigni, 2016; Cotta-Ramusino et al., 2005; Tsang et al., 2014). Thus, the majority of forks can resume replication after the initial blockage is resolved. In some instances, a replication fork will not be able to resume. For example, if the intra-S phase checkpoint fails, replication forks become dysfunctional and eventually terminally arrested; such forks are referred to as collapsed forks. To accommodate the problems caused by replication stress, cells thus exploit several mechanisms to ensure replication is completed in a timely manner (Berti and Vindigni, 2016). First, eukaryotic genomes contain a large excess of replication origins that buffer the consequences of fork arrest: a converging fork can arise from an adjacent dormant origin and merge with an arrested fork (Blow et al., 2011; Ge et al., 2007; Kawabata et al., 2011; Sabatinos et al., 2015; Woodward et al., 2006). Alternatively, when a converging fork is not available in a timely manner, terminally arrested forks can be reactivated by DNA repair pathways such as homologous recombination (HR). These compensatory mechanisms are crucial for cellular resistance to replication stress and prevent the persistence of unreplicated parental DNA into mitosis.

When replication is perturbed experimentally, the mitotic consequences are expressed most obviously at common fragile sites (CFSs). CFSs were initially defined as genomic loci prone to chromosome breakage when cells are exposed to mild replication stress (Glover et al., 1984). CFSs have subsequently been shown to be hotspots for chromosomal rearrangement in cancer cells (Le Tallec et al., 2011, 2013). Many CFSs replicate late in

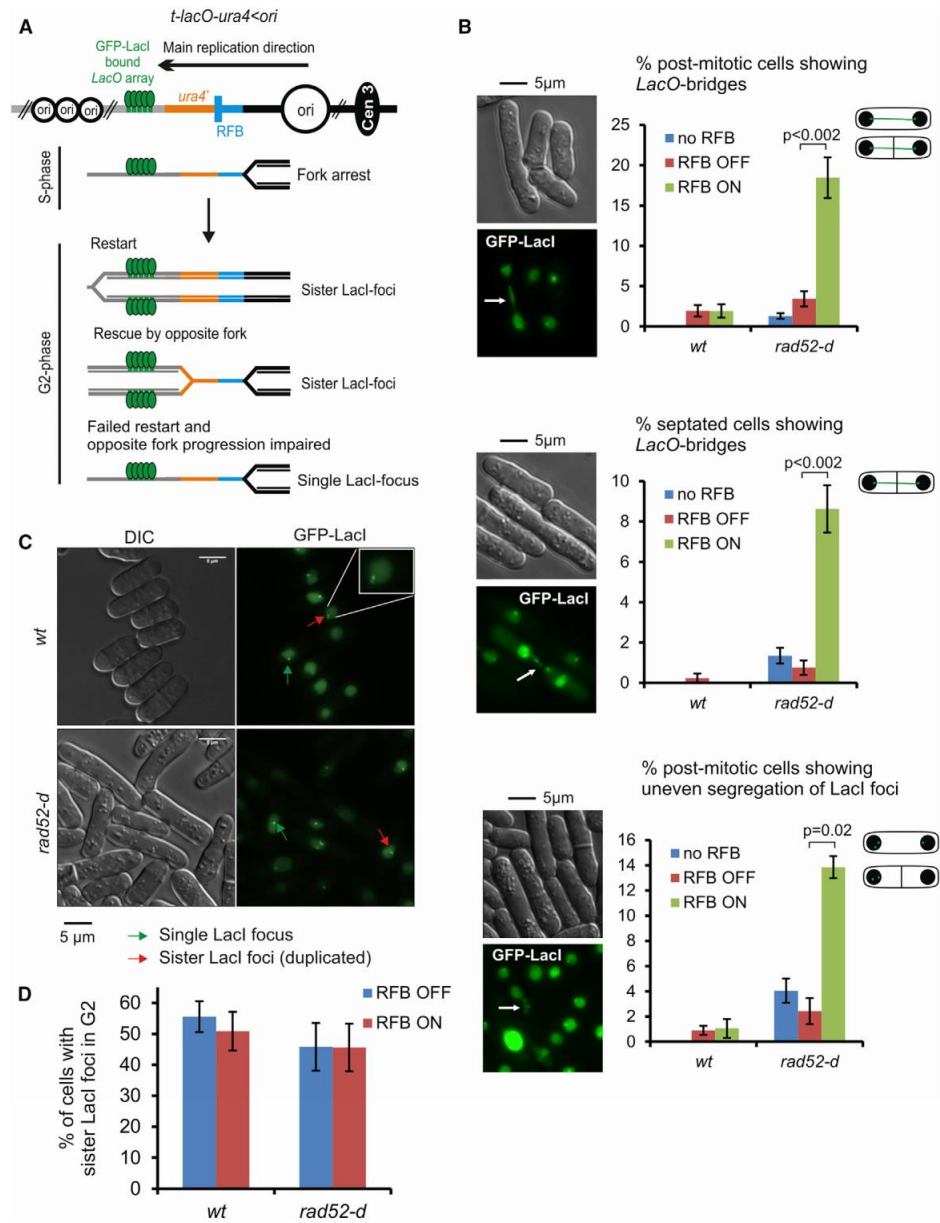


Figure 1. A Single Terminal Fork Arrest Requires Rad52 for Rescue by the Opposite Fork

(A) Diagram of the *t-LacO-ura4<ori* construct containing a single RTS1-RFB (< and blue bars) blocking the progression of replication forks moving in the main replication direction, from the centromere toward the telomere. Main replication origins (*ori*, black circles) located upstream and downstream of the RTS1-RFB are indicated. GFP-LacI (green ellipses) bound to LacO arrays (green bars) are integrated ~7 kb away from the RTS1-RFB, on the telomere-proximal side of the *ura4* gene (red bar). When Rtf1 is expressed, >90% of forks emanating from the strong centromere-proximal replication origin, and moving toward the telomere, are blocked. In the absence of homologous recombination, forks blocked at the RTS1-RFB are irreversibly arrested. The replication of LacO arrays, either through

(legend continued on next page)

S phase, and it has been demonstrated that their replication can be further delayed by mild replication stress (Debatisse et al., 2012). To date, it has not been possible to define a common cause for all fragile sites. Recent models suggest that CFS instability results from a paucity of replication origins combined with difficult to replicate features, such as refractory DNA sequences or extremely long transcriptional units (Helmrich et al., 2011; Letessier et al., 2011; Ozeri-Galai et al., 2011). In this interpretation, CFS loci cannot compensate for temporarily paused or terminally arrested forks by activating dormant origins. Thus, cells are prone to enter mitosis with partially replicated DNA at these loci (Debatisse et al., 2012; Mankouri et al., 2013). Attempting mitosis with unreplicated DNA regions results in the formation of ultrafine bridges (UFBs) during anaphase (Chan et al., 2009; Naim and Rosselli, 2009). UFBs consist of stretched DNA structures coated with PICH (PIK1-interaction checkpoint helicase) and the single-stranded DNA protein RPA (replication protein A) (Chan et al., 2007). Thus, replication-stress-induced UFBs are thought to contain ssDNA originating from incomplete replication of CFSs. UFB-like structures have been also described in yeast models, as a consequence of disturbed DNA replication (Germann et al., 2014; Sabatinos et al., 2015; Sofueva et al., 2011).

Maintaining replication fidelity relies on close links between the replication machinery and HR. The core of HR is the Rad51 recombinase, which forms filaments on ssDNA and mediates invasion of the ssDNA into a homologous duplex. In yeasts, Rad51 association with ssDNA requires the Rad52 loader, while in mammalian cells, this role is primarily performed by the tumor suppressor BRCA2 (Costes and Lambert, 2012). Historically, HR has been studied in the context of double-strand break (DSB) repair, but more recently, HR proteins have been shown to play critical roles in maintaining genome integrity during DNA replication, these replicative functions being independent of DSB repair (Carr and Lambert, 2013; Petermann et al., 2010; Schlacher et al., 2011). HR proteins contribute to the robustness of DNA replication in several ways: (1) BRCA2, Rad52, and Rad51 protect nascent strands of stalled forks, checkpoint stabilized, from Mre11-dependent resection (Hashimoto et al., 2010; Higgs et al., 2015; Schlacher et al., 2011); (2) in some circumstances, Rad51 participates in the remodeling of stressed forks to promote fork reversal, a process that is proposed to promote DNA lesions bypass or replication resumption (Zellweger et al., 2015); (3) when forks become dysfunctional, HR proteins restart forks that likely result in the construction of a new replisome (Hashimoto et al., 2011; Iraqi et al., 2012; Miyabe et al., 2015; Mizuno et al., 2013; Petermann et al., 2010).

Using a site-specific RFB in fission yeast, we followed in vivo the fate of a single terminally arrested fork in the absence of HR. Contrary to our expectations, we found that, despite the apparent progression of converging forks, this single terminally arrested fork is converted into an anaphase bridge resembling a UFB. We show that the binding of Rad51, but not its strand-exchange activity, is required to restrict Exo1-mediated fork resection. This function is independent of the previously described roles for Rad51 in replication fork restart. We further demonstrate that the excess ssDNA at terminally arrested forks is the cause of sister chromatid bridging, which subsequently results in aneuploidy. We propose that the merging of a converging fork with an unprotected terminally arrested fork results in termination failure and subsequent UFB formation during mitosis. Our data reveal a new role for Rad51-mediated fork protection that ensures the rescue of arrested forks by an incoming converging fork.

RESULTS

To assess the role of arrested forks in replication-stress-induced mitotic abnormalities, we exploited a conditional RFB, *RTS1*, to block the replisome in a polar manner at a defined locus (Figure 1A; Figure S1A). In the *RTS1* system, fork arrest is mediated by the *RTS1*-bound protein Rtf1, the expression of which is regulated by the *nmt41* promoter. Rtf1 induction results in >90% of forks becoming blocked at the *RTS1*-RFB (Lambert et al., 2005). Arrested forks are resolved by a converging fork or restarted by HR within 20 min (Miyabe et al., 2015; Nguyen et al., 2015). Restart occurs through the generation of a ssDNA gap, which is subsequently coated with Rad51 recombinase (through its loader Rad52), which, following strand invasion, restarts replication (Mizuno et al., 2013; Tsang et al., 2014). The restarted replisome is associated to a nonprocessive DNA synthesis, with polymerase delta replicating both strands, and is thus likely mechanistically different from an unperturbed replisome and insensitive to the RFB (Miyabe et al., 2015). In the absence of either Rad52 or Rad51, forks arrested at the *RTS1*-RFB cannot restart and thus remain irreversibly arrested (Lambert et al., 2010; Mizuno et al., 2009).

Rad52 Prevents a Single Terminally Arrested Fork from Generating an Anaphase Bridge and Aneuploidy

We have previously demonstrated that the $t\text{-}ura4\text{-}ori$ construct blocks the two replisomes converging on the *ura4* locus (t = telomere-proximal; chevrons represent the presence and directionality of the *RTS1* barrier; *ori* indicates the location of the closest origin). Wild-type (WT) cells overcome the potential inability to

the progression of forks restarted by homologous recombination or by opposite forks, results in sister Lacl foci in G2 cells. A failure of opposite forks to progress would result in a lower frequency of sister Lacl foci. See Figure S1 for more details.

(B) Quantification and representative examples of mitotic abnormalities (indicated by a white arrow). Values are means of at least three independent experiments \pm SEM. Statistical analysis was performed with Mann-Whitney U tests.

(C) Example of cells showing a single Lacl focus (green arrow) and sister Lacl foci (red arrow).

(D) Quantification of cells with sister Lacl foci in G2. Values are means of at least three independent experiments \pm SEM. No statistical differences were observed between WT and *rad52-d* cells upon induction of the *RTS1*-RFB, indicating a similar efficiency and timing of LacO arrays replication. These data demonstrate that replication forks traveling from the telomere-proximal side of the *RTS1*-RFB toward the centromere are not altered in the absence of homologous recombination. Strains used include the following: WT, AA23; *rad52-d*, AA1.

replicate the 1.7 kb *ura4* locus by restarting one or both forks via HR. Because the two *RTS1* sequences are present in an inverted orientation on either side of *ura4*, occasional erroneous (ectopic) strand invasion events result in aberrant chromosome configurations, specifically acentric and dicentric chromosomes (Lambert et al., 2010; Mizuno et al., 2009). Visualizing mitosis in these cells reveals abnormal chromosome segregation events expected from dicentric chromosome segregation (Figure S1). Our initial expectation was thus that, when HR was prevented by the deletion of *rad52*, acentric and dicentric chromosomes would not be present, and thus, these structural mitotic abnormalities would be lost. However, in *rad52-d* cells, we still observed DNA bridges with multiple discontinuities, suggesting breakage and uneven segregation of nuclei, resulting in aneuploidy (Figure S1).

In *rad51-d* or *rad52-d* cells, replication cannot restart from blocked replisomes (Iraqui et al., 2012; Lambert et al., 2010). Thus, mitotic defects presumably reflect the persistence of unreplicated parental DNA at the *ura4* locus when cells enter mitosis, a situation reminiscent of human CFSs. Therefore, our prediction was that, if replication could be completed by a converging fork, the remaining single terminally arrested fork would not prevent the completion of replication, and correct mitotic segregation would be restored. To allow the fork moving toward the centromere to reach the terminally arrested fork at the centromere-proximal *RTS1*-RFB, the telomere-proximal *RTS1*-RFB was deleted (*t-ura4<ori* locus) (Figure S1A). Surprisingly, mitotic abnormalities, including discontinuous DNA bridges, were still observed in both *rad52-d* and *rad51-d* cells, whereas these defects were not present in WT cells, in which acentric and dicentric chromosomes no longer formed (Figure S1C).

Dynamic of Anaphase Bridges Containing the Active *RTS1*-RFB

To investigate whether the mitotic bridges contained the active RFB site, we integrated a *LacO* array telomere-proximal to the RFB (*t-LacO-ura4<ori* Figure 1A). We tracked the fate of the single terminally arrested fork locus in vivo by visualizing *LacO*-bound GFP-LacI. Because LacI binding to *LacO* arrays can impede fork progression, we exploited a LacI variant with which fork perturbation is avoided, but LacI foci can be detected (Dubarry et al., 2011). In the absence of an active *RTS1*-RFB, *LacO*-mitotic bridges were observed in <2% of WT and *rad52-d* cells. Thus, LacI binding had a minimal impact on fork progression (Figure 1B). In contrast, *RTS1*-RFB induction resulted in the formation of mitotic *LacO*-positive bridges in ~20% of post-mitotic cells, in *rad52-d* but not WT cells (Figure 1B, top panel). Thus, mitotic bridges contain the site of fork arrest surrounded by dsDNA. A proportion of the *LacO*-bridges were long lived, persisting through cytokinesis (Figure 1B, middle panel). Interestingly, ~14% of post-mitotic cells displayed uneven LacI focus segregation in *rad52-d* cells, suggesting breakage of *LacO*-bridges (Figure 1B, bottom panel).

We confirmed that a converging fork could reach the terminally arrested fork at the *RTS1*-RFB by monitoring the duplication of the *LacO* arrays by analyzing single and sister LacI foci in G2 cells (Figures 1C and 1D). Similar frequencies of sister LacI foci were observed regardless of RFB activity and HR status. Thus,

LacO-bridges resulting from terminally arrested forks were not a consequence of the failed progression of converging forks. Thus, Rad52 prevents the aberrant segregation of a replication stress site and ensures its balanced transmission to daughter cells.

To investigate the dynamics of *LacO*-bridge formation and resolution, we performed time-lapse microscopy. In WT cells, *LacO*-bridges were transient and resolved within 10 min of anaphase onset (Figures 2A and 2B). This rapid dynamic likely accounts for low levels of *LacO*-bridges, as observed by snapshot microscopy. Furthermore, the *t-LacO-ura4<ori* locus is ~700 kb from the rDNA locus, and the *LacO*-bridges in WT cells may thus reflect the late mitotic segregation of rDNA units (Granot and Snyder, 1991; Win et al., 2005). In contrast, in *rad52-d* cells, ~90% of anaphases displayed a *LacO*-bridge, with 67% of these remaining unresolved 10 min after anaphase onset. Analysis of individual *LacO*-bridges showed that ~20% broke either before or at the onset of cytokinesis (Figures 2B and 2C; Figure S2A; Movie S1).

GFP-LacI binds *LacO* arrays when double stranded. We tried to stain *LacO*-bridges with DNA dye. Surprisingly, stretched *LacO*-bridges were not positively stained with Hoechst, whereas broken *LacO*-bridges showed positive Hoechst staining (Figure S2B). Possibly, *LacO* arrays are refractory to DNA dye staining because of stretching, which is relaxed when bridges break. Thus, the discontinuous bridges observed by Dapi staining were likely broken bridges (Figure S1).

We conclude that, without Rad52, a single terminally arrested fork is converted into an anaphase bridge, resembling human UFB, which often breaks during mitosis. This occurs despite the availability of converging forks and an apparent absence of unreplicated parental DNA downstream of the site of replication stress.

Rad52 Protects the Integrity of Arrested Forks by Restricting Exo1 Activity

To determine the integrity of forks terminally arrested, we defined the extent of ssDNA exposed in the vicinity of the *RTS1*-RFB. We have previously shown that replication restart at the *RTS1*-RFB is not initiated by a DSB, but by a ssDNA gap formed in an Exo1-dependent and Mre11-nuclease-activity-independent manner (Figure 3A) (Tsang et al., 2014). Consistent with this, RPA recruitment extended ~1 kb upstream of the arrested fork, and RPA recruitment was significantly reduced in *exo1-d* cells (Figure 3B, blue and black lines). When *rad52* was deleted, RPA recruitment extended further upstream of the *RTS1*-RFB (>3 kb), suggesting an accumulation of ssDNA compared to WT (Figure 3B, red line). Importantly, the excess RPA recruitment in *rad52-d* cells occurred exclusively upstream of the site of fork arrest. Using a qPCR assay to directly monitor ssDNA, we confirmed that excess RPA recruitment reflected the accumulation of ssDNA (Figure 3C). In WT cells, ssDNA was enriched 110 and 450 bp upstream of the *RTS1*-RFB, but no enrichment above background levels (RFB OFF condition) was observed at 1.8 and 2.2 kb. Consistent with the RPA ChIP data, ssDNA enrichment at 450 bp, but not at 110 bp, was Exo1 dependent. This suggests that additional nucleases are able to generate small ssDNA gaps at terminally arrested forks. Due to technical

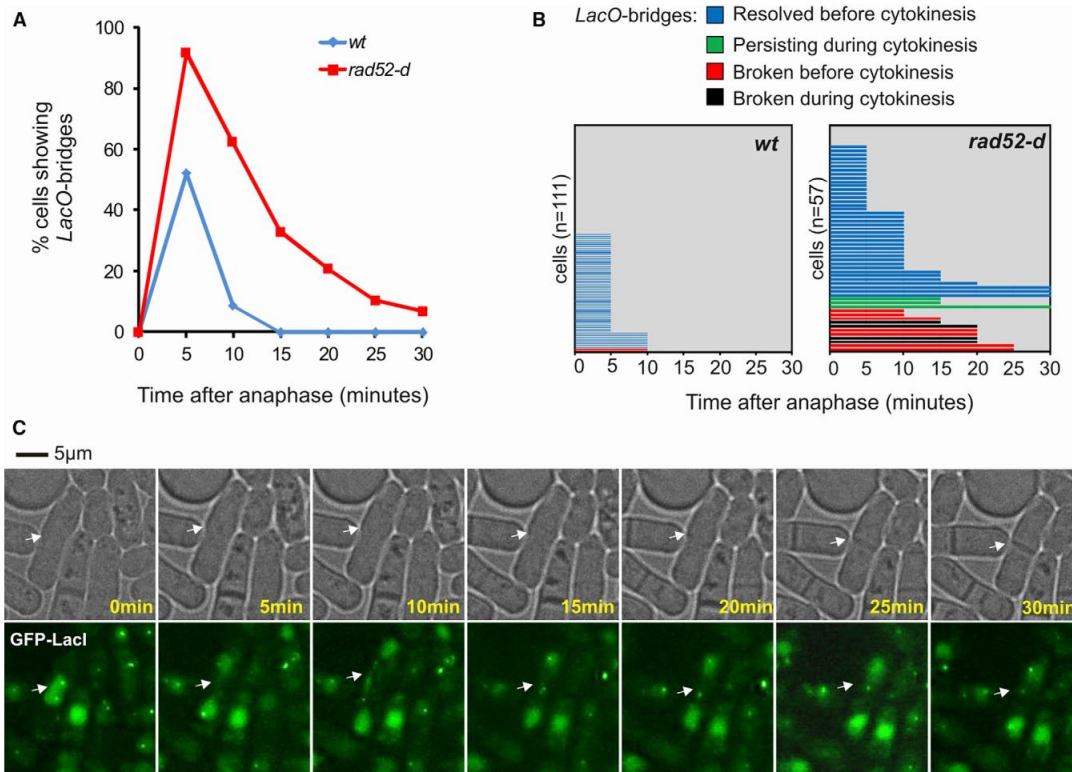


Figure 2. Upon Activation of the RTS1-RFB, Anaphase Bridges Containing Terminal Polar Fork Arrests Break during Progression through Mitosis

(A) Temporal kinetics of mitotic bridge formation and resolution in the first 30 min after early anaphase, from time-lapse movies.

(B) Tracking of individual LacO-bridges during mitotic progression and cytokinesis, from time-lapse movies.

(C) Example of anaphase bridges (white arrow) breaking during cytokinesis. See Figure S2 for additional examples.

Strains used include the following: WT, AA23; rad52-d, AA1.

problems related to primer design and efficiency, we were unable to assess the ssDNA amount between 450 bp and 1.8 kb. In the absence of Rad52, the enrichment in ssDNA was clearly observed at 1.8 and 2.2 kb upstream of the RTS1-RFB. The difference in ssDNA accumulation between WT and *rad52-d* cells was specific to the active RTS1-RFB, since no significant differences were observed at the control locus (Figure 3C).

To establish that ssDNA enrichment corresponded to arrested replication forks containing large ssDNA gaps, we analyzed replication intermediates using two-dimensional gel electrophoresis (2DGE). A tail emanating from the fork-arrest signal and descending toward the linear arc was observed in WT cells and was absent in *exo1-d* cells (Figures 3D–3F). Alkaline 2DGE confirmed that this tail signal corresponded to Exo1-mediated resection of newly replicated strands (Figures S3A and S3B). Thus, this replication intermediate was generated by the resection of unbroken forks. Consistent with the RPA ChIP and ssDNA enrichment assays, more resected forks were present in *rad52-d*

cells (Figures 3E and 3F). Thus, Rad52 has the replication-specific function of limiting resection of nascent DNA at terminally arrested forks, primarily by restricting the formation of large ssDNA gaps. This terminal-fork-protection function of Rad52 likely allows replication termination, thus preventing subsequent anaphase bridge formation and chromosome breakage. Taken together, our data suggest that the progression of a converging fork toward an unprotected terminally arrested fork creates failure in termination, which cannot be resolved before the onset of mitosis.

Failed Merging of Unprotected Terminally Arrested and Converging Forks Drives Mitotic Sister Chromatid Bridging

If converging forks cannot effectively merge with unprotected terminally arrested forks, large ssDNA gaps at such forks should persist into mitosis and correlate with LacO-bridge formation. We used fluorescence microscopy to monitor RPA recruitment

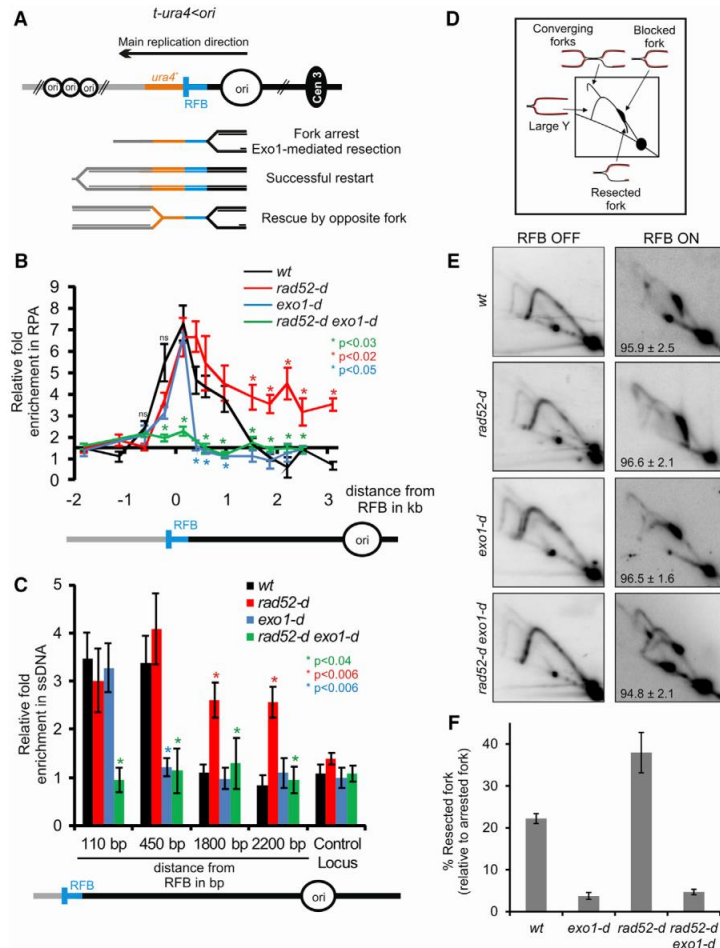


Figure 3. Rad52 Restricts Exo1-Mediated Resection of Unbroken Forks

(A) Diagram of the *t-ura4<ori* construct containing a single RTS1-RFB. See Figure 1 for details.

(B) Analysis of RPA recruitment to the active RTS1-RFB, based on chromatin immunoprecipitation (ChIP). The fold enrichment in RPA in the ON condition (RFB active) relative to the OFF condition (RFB inactive) is shown. Upstream and downstream distances from the RFB are indicated in kilobases (kb). Values are means of at least three independent experiments ± SEM. Statistical analysis was performed using Mann-Whitney U tests. Strains used include the following: WT, YC219; *rad52-d*, YC223; *exo1-d*, YC221; *rad52-d exo1-d*, AC434.

(C) Analysis of ssDNA levels upstream of the active RTS1-RFB, by qPCR. The data shown are the fold enrichment in ssDNA in ON condition (RFB active) relative to OFF condition (RFB inactive). Distances upstream of the RFB are indicated in base pairs (bp). A locus located on chromosome II is used as a control. Values are means of at least three independent experiments ± SEM. Statistical analysis was performed with Mann-Whitney U tests. Strains used include the following: WT, YC13; *rad52-d*, YC90; *exo1-d*, II258; *rad52-d exo1-d*, AA15.

(D) Scheme of replication intermediates (RIs) observed in a neutral-neutral 2DGE analysis of the *Asel* restriction fragment upon activation of the RTS1-RFB. See Figures S3A and S3B for neutral-neutral 2DGE analysis demonstrating that the tail signal contains newly replicated strands undergoing Exo1-mediated degradation.

(E) Representative RI analysis by 2DGE in the absence (RFB OFF) or presence of fork blockade (RFB ON). A DNA fragment corresponding to the *ura4* gene was used as probe. Numbers indicate the efficiency of the RFB for each strain analyzed; values are means of at least three independent experiments ± SD. Strains used include the following: WT, YC13; *rad52-d*, YC90; *exo1-d*, II258; *rad52-d exo1-d*, AA15. See Figure S3C for the *rad52-d rad50-d* double mutant.

(F) Quantification of percentage of forks undergoing resection (tail signals) relative to the number of blocked forks. Values are means of at least three independent experiments ± the 99% confidence interval (99% CI).

to the RTS1-RFB during cell cycle. GFP-LacI and RPA foci mark dsDNA downstream and ssDNA upstream of the RFB, respectively. A RPA focus is thus expected to be adjacent or in close proximity to a GFP-LacI focus. We considered RPA being recruited to the RTS1-RFB when a RPA focus is touching or merging fully or partially with a GFP-LacI focus (Figure 4A; Figure S4A). In WT cells, RPA was transiently recruited to active RFBs in S phase cells, in an Exo1-dependent manner, and then evicted in G2 cells (Figures 4A and 4B). We interpret this as reflecting transient RPA recruitment to resected forks, followed by efficient replication restart or merging with the converging fork. Without Rad52, we observed an increased number of cells showing RPA recruitment to active RFBs, in S and G2 phases. This is consistent with ssDNA gaps at terminally arrested forks remaining unrepaired during the transition from S to G2 phase. Further-

more, >90% of mitotic LacO-bridges were positively stained for RPA, consistent with RPA recruited in S phase remaining associated with large ssDNA gaps at terminally arrested forks when cells enter mitosis (Figure 4C; Figure S4B).

We followed the dynamic RPA recruitment to terminally arrested forks by time-lapse microscopy. Approximately 50% of LacO-bridges arose in cells in which RPA and LacI were co-recruited in the preceding G2 phase. Furthermore, ~60% of LacO-bridges arose in cells that displayed RPA foci at the nexus of the two nuclei in early anaphase (with or without merging with a LacI focus) (Figures 4D and 4E; Figure S4; Movie S2). We conclude that UFB-like LacO-bridges result from and contain unprotected terminally arrested forks. Thus, terminally arrested forks, which are not protected by Rad52, are subsequently converted into UFB-like structures in mitosis.

In most cases, RPA staining of anaphase bridges was symmetric, covering almost all *LacO*-bridges (Figure 4C; Figure S4B). This suggests that both sister chromatids had undergone resection upstream of the RFB and remain physically associated in mitosis. Thus, *LacO*-bridges are apparently formed of unresolved intertwined sister chromatids: each chromatid contains dsDNA marked by *LacO* arrays and ssDNA marked by RPA (Figure 4F). Our data indicate that converging forks are able to reach unprotected forks, with an apparent absence of unreplicated parental DNA downstream of the RFB. Thus, we propose that intertwined sister chromatids arise from termination failure rather than failure in completing replication. Furthermore, Hoechst staining failed to detectably stain telomere-proximal regions at the metaphase plan in mitosis showing *LacO*-bridges (Figure S2B). Altogether, our data suggest that an unprotected terminally arrested fork cannot merge accurately with a converging fork. This failure in fork merging results in intertwined sister chromatids resembling UFBs.

Excess ssDNA at Terminally Arrested Forks Causes Lethal UFBs and Enhanced Genetic Instability

We asked whether excess ssDNA is responsible for termination failure. We reported that Rad52 recruitment to the *RTS1*-RFB requires the MRN complex (Tsang et al., 2014). We analyzed the resection of terminally arrested forks in the *rad52-d rad50-d* double mutant and found that the lack of Rad50 was not sufficient to fully abolish fork resection (Figure S3C). We thus focus on the role of Exo1.

The deletion of *exo1* in *rad52-d* cells was sufficient to alleviate extended RPA recruitment, ssDNA formation upstream of the active *RTS1*-RFB, and fully abolished fork resection (Figures 3B, green line, and 3C–3F). Consistent with this, RPA foci were not corecruited to the *RTS1*-RFB in either S or G2 phase in *exo1-d rad52-d* cells (Figure 4B). Surprisingly, the short ssDNA gaps of fewer than 450 bp that are not Exo1-dependent in WT cells were not observed in *rad52-d exo1-d* cells (Figures 3B and 3C). Our interpretation of this is that Rad52-dependent HR processes restrict Exo1 activity at terminally arrested forks, while also acting to promote limited resection by additional nucleases. Thus, the absence of Exo1 restores the integrity of terminally arrested forks, although they remain unable to restart replication. If the RPA-coated ssDNA gaps at terminally arrested forks are responsible for sister chromatid nondisjunction, concomitant *rad52* and *exo1* deletion should be sufficient to alleviate the formation of UFB-like structures.

The high frequency of UFB-like structures (mitotic *LacO*-bridges) observed upon activation of the *RTS1*-RFB was greatly reduced in double-mutant cells (Figure 5A, left panel), confirming the interdependency of ssDNA gaps and subsequent anaphase bridge formation. This suppression effect did not result from an inability of cells to enter mitosis (Figure S3D). Interestingly, while the unbalanced segregation of *LacI* foci observed in *rad52-d* cells also decreased upon concomitant *exo1* deletion, it was reduced by only 34% (Figure 5A, right panel). Thus, terminally arrested forks, even if protected against Exo1 activity, remain unstable. We tested the genetic instability of *ura4*⁺, located upstream of the RFB. Loss of *rad52* resulted in

an increased RFB-dependent rate of *ura4* loss, which was relieved by the concomitant loss of *exo1* (Figures 5B and 5C). Thus, excess RPA-coated ssDNA at stressed forks is responsible for sister chromatid nondisjunction and elevated genetic instability, immediately upstream of the site of fork arrest. We also observed that activation of the *RTS1*-RFB decreased the viability of *rad52-d* cells, and that this loss of viability was rescued by deleting *exo1* (Figure 5D). These data indicate that pathological termination between unprotected terminally arrested forks and converging forks results in lethal UFB-like structures that contribute to genomic instability.

Rad51 Binding Activity Is Sufficient to Prevent Pathological Termination at Terminally Arrested Forks

Our data, together with previously published work, suggest that dysfunctional forks can either be rescued by a converging fork or restarted. Both processes require Rad52. To investigate the interdependence of fork-protection and fork-restart functions, we replaced *rad51*⁺ with the mutated *rad51-3A* form (R152A-R324A-K334A). The mutant protein can bind ssDNA and dsDNA and form stable nucleoprotein filaments on ssDNA, but cannot perform the strand-exchange reaction (Cloud et al., 2012). Rad51-3A was expressed to the same level as Rad51 (Figure S5A). *rad51-3A* cells were defective for spontaneous gene conversion and were equally as sensitive to bleomycin and MMS treatments as *rad51-d* cells (Figure 6A; Figures S5B and S5C). Rad51-3A formed foci in response to MMS and was recruited to the active *RTS1*-RFB, similarly to Rad51 (Figures S5D and S5E).

To investigate the impact of Rad51-3A on replication restart, we exploited a reporter gene (*ura4-sd20*) (Iraqi et al., 2012). In this assay, the *ura4-sd20* allele is downstream of the *RTS1*-RFB and can be used to monitor the frequency of forks restarted at the *RTS1*-RFB based on the restoration of a functional *ura4* gene (Figure 6B). The effectiveness of replication slippage was decreased by ~60% in both *rad51-3A* and *rad51-d* cells, demonstrating the requirement of Rad51 strand-exchange activity to promote fork restart (Figure 6C). Thus, Rad51 foci can occur in response to replication stress, without an effective HR event at the site of fork arrest.

To investigate the impact of Rad51-3A on fork protection, we utilized the 2DGE resection assay described in Figure 3E, the frequency of *LacO*-bridges, and the uneven segregation of the *LacO* locus. As previously observed for *rad52-d* cells, terminally arrested forks were extensively resected and converted into UFB-like structures in the absence of Rad51 (Figures 6D and 6E). Thus, fork protection to prevent pathological termination requires both the recombinase Rad51 and its loader Rad52. In contrast, cells expressing Rad51-3A displayed none of these pathological features upon activation of the *RTS1*-RFB, demonstrating the requirement of Rad51 binding activity, but not its strand-exchange activity, for fork protection (Figures 6D and 6E). Thus, extensive degradation of terminally arrested forks in the absence of Rad52/Rad51 proteins is not simply a consequence of defective fork restart: the role of Rad51 in protecting terminally arrested replication forks is genetically separable from its function in restarting forks.

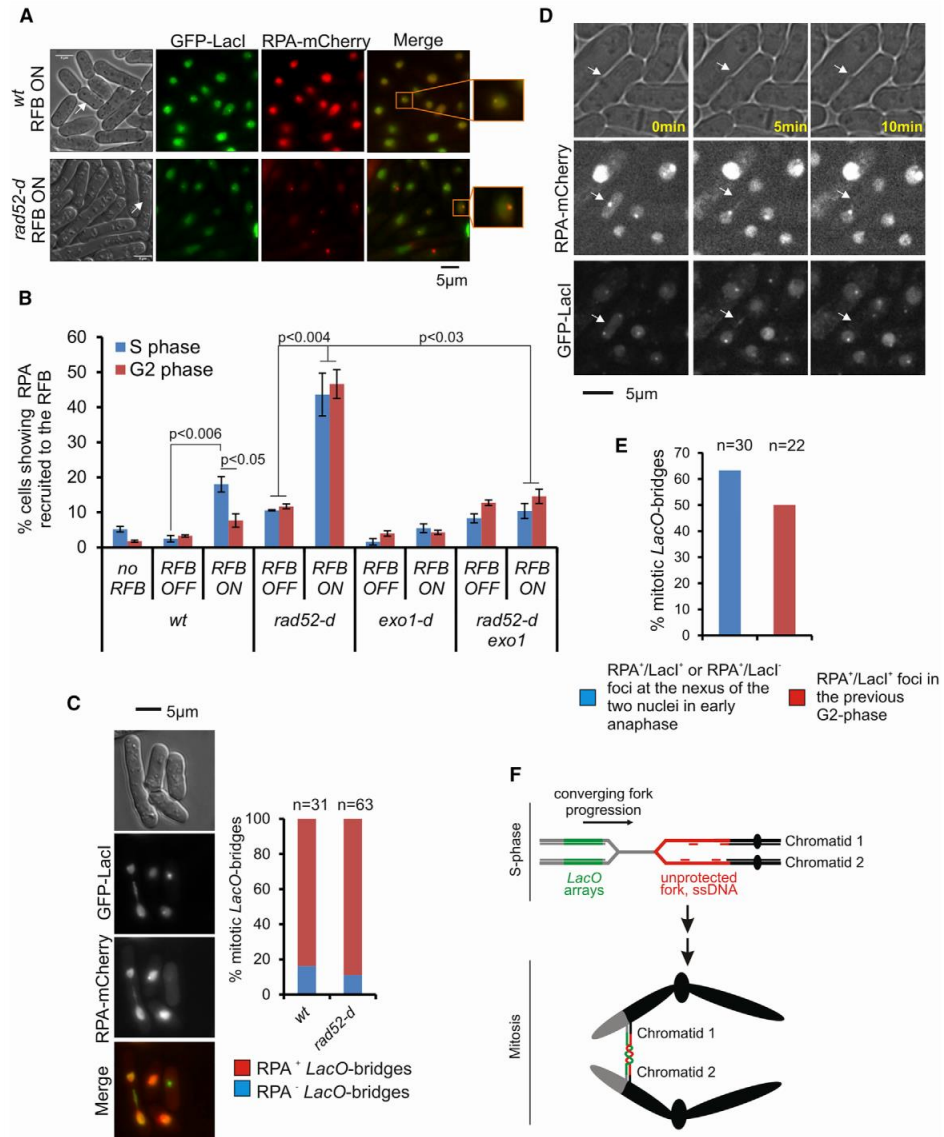


Figure 4. Anaphase Bridges Are RPA-Positive and Unresolved Intertwined Sister Chromatids at the Site of Terminal Fork Arrest

(A) Representative images showing RPA foci (labeled with Ssb3-mcherry) merging or touching GFP-LacI foci cells harboring the t-LacO-ura4<ori> construct shown in Figure 1A. Of note, rad52-d strains have a number of cells with multiple RPA foci. To avoid biases toward a random localization of GFP-LacI and RPA foci, cells with ≥ 3 RPA foci were excluded from the analysis. See Figure S4 for additional examples.

(B) Quantification of cells showing RPA recruited to the RTS1-RFB, according to cell-cycle phase. G2 and S phase cells are mononucleated cells and binucleated cells with a septum, respectively. Values are means of at least three independent experiments \pm SEM. Statistical analysis was performed with Mann-Whitney U tests.

(C) Representative example of mitotic RPA-positive LacO-bridges (left panel) and their quantification (right panel).

(D) Example of a mitotic RPA-positive LacO-bridge emanating from an early anaphase in which a single RPA focus is located at the nexus of the two nuclei in a rad52-d cell. See Figure S4 for additional examples.

(legend continued on next page)

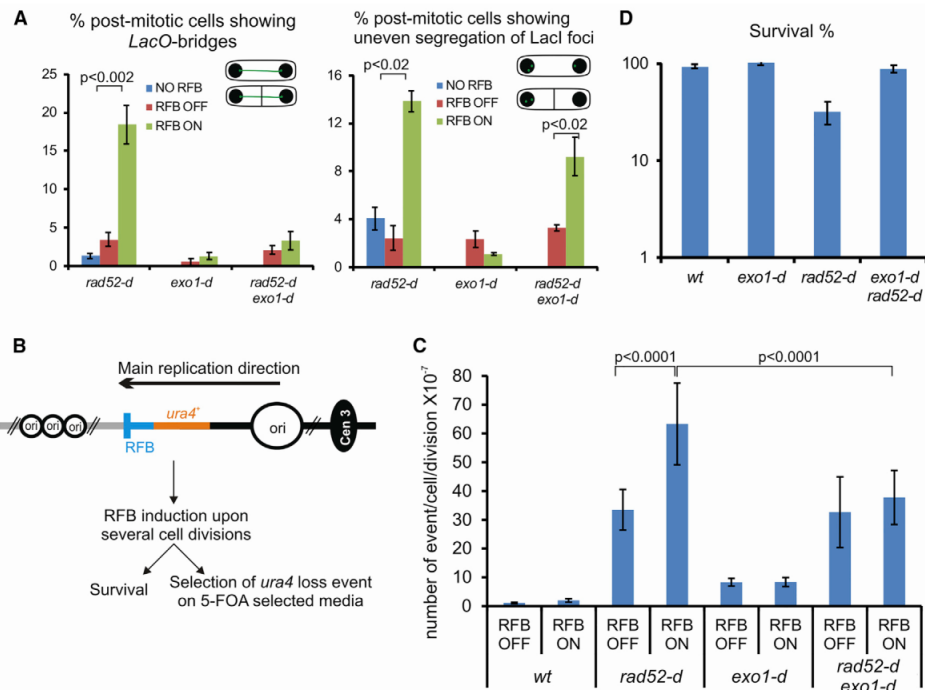


Figure 5. Excess RPA-Coated ssDNA Gaps at Terminal Fork Arrest Cause a Failure of Mitotic Sister Chromatid Disjunction and Genome Instability

(A) Quantification of mitotic defects. Values are means of at least three independent experiments \pm SEM. Statistical analysis was performed with Mann-Whitney U tests. Strains used include the following: *rad52-d*, AA1; *exo1-d*, AA39; *rad52-d exo1-d*, AA42. See Figure S3 for mitotic index and cell-cycle distribution.

(B) Diagram of the $\text{ura}4\text{-ori}$ construct. A loss of *ura4* function was selected on 5-fluoroorotic acid (5-FOA)-containing plates, following several generations, with or without induction of the RTF1-RFB.

(C) Rate of *ura4* loss (number of 5FOA-resistant colonies/cell/division). Values are the median rate \pm 95% CI. Statistical analysis was performed with the Mann-Whitney U test. Strains used include the following: WT, SL504; *rad52-d*, AA95; *exo1-d*, AA91; *rad52-d exo1-d*, AA98.

(D) Cell survival after spreading onto minimal medium without thiamine (RFB ON), expressed relative to the survival of the same strains spread onto minimal medium containing thiamine (RFB OFF). Values are means of at least three independent experiments \pm the 95% CI. Strains used include the following: WT, YC266; *rad52-d*, YC270; *exo1-d*, II558; *rad52-d exo1-d*, YC274.

DISCUSSION

The resolution of replication stress is vital to suppressing a wide range of tumor-initiating events, including mis-segregation of chromosomes during mitosis. Rad51-mediated recombination processes at replication forks have been shown to be central to this. Global alteration of fork progression previously identified a role for HR proteins at temporarily arrested forks through fork remodeling and prevention from Mre11- or Dna2-dependent resection of nascent strands (Hashimoto et al., 2010; Higgs et al., 2015; Schlacher et al., 2011, 2012; Zellweger et al., 2015). By studying a well-controlled site-spe-

cific RFB, we had previously characterized a separate role for Rad51 in promoting HR-mediated restart of dysfunctional forks (Lambert et al., 2010; Miyabe et al., 2015). Here, by following the fate in vivo of the *RTS1*-RFB, we have revealed a novel link between replication arrest and mitotic mis-segregation events. Our main unexpected findings are: (1) terminally arrested forks require Rad52/Rad51-mediated fork protection if they are to be resolved by the arrival of a converging fork (Figure 7, left panel) and (2) if terminally arrested forks are not protected by Rad52/Rad51, fork merging fails. The result is manifested in mitosis as an anaphase bridge (Figure 7, right panel). Mechanistically, we demonstrate that Rad51 DNA

(E) Classification and quantification of mitotic LacO-bridges in *rad52-d* cells according to their origin, from time-lapse movies. $\text{RPA}^+/\text{LacI}^+$ and $\text{RPA}^+/\text{LacI}^-$ denote an RPA focus touching or merging with, or not, a GFP-LacI focus, respectively.

(F) Schematic interpretation of LacO-bridges at unprotected forks.

Strains used include the following: WT, AS39; *rad52-d*, SL1190; *exo1-d*, AA46; *rad52-d exo1-d*, SL1194.

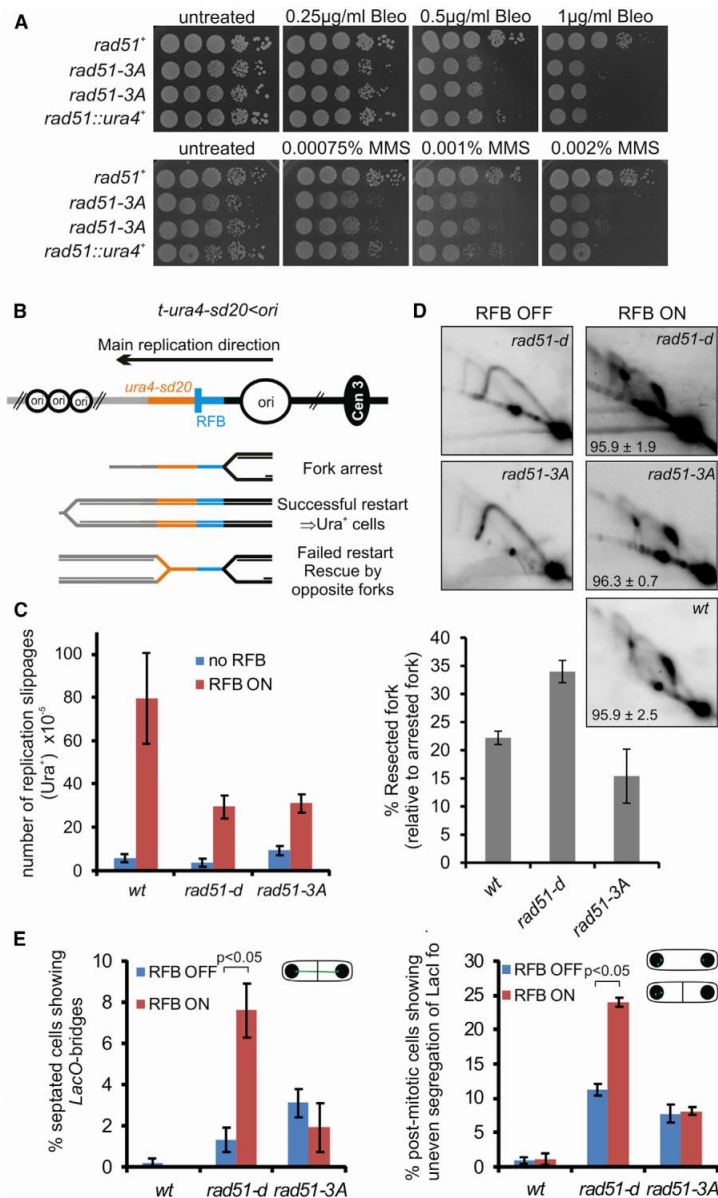


Figure 6. Rad51 Binding to DNA Is Sufficient to Ensure the Rescue of Terminal Fork Arrest by Opposite Forks

(A) Ten-fold serial dilution of indicated strains on plates containing indicated doses of bleomycin and MMS. See Figure S5 for the characterization of the rad51-3A mutant. Strains used include the following: WT, AA109; rad51-3A, AA118; rad51-d, SL1010.

(B) Diagram of the t-ura4-sd20<ori> construct containing a single RTS1-RFB. The nonfunctional ura4-sd20 allele harbors a 20-nt duplication flanked by microhomology. Cells are thus auxotroph for uracil. HR-mediated fork restart is associated to a nonprocessive DNA synthesis, liable to replication slippage at microhomology. When forks are restarted at the RTS1-RFB, the ura4-sd20 gene is replicated by a restarted fork associated to a nonprocessive DNA synthesis, allowing replication slippage to occur. This results in the deletion of the duplication and the restoration of a functional ura4+ gene.

(C) Frequency of replication slippage. “No RFB” indicates conditions in which strains harbor the t-ura4-sd20-ori construct without the RTS1-RFB. Values are means of at least three independent experiments \pm the 95% CI. Strains used include the following: WT no RFB, AA124; WT RFB ON, AA129; rad51-d no RFB, YC76; rad51-d RFB ON, YC80; rad51-3A no RFB, AA139; rad51-3A RFB ON, AA133.

(D) Representative RI analysis by 2DGE, in the absence (RFB OFF) or presence (RFB ON) of fork blockade. A DNA fragment corresponding to ura4 gene was used as probe. The numbers indicate the efficiency of the RTS1-RFB for each strain analyzed; values shown are means of at least three independent experiments \pm SD. The bottom histogram shows percentage of forks undergoing resection (tail signals) relative to the number of blocked forks. Values are means of at least three independent experiments \pm the 99% CI. Strains used include the following: WT, AA129; rad51-d, YC80; rad51-3A, AA133.

(E) Quantification of mitotic defects. Values are means of at least three independent experiments \pm SEM. Statistical analysis was performed with the Mann-Whitney U test. Strains used include the following: WT, AA23; rad51-d, AC409; rad51-3A, AA158.

binding, but not Rad51 strand-exchange activity, is required for terminally arrested fork protection. Loss of Rad51 DNA association results in excess Exo1-dependent ssDNA formation upstream of the site of terminal fork arrest. This excess of ssDNA causes the subsequent conversion of the unprotected fork into a UFB-like structure that is further damaged as cells progress through mitosis.

Rad52/Rad51 Restrict Exo1 Activity at Terminally Arrested Forks in a Recombination-Independent Manner

Temporarily arrested forks are subject to regulation by the intra-S phase checkpoint, which includes the nucleolytic processing of nascent strands and architectural changes, such as fork reversal, to facilitate the resumption of replication (Berti and

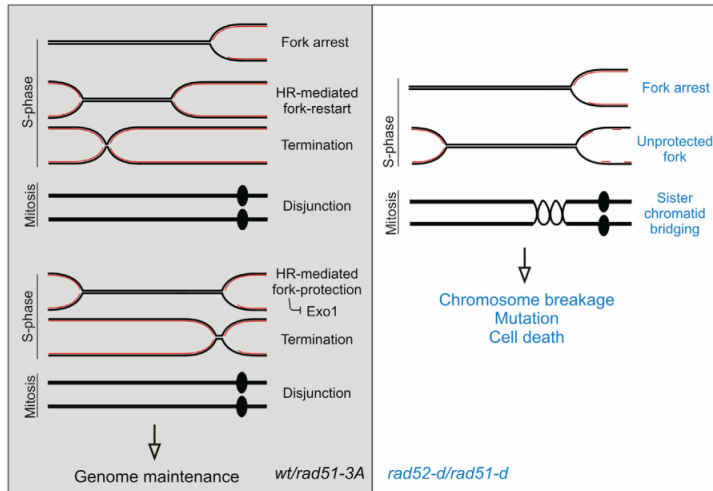


Figure 7. Model of Unprotected-Fork-Induced Anaphase Bridges

Rad51-dependent fork restart and protection are genetically separable.

bridge that resembles the structure of a UFB: two intertwined sister chromatids harboring dsDNA and ssDNA (Figure 7, right panel). Since these bridges arise at the site of fork arrest, we equate them to a potential subset of UFBs that characterize human CFS. In yeasts and mammals, the induction of artificial bidirectional fork barriers (*LacO* arrays bound by the repressor *LacI*) results in UFB formation, further supporting a scenario in which the irreversible arrest of converging replisomes results in the persistence of unreplicated parental DNA, generating UFB in mitosis (Beuzer

Vindigni, 2016). However, uncontrolled resection at these stably stalled forks is detrimental to genome stability. Recombination factors (Rad52 and Rad51 in yeasts; BRCA2 and FANCD2 in mammals) prevent excessive nascent-strand degradation at forks that have been temporarily stalled by hydroxyurea (HU) or damaged by methyl-methane sulfonate (MMS) treatment. DNA fiber-based approaches and analyses of fork structures by electronic microscopy have demonstrated that uncontrolled resection (~ 1.8 kb/hr) generates short gaps (< 300 nt) both close to and further away from the fork junction (Hashimoto et al., 2010; Higgs et al., 2015; Schlacher et al., 2011, 2012).

If replication forks are not stabilized by the intra-S phase checkpoint, they become dysfunctional. Such forks cannot simply resume replication and must either be resolved by an incoming converging fork or, if this does not occur in a timely manner, be restarted by the action of HR. Using an allele of *rad51* that cannot initiate strand exchange, but is able to bind DNA, we have separated the function of Rad51 in terminally arrested fork restart from a new function in protecting terminally arrested forks from excessive Exo1-dependent nascent-strand degradation. While restart of dysfunctional forks requires the strand-exchange functions of Rad51, fork protection depends only on the initial association of Rad51 with DNA. Given the potential deleterious outcomes of Rad51-mediated fork repair and restart on genome stability, our data suggest that protection and restart of dysfunctional forks are separate Rad51 functions with different requirements for the maintenance of genome stability (Carr and Lambert, 2013).

Unprotected Forks Are Converted into Anaphase Bridges

A second important observation we made was that a terminally arrested replication fork, which is not protected from Exo1-dependent resection by Rad52/Rad51, cannot effectively merge with a converging fork. The consequence of this failed merger is the formation in the subsequent mitosis of a sister chromosome

et al., 2014; Germann et al., 2014; Jacome and Fernandez-Cape-tillo, 2011; Sofueva et al., 2011). While our data do not rule out this hypothesis, we speculate that the bridges we observe here may reflect a novel route to the formation of UFBs. This would be consistent with observations in human cells that RAD51 is required to prevent CFS instability and the formation of anaphase bridges, including PICH-positive UFBs (Laulier et al., 2011; Schwartz et al., 2005; Wilhelm et al., 2014).

Our data suggest that the progression of unperturbed converging forks toward an unprotected terminally arrested fork results in a pathological termination event, the exact nature of which remains to be determined. However, in considering the potential nature of such events, it is of note that replication termination has recently been proposed to occur when the CMG helicase (CDC45/MCM2-7/GINS) of one replisome encircles dsDNA from the lagging strand of the adjacent converging replicon (Dewar et al., 2015). If unprotected forks have excessive ssDNA gaps, the CMG helicase of the converging replisome may encounter difficulties in reaching the dsDNA. Possibly, concatenation or premature condensation of ssDNA may also challenge topoisomerase activity and compromise fork merging.

The Rescue of Terminally Arrested Forks by Origin Firing Requires Rad51-Mediated Fork Protection

We have revealed a previously unknown role for Rad52/Rad51-mediated fork protection in preventing sister chromatid bridging at replication stress sites. Our data reveal that terminally arrested forks can be rescued through the firing of dormant origins only in the presence of Rad51 binding and, thus, fork protection. We previously reported the frequent formation of Rad52 and Rad51 foci in both S and G2 phases, following RFB activation (Lambert et al., 2005). Using an analogous RFB, Nguyen et al. recently showed that Rad52 remains associated with arrested forks at the time point at which fork merging probably occurs (Nguyen et al., 2015). These observations suggest a time window for the association of Rad52/Rad51 with dysfunctional forks

exceeding the ~20 min required for successful replication restart (Miyabe et al., 2015). We suggest that Rad52/Rad51 facilitate accurate termination at sites of prolonged fork arrest and offer the potential to restart the fork, should an incoming converging fork fail to appear in a timely manner.

Replication stress and structural mitotic abnormalities are common features of cancer cells. By showing that unprotected dysfunctional forks drive the formation of UFB-like structures, mitotic chromosome breakage, and aneuploidy, we have established a novel genome instability pathway linking replication stress and mitotic defects. We suggest that unprotected-fork-associated mitotic defects contribute to the genomic instability of neoplastic lesions early in cancer development.

STAR★METHODS

Detailed methods are provided in the online version of this paper and include the following:

- [KEY RESOURCES TABLE](#)
- [CONTACT FOR REAGENT AND RESOURCE SHARING](#)
- [EXPERIMENTAL MODEL AND SUBJECT DETAILS](#)
- [METHOD DETAILS](#)
 - Standard yeast genetics
 - Analysis of replication intermediates by 2DGE
 - Live cell imaging
 - Analysis of ssDNA by qPCR
 - Chromatin immunoprecipitation of RPA
 - Replication slippage assay
 - RFB-induced loss of *ura4* function
 - Cell viability
 - Rad51 foci detection by immunofluorescence
- [QUANTIFICATION AND STATISTICAL ANALYSIS](#)
- [DATA AND SOFTWARE AVAILABILITY](#)

SUPPLEMENTAL INFORMATION

Supplemental Information includes five figures, two tables, and two movies and can be found with this article online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.molcel.2017.04.002>.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

A.A.S., A.T.-S., I.I., A.C., J.H., and K.F. performed the experiments. A.A.S., A.T.-S., and S.A.E.L. contributed to experimental design and data analysis. G.P. provided technical assistance and expertise in performing and analyzing time lapse microscopy. A.A.S. and S.A.E.L. wrote the manuscript.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank P. Pasero, B. Lopez, and A.M. Carr for critical reading of the manuscript and helpful discussions. We thank the laboratory of A. Paoletti (Institut Curie, Paris) for assistance with time-lapse microscopy. We also thank the PICT-IBISA@Orsay Imaging Facility of the Institut Curie and the Orsay Cytometry core facility of the Institut Curie. A.A.S., A.T.-S., A.C., and I.I. were funded by a French governmental fellowship, the Institut Curie International PhD program, Association pour la Recherche sur le Cancer (ARC), and the Fondation pour la Recherche Médicale (FRM ING20111223450), respectively. This work was supported by the Institut Curie, the CNRS, the Fondation ARC (PJA 20141201943), the Ligue (comité Essone), l'Agence Nationale de la Recherche ANR-14-CE10-0010-01, the Institut National du Cancer INCA 2013-1-PLBIO-

14, and the Fondation pour la Recherche Médicale "Equipe FRM DEQ20160334889." The funders had no role in study design, data collection and analysis, the decision to publish, or preparation of the manuscript.

Received: November 11, 2016

Revised: March 8, 2017

Accepted: April 3, 2017

Published: May 4, 2017

REFERENCES

- Berti, M., and Vindigni, A. (2016). Replication stress: getting back on track. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 23, 103–109.
- Beuzer, P., Quivy, J.P., and Almouzni, G. (2014). Establishment of a replication fork barrier following induction of DNA binding in mammalian cells. *Cell Cycle* 13, 1607–1616.
- Blow, J.J., Ge, X.Q., and Jackson, D.A. (2011). How dormant origins promote complete genome replication. *Trends Biochem. Sci.* 36, 405–414.
- Brewer, B.J., Lockshon, D., and Fangman, W.L. (1992). The arrest of replication forks in the rDNA of yeast occurs independently of transcription. *Cell* 71, 267–276.
- Carr, A.M., and Lambert, S. (2013). Replication stress-induced genome instability: the dark side of replication maintenance by homologous recombination. *J. Mol. Biol.* 425, 4733–4744.
- Chan, K.L., North, P.S., and Hickson, I.D. (2007). BLM is required for faithful chromosome segregation and its localization defines a class of ultrafine anaphase bridges. *EMBO J.* 26, 3397–3409.
- Chan, K.L., Palmai-Pallag, T., Ying, S., and Hickson, I.D. (2009). Replication stress induces sister-chromatid bridging at fragile site loci in mitosis. *Nat. Cell Biol.* 11, 753–760.
- Cloud, V., Chan, Y.L., Grubb, J., Budke, B., and Bishop, D.K. (2012). Rad51 is an accessory factor for Dmc1-mediated joint molecule formation during meiosis. *Science* 337, 1222–1225.
- Costes, A., and Lambert, S.A.E. (2012). Homologous recombination as a replication fork escort: fork-protection and recovery. *Biomolecules* 3, 39–71.
- Cotta-Ramusino, C., Fachinetti, D., Lucca, C., Doksani, Y., Lopes, M., Sogo, J., and Foiani, M. (2005). Exo1 processes stalled replication forks and counteracts fork reversal in checkpoint-defective cells. *Mol. Cell* 17, 153–159.
- Debatisse, M., Le Tallec, B., Letessier, A., Dutrillaux, B., and Brison, O. (2012). Common fragile sites: mechanisms of instability revisited. *Trends Genet.* 28, 22–32.
- Dewar, J.M., Budzowska, M., and Walter, J.C. (2015). The mechanism of DNA replication termination in vertebrates. *Nature* 525, 345–350.
- Dubarry, M., Loïodice, I., Chen, C.L., Thermes, C., and Taddei, A. (2011). Tight protein-DNA interactions favor gene silencing. *Genes Dev.* 25, 1365–1370.
- Ge, X.Q., Jackson, D.A., and Blow, J.J. (2007). Dormant origins licensed by excess Mcm2-7 are required for human cells to survive replicative stress. *Genes Dev.* 21, 3331–3341.
- Germann, S.M., Schramke, V., Pedersen, R.T., Gallina, I., Eckert-Boulet, N., Oestergaard, V.H., and Lisby, M. (2014). TopBP1/Dpb11 binds DNA anaphase bridges to prevent genome instability. *J. Cell Biol.* 204, 45–59.
- Glover, T.W., Berger, C., Coyle, J., and Echo, B. (1984). DNA polymerase alpha inhibition by aphidicolin induces gaps and breaks at common fragile sites in human chromosomes. *Hum. Genet.* 67, 136–142.
- Granot, D., and Snyder, M. (1991). Segregation of the nucleolus during mitosis in budding and fission yeast. *Cell Motil. Cytoskeleton* 20, 47–54.
- Hashimoto, Y., Ray Chaudhuri, A., Lopes, M., and Costanzo, V. (2010). Rad51 protects nascent DNA from Mre11-dependent degradation and promotes continuous DNA synthesis. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 17, 1305–1311.
- Hashimoto, Y., Puddu, F., and Costanzo, V. (2011). RAD51- and MRE11-dependent reassembly of uncoupled CMG helicase complex at collapsed replication forks. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 19, 17–24.

- Helmrich, A., Ballarino, M., and Tora, L. (2011). Collisions between replication and transcription complexes cause common fragile site instability at the longest human genes. *Mol. Cell* **44**, 966–977.
- Higgs, M.R., Reynolds, J.J., Winczura, A., Blackford, A.N., Borel, V., Miller, E.S., Zlatanou, A., Nieminszczy, J., Ryan, E.L., Davies, N.J., et al. (2015). BOD1L is required to suppress deleterious resection of stressed replication forks. *Mol. Cell* **59**, 462–477.
- Iraqi, I., Chekkal, Y., Jmari, N., Pietrobon, V., Fréon, K., Costes, A., and Lambert, S.A. (2012). Recovery of arrested replication forks by homologous recombination is error-prone. *PLoS Genet.* **8**, e1002976.
- Jacome, A., and Fernandez-Capetillo, O. (2011). Lac operator repeats generate a traceable fragile site in mammalian cells. *EMBO Rep.* **12**, 1032–1038.
- Kawabata, T., Luebben, S.W., Yamaguchi, S., Ilves, I., Matise, I., Buske, T., Botchan, M.R., and Shima, N. (2011). Stalled fork rescue via dormant replication origins in unchallenged S phase promotes proper chromosome segregation and tumor suppression. *Mol. Cell* **41**, 543–553.
- Lambert, S., and Carr, A.M. (2013). Impediments to replication fork movement: stabilisation, reactivation and genome instability. *Chromosoma* **122**, 33–45.
- Lambert, S., Watson, A., Sheedy, D.M., Martin, B., and Carr, A.M. (2005). Gross chromosomal rearrangements and elevated recombination at an inducible site-specific replication fork barrier. *Cell* **121**, 689–702.
- Lambert, S., Mizuno, K., Blaisonneau, J., Martineau, S., Chanet, R., Fréon, K., Murray, J.M., Carr, A.M., and Baldacci, G. (2010). Homologous recombination restarts blocked replication forks at the expense of genome rearrangements by template exchange. *Mol. Cell* **39**, 346–359.
- Laulier, C., Cheng, A., and Stark, J.M. (2011). The relative efficiency of homology-directed repair has distinct effects on proper anaphase chromosome separation. *Nucleic Acids Res.* **39**, 5935–5944.
- Le Tallec, B., Dutrillaux, B., Lachages, A.M., Millot, G.A., Brison, O., and Debatisse, M. (2011). Molecular profiling of common fragile sites in human fibroblasts. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **18**, 1421–1423.
- Le Tallec, B., Millot, G.A., Blin, M.E., Brison, O., Dutrillaux, B., and Debatisse, M. (2013). Common fragile site profiling in epithelial and erythroid cells reveals that most recurrent cancer deletions lie in fragile sites hosting large genes. *Cell Rep.* **4**, 420–428.
- Lea, D.E., and Coulson, C.A. (1949). The distribution of the numbers of mutants in bacterial populations. *J. Genet.* **49**, 264–285.
- Letessier, A., Millot, G.A., Koundrioukoff, S., Lachagès, A.M., Vogt, N., Hansen, R.S., Maffoy, B., Brison, O., and Debatisse, M. (2011). Cell-type-specific replication initiation programs set fragility of the FRA3B fragile site. *Nature* **470**, 120–123.
- Magdalou, I., Lopez, B.S., Pasero, P., and Lambert, S.A. (2014). The causes of replication stress and their consequences on genome stability and cell fate. *Semin. Cell Dev. Biol.* **30**, 154–164.
- Mankouri, H.W., Huttner, D., and Hickson, I.D. (2013). How unfinished business from S-phase affects mitosis and beyond. *EMBO J.* **32**, 2661–2671.
- Miyabe, I., Mizuno, K., Keszthelyi, A., Daigaku, Y., Skouteri, M., Mohebi, S., Kunkel, T.A., Murray, J.M., and Carr, A.M. (2015). Polymerase δ replicates both strands after homologous recombination-dependent fork restart. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **22**, 932–938.
- Mizuno, K., Lambert, S., Baldacci, G., Murray, J.M., and Carr, A.M. (2009). Nearby inverted repeats fuse to generate acentric and dicentric palindromic chromosomes by a replication template exchange mechanism. *Genes Dev.* **23**, 2876–2886.
- Mizuno, K., Miyabe, I., Schalbetter, S.A., Carr, A.M., and Murray, J.M. (2013). Recombination-restarted replication makes inverted chromosome fusions at inverted repeats. *Nature* **493**, 246–249.
- Moreno, S., Klar, A., and Nurse, P. (1991). Molecular genetic analysis of fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Methods Enzymol.* **194**, 795–823.
- Naim, V., and Rosselli, F. (2009). The FANCD1 pathway and BLM collaborate during mitosis to prevent micro-nucleation and chromosome abnormalities. *Nat. Cell Biol.* **11**, 761–768.
- Nguyen, M.O., Jalan, M., Morrow, C.A., Osman, F., and Whitby, M.C. (2015). Recombination occurs within minutes of replication blockage by RTS1 producing restarted forks that are prone to collapse. *eLife* **4**, e04539.
- Ozeri-Galai, E., Lebofsky, R., Rahat, A., Bester, A.C., Bensimon, A., and Kerem, B. (2011). Failure of origin activation in response to fork stalling leads to chromosomal instability at fragile sites. *Mol. Cell* **43**, 122–131.
- Petermann, E., Orta, M.L., Issaeva, N., Schultz, N., and Helleday, T. (2010). Hydroxyurea-stalled replication forks become progressively inactivated and require two different RAD51-mediated pathways for restart and repair. *Mol. Cell* **37**, 492–502.
- Pietrobon, V., Fréon, K., Hardy, J., Costes, A., Iraqi, I., Ochsenbein, F., and Lambert, S.A. (2014). The chromatin assembly factor 1 promotes Rad51-dependent template switches at replication forks by counteracting D-loop disassembly by the RecQ-type helicase Rqh1. *PLoS Biol.* **12**, e1001968.
- Sabatinos, S.A., Ranatunga, N.S., Yuan, J.P., Green, M.D., and Forsburg, S.L. (2015). Replication stress in early S phase generates apparent micronuclei and chromosome rearrangement in fission yeast. *Mol. Biol. Cell* **26**, 3439–3450.
- Schlacher, K., Christ, N., Siaud, N., Egashira, A., Wu, H., and Jasin, M. (2011). Double-strand break repair-independent role for BRCA2 in blocking stalled replication fork degradation by MRE11. *Cell* **145**, 529–542.
- Schlacher, K., Wu, H., and Jasin, M. (2012). A distinct replication fork protection pathway connects Fanconi anemia tumor suppressors to RAD51-BRCA1/2. *Cancer Cell* **22**, 106–116.
- Schwartz, M., Zlotorynski, E., Goldberg, M., Ozeri, E., Rahat, A., le Sage, C., Chen, B.P., Chen, D.J., Agami, R., and Kerem, B. (2005). Homologous recombination and nonhomologous end-joining repair pathways regulate fragile site stability. *Genes Dev.* **19**, 2715–2726.
- Sofueva, S., Osman, F., Lorenz, A., Steinacher, R., Castagnetti, S., Ledesma, J., and Whitby, M.C. (2011). Ultrafine anaphase bridges, broken DNA and illegitimate recombination induced by a replication fork barrier. *Nucleic Acids Res.* **39**, 6568–6584.
- Terenna, C.R., Makushok, T., Velve-Casquillas, G., Baigl, D., Chen, Y., Bornens, M., Paoletti, A., Piel, M., and Tran, P.T. (2008). Physical mechanisms redirecting cell polarity and cell shape in fission yeast. *Curr. Biol.* **18**, 1748–1753.
- Tsang, E., Miyabe, I., Iraqi, I., Zheng, J., Lambert, S.A., and Carr, A.M. (2014). The extent of error-prone replication restart by homologous recombination is controlled by Exo1 and checkpoint proteins. *J. Cell Sci.* **127**, 2983–2994.
- Velve-Casquillas, G., Costa, J., Carlier-Grynkorn, F., Mayeux, A., and Tran, P.T. (2010). A fast microfluidic temperature control device for studying microtubule dynamics in fission yeast. *Methods Cell Biol.* **97**, 185–201.
- Watson, A.T., Garcia, V., Bone, N., Carr, A.M., and Armstrong, J. (2008). Gene tagging and gene replacement using recombinase-mediated cassette exchange in *Schizosaccharomyces pombe*. *Gene* **407**, 63–74.
- Wilhelm, T., Magdalou, I., Barascu, A., Técher, H., Debatisse, M., and Lopez, B.S. (2014). Spontaneous slow replication fork progression elicits mitosis alterations in homologous recombination-deficient mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **111**, 763–768.
- Win, T.Z., Mankouri, H.W., Hickson, I.D., and Wang, S.W. (2005). A role for the fission yeast Rqh1 helicase in chromosome segregation. *J. Cell Sci.* **118**, 5777–5784.
- Woodward, A.M., Göhler, T., Luciani, M.G., Oehlmann, M., Ge, X., Gartner, A., Jackson, D.A., and Blow, J.J. (2006). Excess Mcm2-7 license dormant origins of replication that can be used under conditions of replicative stress. *J. Cell Biol.* **173**, 673–683.
- Zellweger, R., Dalcher, D., Mutreja, K., Berti, M., Schmid, J.A., Herrador, R., Vindigni, A., and Lopes, M. (2015). Rad51-mediated replication fork reversal is a global response to genotoxic treatments in human cells. *J. Cell Biol.* **208**, 563–579.
- Zierhut, C., and Diffley, J.F. (2008). Break dosage, cell cycle stage and DNA replication influence DNA double strand break response. *EMBO J.* **27**, 1875–1885.

STAR★METHODS

KEY RESOURCES TABLE

REAGENT or RESOURCE	SOURCE	IDENTIFIER
Antibodies		
Anti-Rad51	Thermo-scientific	PA1-4968; RRID: AB_667512
Anti-PCNA	Santa Cruz	Pc10:Sc56; RRID: AB_628110
Anti-GFP	Molecular probe	A11122; RRID: AB_221569
Alexa fluor 555 goat anti-rabbit	Molecular probe	A21428; RRID: AB_141784
Chemicals, Peptides, and Recombinant Proteins		
Trioxsalen (Tri-methyl psoralen)	Sigma	T6137
Proteinase K	Euromedex	EU0090
RNase A DNase-free	Roche	11119915001
Incert agarose	Lonza	50123
Lysing enzymes	Sigma	L1412
Zymolyase 20T	Amsbio	120491-1
Zymolyase 100T	Amsbio	120493-1
Benzoylated Naphthoylated DEAE-cellulose (BND)	Sigma	B6385
Gene Screen Plus nylon membrane	Perkin Elmer	NEF988001PK
Dynabeads protein G	Invitrogen	10003D
Mse1	New England Biolabs	R0525M
CutSmart buffer	New England Biolabs	B7204S
Ase1 High concentration	New England Biolabs	R0526M
NEB Buffer 3.1	New England Biolabs	B7203S
Beta agarase	New England Biolabs	M0392L
Slide for microscopy 8 wells 6mm	Thermo Scientific	ER-201B-CE24
5-FOA	Euromedex	1555
Bleomycine	Bellon	525709
Methyl methane sulfonate MMS	sigma	129925
Ultra-Hyb buffer	Invitrogen	AM8669
DMA	Thermo Scientific	20660
Glycogen	Roche	10901393001
Caffeine	Sigma	C-8960
Poly-prep Chromatography columns	Biorad	731-1550
ProLong Gold antifade reagent with DAPI	Molecular Probes	P36935
Lysine monohydrate	Sigma	L-5626
Paraformaldehyde	Alfa Aesar	30525-89-4
DEOXYCYTIDINE 5'-triphosphate [α - 32 P]	Perkin Elmer	BLU013Z250UC
Formaldehyde	Sigma	F-8775
Critical Commercial Assays		
Rediprime II	GE healthcare	RPN1633
iQ SYBR green supermix	Biorad	1708882
Qiaquick PCR purification	QIAGEN	28104
Deposited Data		
Mendeley Data	https://data.mendeley.com/	http://dx.doi.org/10.17632/j745gb53ys.1
Experimental Models: Organisms/Strains		
See Table S1 for a list of yeast strains used in this study	Lambert's lab	Strain number
Oligonucleotides		
See Table S2 for a list of oligonucleotides used in this study	Sigma	N/A

(Continued on next page)

Continued

REAGENT or RESOURCE	SOURCE	IDENTIFIER
Software and Algorithms		
Image processing and analysis in Java	ImageJ	https://imagej.nih.gov/ij/
Image Quant TL	GE healthcare	http://www.gelifesciences.com
MetaMorph Microscopy Automation and Image Analysis Software	Molecular devices	https://www.moleculardevices.com

CONTACT FOR REAGENT AND RESOURCE SHARING

Further information and requests for resources and reagents should be directed to and will be fulfilled by the Lead Contact, Dr. Sarah A.E. Lambert (sarah.lambert@curie.fr).

EXPERIMENTAL MODEL AND SUBJECT DETAILS

Yeast strains were freshly thawed from frozen stocks and grown at 30°C using standard yeast genetics practices.

METHOD DETAILS**Standard yeast genetics**

The yeast strains used in this work are listed in [Table S1](#). Gene deletion and tagging were performed with classical and molecular genetics techniques ([Moreno et al., 1991](#)). Strains carrying the replication fork barrier *RTS1* were grown in supplemented EMM-glutamate. The *RTS1* barrier was kept inactive by adding 60 μM thiamine to the media (RFB OFF conditions). The *RTS1* barrier was activated by transfer into thiamine-free medium and incubation for 24 hr, in most experiments. The *rad51-3A* mutant was obtained by recombinase-mediated cassette exchange, as previously described ([Watson et al., 2008](#)). For cell sensitivity to genotoxic drugs, MMS (Sigma, 129925) and Bleomycin (Bellon, 525709) were added to the media on plates.

Analysis of replication intermediates by 2DGE

Replication intermediates (RIs) were analyzed by 2DGE, as follows: 2.5×10^9 cells were washed in water, resuspended in 20 mL of cold water and transferred to a glass/Pyrex Petri dish on ice. Genomic DNA was crosslinked with trimethyl psoralen (TMP, Sigma, T6137) as follows: cell suspensions were mixed with 1 mL TMP (0.2 mg/ml in ethanol) and incubated in the dark for 5 min, with occasional swirling. Cells were exposed to UVA (365 nm) for 90 s, at a flow rate of 50 mW/cm². Cells were treated with 0.625 mg/ml lysing enzyme (Sigma, L1412) and 0.5 mg/ml zymolyase 100T (Amsbio, 120493-1). The resulting spheroplasts were then embedded in low-melting point agarose (InCert Agarose, Lonza) plugs, incubated in a digestion buffer containing proteinase K (Euromedex, EU0090) and stored in TE (50 mM Tris, 10 mM EDTA). DNA was digested with 60 units per plug of the restriction enzyme *Asel* (NEB, R0526M) and then treated with RNase (Roche, 11119915001) and beta-agarase (NEB, M0392L). Melted Plugs were equilibrated with 0.3M NaCl and RI enrichment was achieved on BND cellulose (Sigma, B6385) embedded in columns (Biorad, 731-1550), as described ([Lambert et al., 2010](#)). RIs were enriched in the 1M NaCl 1.8% caffeine (Sigma, C-8960). After precipitation with glycogen (Roche, 10901393001), RIs were separated by electrophoresis in 0.35% and 0.9% (+ EtBr) agarose gels in 1X TBE for the first and second dimensions ([Brewer et al., 1992](#)). For 2DGE in denaturing conditions, the second dimension involved migration in alkaline buffer (5 mM NaOH, 1 mM EDTA). DNA was transferred to a nylon membrane (Perkin Elmer, NEF988001PK) in 10X SSC and probed with a ³²P-radiolabeled *ura4* sequence (GE healthcare rediprime II, RPN1633, and alpha-32P dCTP, Perkin Elmer, BLU013Z250UC) in Ultra-Hyb buffer (Invitrogen, AM8669) at 42°C. Quantitative densitometric analysis of the Southern-blots was carried out using ImageQuant software (GE healthcare).

Live cell imaging

Cells were prepared as previously described ([Pietrobon et al., 2014](#)). Cells were cultured in glutamate-supplemented EMM, with or without thiamine, washed twice and resuspended in fresh filtered medium. A 1-2 μl drop of exponentially growing culture was deposited on the well of a microscope slide (Thermo Scientific, ER-201B-CE24) covered with 1.4% agarose in filtered EMM. Images were acquired with a 3D microscope (LEICA DMRXA) equipped with a CoolSNAP monochromic camera (Roper Scientific). Cells were visualized with a 100X oil immersion objective with a numerical aperture of 1.4 and Z stack images were captured with METAMORPH software. Image acquisition and analysis were performed on the workstations of the PICT-IBiSA Orsay Imaging facility of Institut Curie.

For time-lapse movies, cells were injected into dedicated 4-5 μm-thick poly-dimethyl-siloxane (PDMS) microfluidic chambers on glass coverslips, as previously described ([Terenna et al., 2008](#)) ([Velve-Casquillas et al., 2010](#)). Images were acquired with a Nikon

Eclipse Ti-E microscope equipped with the perfect Focus System, a 100X/1.45-NA PlanApo oil immersion objective, a Mad City Lab piezo stage, a Yokogawa CSUX1 confocal unit, a Photometrics HQ2 CCD camera and a laser bench (Errol) with 491 and 561 nm diode lasers, 100mX each (Cobolt). Images were acquired every 5 min. For M-cherry and GFP fluorescence, images were acquired with an acquisition time of 300 ms at 12% power and 500 ms at 17% power. Movies were constructed with METAMORPH software and analyzed with ImageJ software.

Analysis of ssDNA by qPCR

2×10^8 cells were mechanically lysed by vortexing with glass beads (425–600 μm , Sigma). Genomic DNA was extracted by the classical phenol/chloroform method. We incubated 5 μg of DNA with or without 100 units of the restriction enzyme *MseI* (NEB, R0525M) which cuts dsDNA within the PCR amplicon to discriminate between ds and ssDNA. We then subjected 30 ng of the digested or mock-digested DNA to amplification by qPCR (iQ SYBR green supermix, Biorad, 1708882), using primers annealing on either side of the *MseI* restriction site (primers listed in Table S2). We quantified ssDNA as previously described (Zierhut and Diffley, 2008), using the formula: $\text{ssDNA} = 100 / ((1 + 2^{\Delta\text{Ct}}) / 2)$, in which ΔCt is the difference between the threshold cycles of digested and undigested DNA. A control locus (*II-150*) with no *MseI* restriction sites, for which the Ct values for digested and undigested DNA would be expected to be similar, was used to correct the ΔCt values of other primers and to normalize the results relative to the amount of DNA initially loaded onto the plate.

Chromatin immunoprecipitation of RPA

RPA enrichment at *RTS1*-RFB was performed using strains expressing a tagged RPA subunit, Ssb3-YFP. ChIP experiments were performed as previously described (Tsang et al., 2014). Samples were crosslinked with 10 mM DMA (dimethyl adipimidate, thermos scientific, 20660) and 1% formaldehyde (Sigma, F-8775). Chromatin was sonicated with a Diagenod Bioruptor set on high for 10 cycles of 30 s ON + 30 s OFF. Immunoprecipitation was performed with an anti-GFP antibody (rabbit polyclonal, Molecular probe, A11122) at 1:300 and Protein G Dynabeads (Invitrogen, 10003D) for the detection of Ssb3-YFP. The DNA associated with RPA was purified with a Qiaquick PCR purification kit (QIAGEN, 28104) and eluted in 200 μL of water. The relative amount of DNA was determined by qPCR (iQ SYBR green supermix, Biorad, 1708882, primers listed in Table S2). RPA enrichment was normalized relative to an internal control locus (*ade6*). RPA enrichment in the ON condition is shown relative to enrichment in the OFF condition.

Replication slippage assay

Replication slippage was assessed with the *ura4-sd20* allele (initially named *ura4-dup20*), as previously described (Iraqui et al., 2012). 5FOA (Euromedex, 1555)-resistant colonies were grown on uracil-containing plates without thiamine for 2 days at 30°C, and were then used to inoculate uracil-containing medium without thiamine, in which they were incubated for 24 hr. Cells were appropriately diluted and plated on YE plates (for survival counting) and uracil-free plates supplemented with thiamine. After 5 days of incubation at 30°C, colonies were counted to determine the frequency of replication slippage.

RFB-induced loss of *ura4* function

The loss of *ura4* marker was performed as previously described (Iraqui et al., 2012). Single Ura4⁺ colonies were streaked on plates containing uracil, with or without thiamine. At least 11 independent single colonies for each strain and condition were used to inoculate medium containing uracil, with or without thiamine, and the culture was incubated until stationary phase was reached. Appropriate dilutions were plated on supplemented YE plates (to determine cell survival) and YE plates containing 0.1% 5-FOA (Euromedex, 1555). Colonies were counted after 5–7 days of incubation at 30°C. The rates of *ura4* loss were calculated as described in (Lea and Coulson, 1949). Each fluctuation test was repeated two or three times. Statistical analysis was performed with the Mann-Whitney U test.

Cell viability

Cells were grown on supplemented EMM without thiamine for 14 hr. They were then used to prepare appropriate dilutions for plating on EMM plates with (RFB OFF) or without (RFB ON) thiamine. Colonies were counted after 5–7 days of incubation at 30°C and viability was calculated as the ratio of the number colonies growing in ON conditions relative to the number growing in OFF conditions.

Rad51 foci detection by immunofluorescence

Exponentially growing cells were treated or not with 0.3% MMS (Sigma 129925) for 1 hr. Cells were fixed with 4% paraformaldehyde (Alfa Aesar 30525-89-4) in PEM (100mM PIPES, 1mM EGTA, 1mM MgSO₄, pH 6.9) for 5 min at 30°C, then washed in PBS and then with PEM. Cells were digested in 1.25mg/ml Zymolyase 20T (amsbio 120491-1) in PEMS (1.2M sorbitol in PEM) at 37°C for 70 min. After washing 3 times in PEMS, cells were treated with 1% triton 100X in PEMS for 5 min at room temperature. Cells were washed twice with PEMBAL (1% BSA, 0.1% sodium azide, 100mM lysine monohydrate (Sigma L-5626) in PEM) and incubated for 1 hr on the wheel in PEMBAL. Cells were resuspended in 300 μl of PEMBAL containing anti-Rad51 (Thermo Scientific PA1-4968) at 1/500 and then incubated overnight on the wheel at room temperature. After several quick washes with PEMBAL followed by one wash of 30 min, cells were resuspended in 300 μl of PEMBAL containing anti-Rabbit Alexa Fluor 555 (Molecular Probes A21428) at 1/1000 for 4 hr at room temperature. After several washes with PBS, cells were re-suspended in 1ml of PBS containing 100 μM of sodium

azide. For microscopy, cells were spread on a regular slid, dried and then covered with a drop of ProLong Gold antifade reagent with DAPI (Molecular Probes P36935) before to place a coverslip.

QUANTIFICATION AND STATISTICAL ANALYSIS

Quantitative densitometric analysis of the Southern-blot (2DGE) was performed using ImageQuant software. The “tail signal” was normalized to the total signal of arrested forks.

Cell images were collected using METAMORPH software and analyzed using ImageJ software.

The definitions of values and errors bars are mentioned in the figures legend. For most experiments, the number of sample is $n > 3$ obtained from independent experiments to ensure biological reproducibility. Statistical analysis was performed using Mann-Whitney U tests and the Student's t test. When no statistics are mentioned, errors bars correspond to the 99 or 95% confidence interval (Figures 3F, 5B, and 6D).

DATA AND SOFTWARE AVAILABILITY

Data have been deposited to Mendeley data and are available at <http://dx.doi.org/10.17632/j745gb53ys.1>.

Molecular Cell, Volume 66

Supplemental Information

Unprotected Replication Forks Are Converted

into Mitotic Sister Chromatid Bridges

Anissia Ait Saada, Ana Teixeira-Silva, Ismail Iraqui, Audrey Costes, Julien Hardy, Giulia Paoletti, Karine Fréon, and Sarah A.E. Lambert

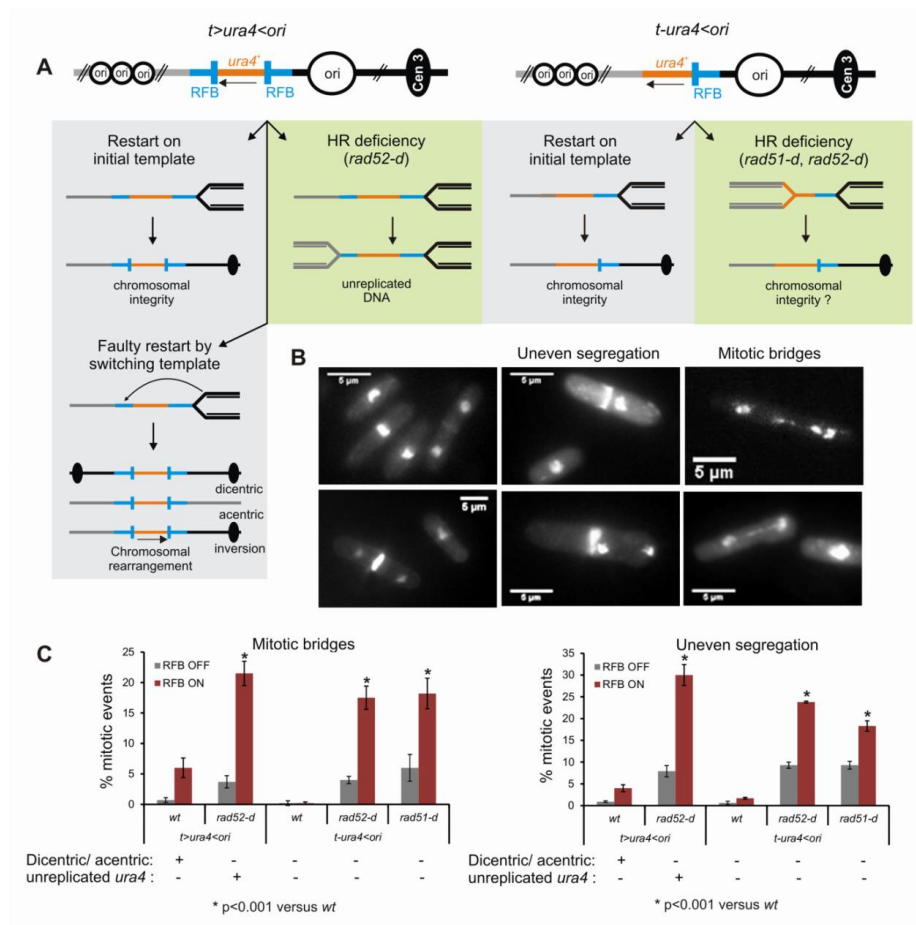


Figure S1: A single dysfunctional replication fork is sufficient to induce mitotic abnormalities in the absence of homologous recombination (related to Figure 1).

A. Diagram of the *t>ura4<ori* construct containing two *RTS1*-RFBs (> and <, blue bars) blocking the progression of forks converging towards the *ura4* locus (red bars), and of the *t-ura4<ori* construct containing a single *RTS1*-RFB (<, blue bars), which blocks the progression of replication forks moving in the main replication direction. At the *t>ura4<ori* locus (left panel), replication restart occurs either on the initial template or through a faulty template switch of nascent strands initiating DNA synthesis on a non-contiguous template (Lambert et al. Mol Cell 2010). Faulty template restart results in abnormal chromosomal structures, such as acentric and dicentric isochromosomes and inversion of the *ura4* marker. In cells defective for homologous recombination (HR deficiency), converging forks are blocked and not restarted, resulting in the *ura4* marker remaining unreplicated. At the *t-ura4<ori* locus (right panel), replication restart occurs on the initial template. In HR-deficient cells, the blocked fork is left irreversibly arrested.

B. Examples mitotic abnormalities observed with Dapi staining.

C. Quantification mitotic abnormalities observed in the strains and conditions indicated. For each genetic condition, it is indicated if acentric/dicentric chromosomes are expected to form (+) or not (-), and if the *ura4* gene is expected to be left unreplicated (+) or not (-). Strains used: for *t>ura4<ori*, *wt*=SL337, *rad52-d*=SL363; for *t-ura4<ori*, *wt*=SL350, *rad52-d*=SL680, *rad51-d*=SL395.

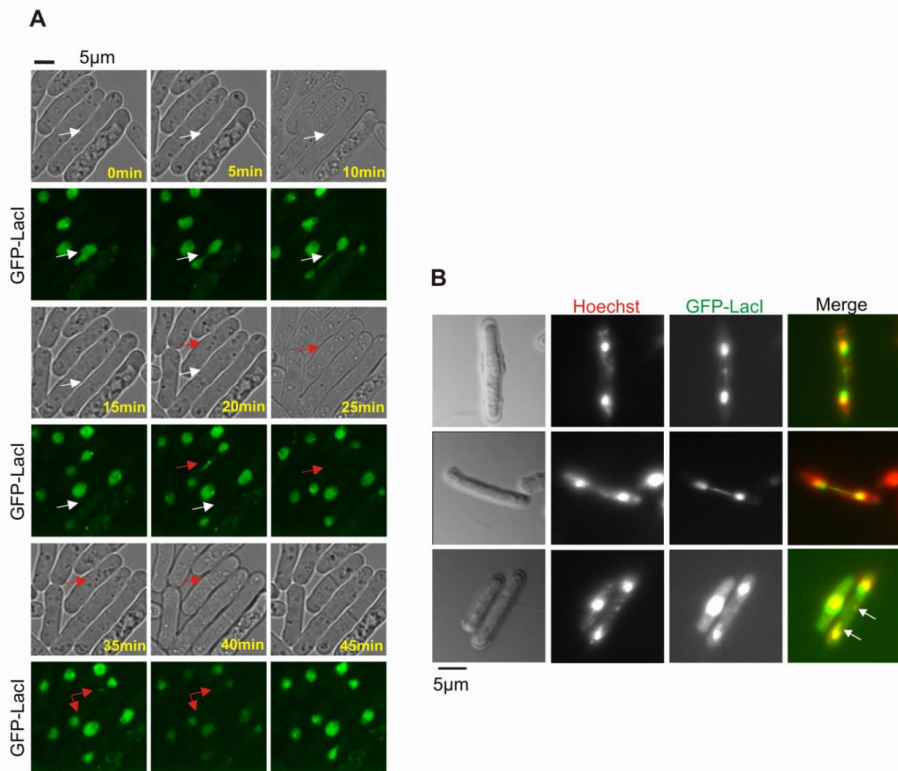


Figure S2: Examples of *LacO*-bridges and DNA staining (related to Figure 2)

A. Examples of *LacO*-bridges. Tracking of individual *LacO*-bridges in *rad52-d* cells from time-lapse movies: example of *LacO*-bridges resolved before cytokinesis, with (red arrow) and without (white arrow) breakage. Strain used: *rad52-d=AA1*.

B. Examples of Hoechst-negative stretched *LacO*-bridges (top and middle panel) and Hoechst-positive and broken *LacO*-bridges (Bottom panel). The white arrows indicate the part of the broken *LacO*-bridge positively stained with Hoechst. Strain used: *rad52-d=AA1*.

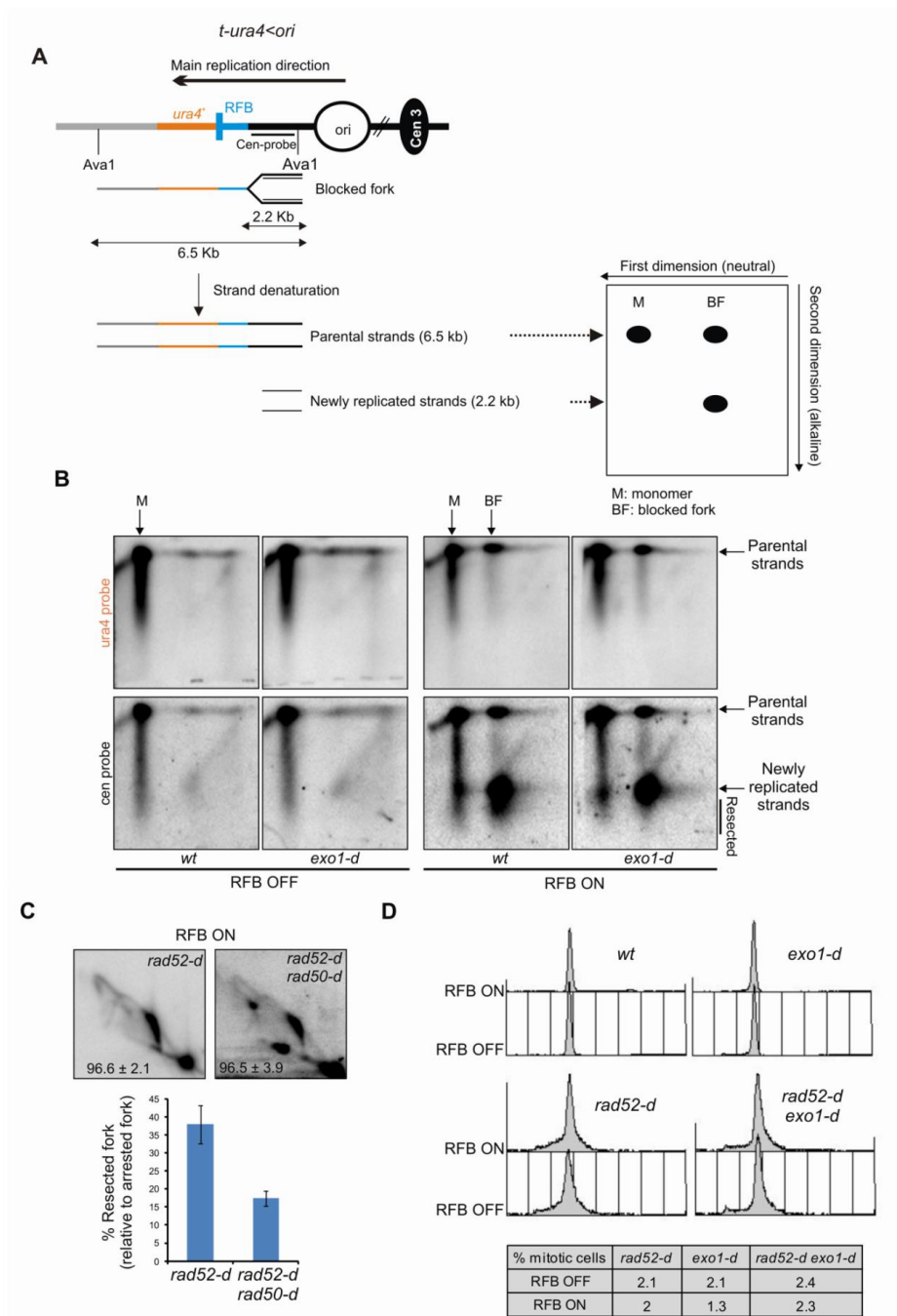


Figure S3: unprotected terminally-arrested forks contain newly replicated strands undergoing Exo1-mediated degradation (related to Figure 3 and 5)

A. Diagram of the *t-ura4<ori* containing a single *RTS1*-RFB (<, blue bars) blocking the progression of replication forks moving in the main replication direction, from the centromere towards the telomere. The locations of *Avø1* restriction sites are indicated on the figure. Newly replicated strands at the active *RTS1*-RFB are 2.2 kb long, whereas the parental strands are 6.5 kb long. Electrophoresis was performed in neutral conditions in the first dimension, making it possible to separate the monomer (M, 6.5 kb) from the blocked fork (BF, 8.7 kb). The second dimension was performed in alkaline conditions, allowing the separation of parental strands from newly replicated strands, with discrimination on the basis of size.

B. Example of neutral-alkaline 2DGE at the active (RFB ON) or inactive (RFB OFF) *RST1*-RFB in the strains indicated. Hybridization with the *ura4*-probe detected no newly replicated strands, as expected, whereas hybridization with the *cen*-probe revealed newly replicated strands forming a smear indicating that they had been resected in an Exo1-dependent manner. Strains used: *wt*=YC13, *exo1-d*=II258.

C. Top panel: Representative RI analysis by 2DGE in the *rad50-d rad52-d* mutant in the absence (RFB OFF) or presence of fork blockade (RFB ON). A DNA fragment corresponding to the *ura4* gene was used as the probe. Numbers indicate the efficiency of the *RTS1*-RFB. Values correspond to the mean of at least three independent experiments \pm standard deviation (SD).

Bottom panel: Quantification of % of fork undergoing resection (tail signals) relative to the number of blocked forks, in the strains indicated. The values shown are the means of at least three independent experiments \pm the 99% confidence interval (99% CI). Strains used: *rad52-d*=YC90, *rad50-d rad52-d*=SL817.

D. Top panel: cell cycle distribution analyzed by FACS in indicated strains and conditions. Bottom panel: % of mitotic cells in indicated strains and conditions in an asynchronous population. Strains used: *wt*=AA23, *rad52-d*=AA1, *exo1-d*=AA39, *rad52-d exo1-d*=AA42. (related to Figure 5).

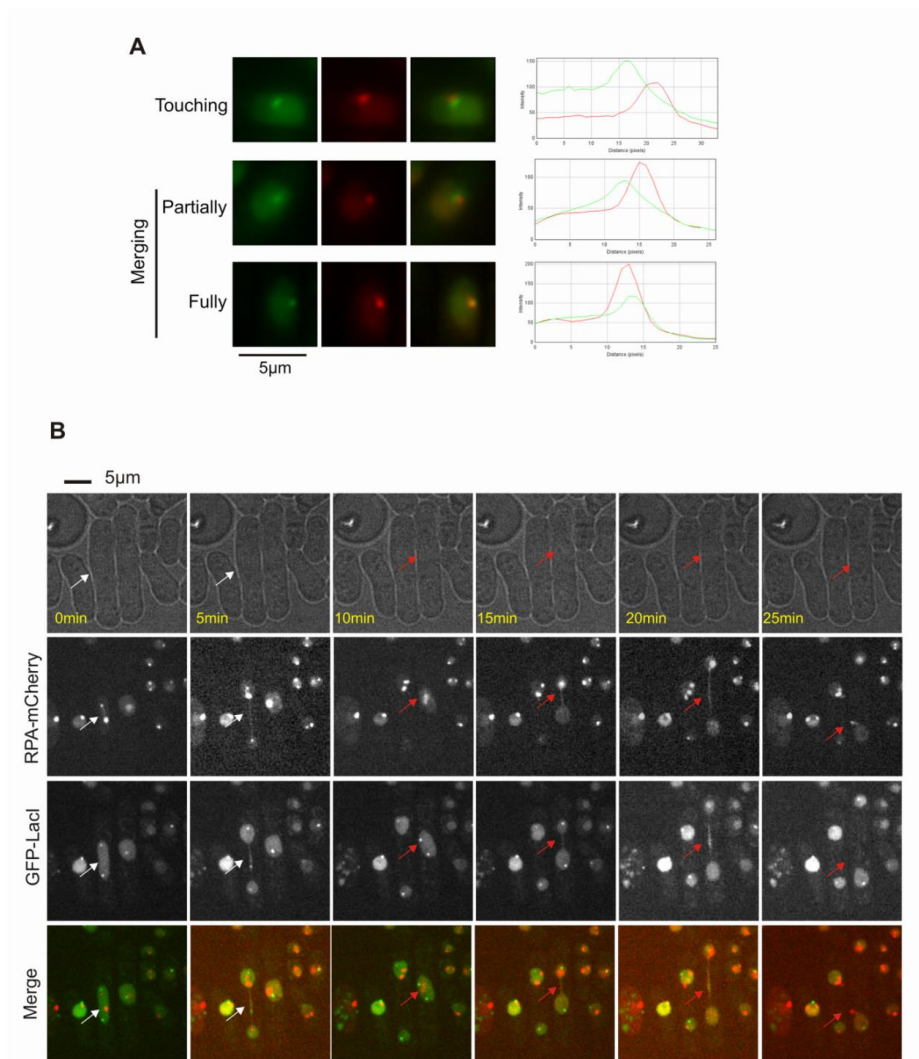


Figure S4: Examples of RPA focus co-recruited to the *RTS1*-RFB and RPA-positive *LacO*-bridges (related to Figure 4)

A. Examples of RPA focus touching/merging a GFP-LacI focus, with the respective line scans analysis done with image J. Top panel: Example of a RPA focus touching a GFP-LacI focus in the same Z-stack. Middle: Example of a RPA focus partially merging with a GFP-LacI focus in the same Z-stack. Bottom panel: Example of a RPA focus fully merging with a GFP-LacI focus in the same Z-stack.

B. Tracking of individual RPA-positive *LacO*-bridges in *rad52-d* cells from time-lapse movies. Examples of RPA-coated intertwined sister chromatid. White and red arrows represent two distinct events.

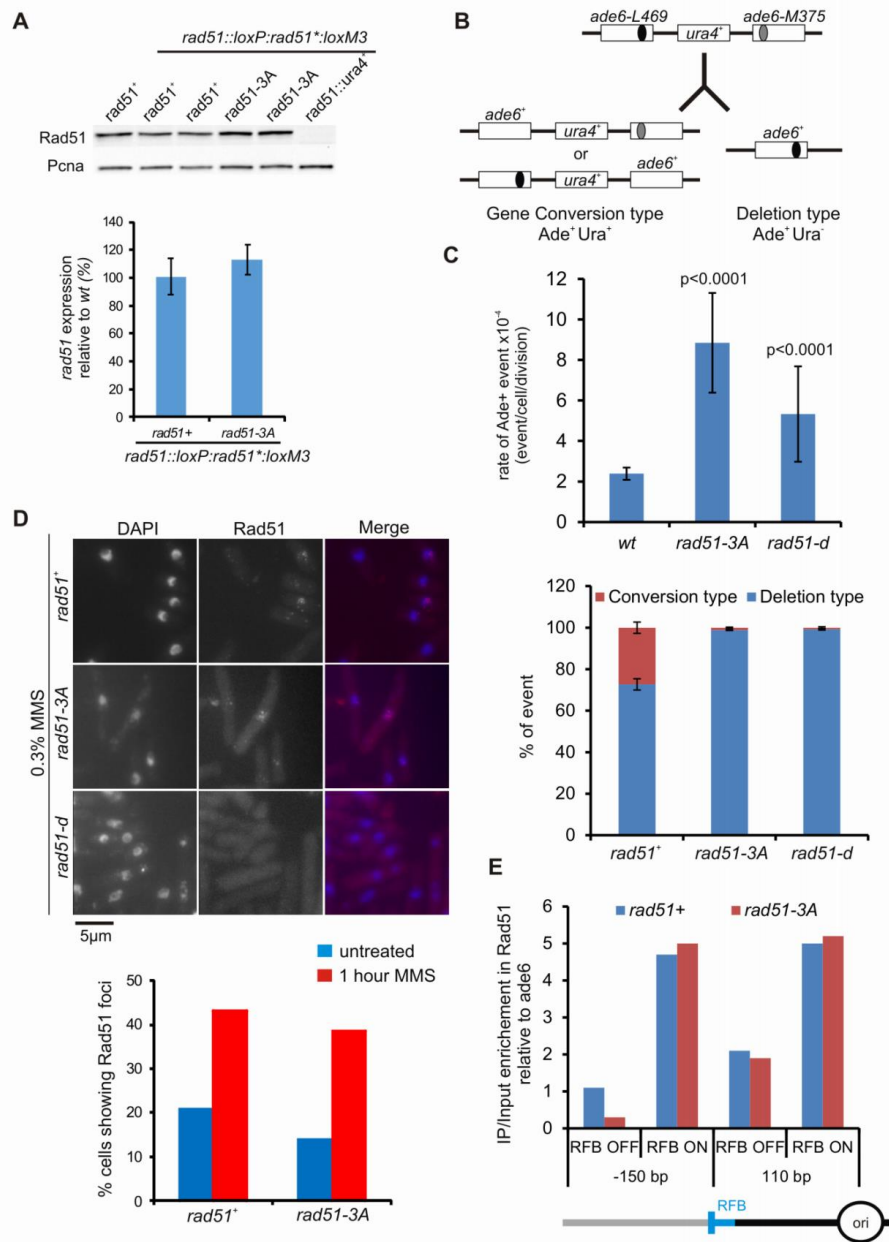


Figure S5: Characterization of the *rad51-3A* mutant (related to Figure 6)

A. Top panel: expression of *wt* and mutated forms of Rad51 (*rad51-3A*) by immunoblotting with an anti-Rad51 antibody. For integration of the *rad51-3A* allele, the *rad51+* gene was first replaced with a *ura4+* marker flanked by loxP and loxM3 sites (*rad51::loxP:ura4:loxM3*) (Watson et al. Gene 2008).

Upon expression of the site-specific Cre recombinase, the *ura4⁺* marker was replaced by either the *rad51⁺* or *rad51-3A* allele, generating the following strains: *rad51::loxP:rad51:loxM3* and *rad51::loxP:rad51-3A:loxM3*. Two independent clones were tested for each genotype. Bottom panel: quantification of Rad51 levels in the strains indicated, normalized with respect to PCNA levels. The values shown are the means of four experiments \pm the 95%CI. Strains used: *wt=AA109*, *rad51-3A=AA118*, *rad51-d=SL1010*.

B. Diagram of the direct *ade6* repeats used to monitor spontaneous recombination. Gene conversion events result in Ade⁺ Ura⁺ cells whereas deletion events result in Ade⁺ Ura⁻ cells.

C. Top panel: Rate of Ade⁺ colony (event/cell/division) in indicated strains. Values are the median rate \pm 95 CI. For each strain, 11-15 independent colonies grown on non-selective media (YEA) were re-suspended in water. Appropriate dilutions were plated on selective media (EMM –Ade and EMM –Ade -Ura) and non-selective media to score viability. Colonies were counted after 5-7 days of incubation at 30°C. Each fluctuation test was repeated two times. Statistical analysis was performed with the Mann-Whitney U test. Bottom panel: % of deletion (Ade⁺ Ura⁻) and conversion type (Ade⁺ Ura⁺) in indicated strains. Strains used: *wt=AA223*, *rad51-3A=AA237*, *rad51-d=AA241*.

D. Top panel: examples of Rad51 foci detected by immunofluorescence, using an anti-Rad51 antibody, in indicated strains. The *rad51-d* strain was used as control of antibody specificity. Cells were treated for 1 hour with 0.3 % MMS. Bottom panel: quantification of Rad51 foci in indicated strains and conditions. Strains used: *wt=AA109*, *rad51-3A=AA118*, *rad51-d=SL1010*.

E. Recruitment of Rad51 to the *RTS1*-RFB, 150 bp downstream the RFB and 110bp upstream the RFB, in indicated strains and conditions. Strains used: *wt=AA129*, *rad51-3A=AA133*.

Table S1: Strains used in this study (related to Key resources table of the STAR method section).

Strain number		Genotype	Reference
SL337	<i>h-smt0</i>	<i>t>ura4⁺<ori rtf1:nmt41:sup35 ade6-704 leu1-32</i>	Lambert et al. 2005
SL350	<i>h-smt0</i>	<i>t-ura4⁺<ori (uraR) rtf1:nmt41:sup35 ade6-704 leu1-32</i>	Lambert et al. 2005
SL363	<i>h-smt0</i>	<i>rad52::Kan t>ura4⁺<ori rtf1:nmt41:sup35 ade6-704 leu1-32</i>	Lambert et al. 2005
SL680	<i>h-smt0</i>	<i>Rad52::Kan t-ura4⁺<ori (uraR) rtf1:nmt41:sup35 ade6-704 leu1-32</i>	Lambert et al. 2010
SL382	<i>h+</i>	<i>Rad51::Kan t>ura4⁺<ori (RuraR) rtf1:nmt41:sup35 ade6-704 leu1-32</i>	Lambert et al. 2010
SL395	<i>h+</i>	<i>Rad51::Kan t-ura4⁺<ori (uraR) rtf1:nmt41:sup35 ade6-704 leu1-32</i>	Lambert et al. 2010
AA23	<i>h-smt0</i>	<i>arg3::psv40-GFP-Lacl** LacO 7,9Kb:kan t-ura4⁺<ori nmt41:rtf1:sup35 ade6-704 leu1-32</i>	This study
AA1	<i>h-smt0</i>	<i>rad52::nat arg3::psv40-GFP-Lacl** LacO 7,9Kb:kan t-ura4⁺<ori nmt41:rtf1:sup35 ade6-704 leu1-32</i>	This study
YC219	<i>h+</i>	<i>ssb3:YFP:Nat rtf1:nmt41:sup35 t<ura4-SD20-ori ade6-704 leu1-32</i>	This study
YC223	<i>h+</i>	<i>ssb3:YFP:Nat rad52::Nat rtf1:nmt41:sup35 t<ura4-SD20-ori ade6-704 leu1-32</i>	This study
YC221	<i>h+</i>	<i>ssb3:YFP:Nat exo1::Nat rtf1:nmt41:sup35 t<ura4-SD20-ori ade6-704 leu1-32</i>	This study
AC434	<i>h+</i>	<i>ssb3:YFP:Nat rad52::Kan exo1::Nat rtf1:nmt41:sup35 t<ura4-SD20-ori ade6-704 leu1-32</i>	This study
YC13	<i>h-smt0</i>	<i>t-ura4-SD20<ori rtf1:nmt41:sup35 ade6-704 leu1-32</i>	Iraqi et al. 2012
YC90	<i>h-smt0</i>	<i>rad52::Nat t-ura4-SD20<ori rtf1:nmt41:sup35 ade6-704 leu1-32</i>	Iraqi et al. 2012
II258	<i>h-</i>	<i>exo1::Nat t-ura4-SD20<ori rtf1:nmt41:sup35 ade6-704 leu1-32</i>	Iraqi et al. 2012
AA15	<i>h+</i>	<i>rad52::Nat exo1::Nat t-ura4-SD20<ori rtf1:nmt41:sup35 ade6-704 leu1-32</i>	This study
SL817	<i>h-smt0</i>	<i>rad52::Nat rad50::kan t-ura4-SD20<ori rtf1:nmt41:sup35 ade6-704 leu1-32</i>	This study
AS39	<i>h+</i>	<i>arg3::psv40-GFP-Lacl** ssb3-mCherry:kan LacO 7,9Kb:kan t-ura4⁺<ori nmt41:rtf1:sup35 ade6-704 leu1-32</i>	This study
SL1190	<i>h-smt0</i>	<i>rad52::nat ssb3-mCherry:kan arg3::psv40-GFP-Lacl** ssb3-mCherry:kan LacO 7,9Kb:kan t-ura4⁺<ori nmt41:rtf1:sup35 ade6-704 leu1-32</i>	This study
AA46	<i>h+</i>	<i>exo1::hygro ssb3-mCherry:kan arg3::psv40-GFP-Lacl** ssb3-mCherry:kan LacO 7,9Kb:kan t-ura4⁺<ori nmt41:rtf1:sup35 ade6-704 leu1-32</i>	This study
SL1194	<i>h-smt0</i>	<i>rad52::nat exo1::hygro ssb3-mCherry:kan arg3::psv40-GFP-Lacl** ssb3-mCherry:kan LacO 7,9Kb:kan t-ura4⁺<ori nmt41:rtf1:sup35 ade6-704 leu1-32</i>	This study
AA39	<i>h+</i>	<i>exo1::hygro arg3::psv40-GFP-Lacl** LacO 7,9Kb:kan t-ura4⁺<ori nmt41:rtf1:sup35 ade6-704 leu1-32</i>	This study
AA42	<i>h-smt0</i>	<i>rad52::nat exo1::hygro arg3::psv40-GFP-Lacl** LacO 7,9Kb:kan t-ura4⁺<ori nmt41:rtf1:sup35 ade6-704 leu1-32</i>	This study
SL504	<i>h+</i>	<i>rtf:nmt41:sup35 t<ura4⁺-ori ade6-704 leu1-32</i>	Iraqi et al. 2012
AA91	<i>h-smt0</i>	<i>rad52::kan rtf:nmt41:sup35 t<ura4⁺-ori ade6-704 leu1-32</i>	This study
AA95	<i>h-smt0</i>	<i>exo1::nat rtf:nmt41:sup35 t<ura4⁺-ori ade6-704 leu1-32</i>	This study
AA98	<i>h-smt0</i>	<i>rad52::kan exo1::nat rtf:nmt41:sup35 t<ura4⁺-ori ade6-704 leu1-32</i>	This study

YC266	h-	<i>rtf1::nmt41::sup35 ade6-704 ura5::hygro t-13xter-ura4SD20-ura5<ori leu1-32</i>	This study
II558	h+	<i>rad52::kan rtf1::nmt41::sup35 ade6-704 ura5::hygro t-13xter-ura4SD20-ura5<ori leu1-32</i>	This study
YC270	h+	<i>exo1::nat rtf1::nmt41::sup35 ade6-704 ura5::hygro t-13xter-ura4SD20-ura5<ori leu1-32</i>	This study
YC274	h+	<i>rad52::kan exo1::nat rtf1::nmt41::sup35 ade6-704 ura5::hygro t-13xter-ura4SD20-ura5<ori leu1-32</i>	This study
AA109	h+	<i>loxP::rad51⁺:LoxM3 ura4-D18 ade6-704 leu1-32</i>	This study
AA118	h+	<i>loxP::rad51 R152A-R324A- K334A:LoxM3 (rad51-3A) ura4-D18 ade6-704 leu1-32</i>	This study
SL1010	h+	<i>rad51::loxP::ura4+:loxM3 ura4-D18ade6-704 leu1-32</i>	This study
AA124	h-smt0	<i>loxP::rad51⁺:LoxM3 t-ura4-SD20-ori rtf1::nmt41::sup35 ade6-704 leu1-32</i>	This study
AA129	h-smt0	<i>loxP::rad51⁺:LoxM3 t-ura4-SD20<ori rtf1::nmt41::sup35 ade6-704 leu1-32</i>	This study
YC76	h-smt0	<i>Rad51::Kan t-ura4-SD20-ori rtf1::nmt41::sup35 ade6-704 leu1-32</i>	Iraqi et al. 2012
YC80	h-smt0	<i>Rad51::Kan t-ura4-SD20<ori rtf1::nmt41::sup35 ade6-704 leu1-32</i>	Iraqi et al. 2012
AA133	h-smt0	<i>loxP::rad51 R152A-R324A- K334A:LoxM3 (rad51-3A) t-ura4-SD20<ori rtf1::nmt41::sup35 ade6-704 leu1-32</i>	This study
AA139	h-smt0	<i>loxP::rad51 R152A-R324A- K334A:LoxM3 (rad51-3A) t-ura4-SD20-ori rtf1::nmt41::sup35 ade6-704 leu1-32</i>	This study
AA158	h+	<i>loxP::rad51 R152A-R324A-K334A:LoxM3(rad51-3A) arg3::psv40-GFP-LacI** LacO 7,9Kb:kan t-ura4⁺<ori nmt41::rtf1::sup35 ade6-704 leu1-32</i>	This study
AC409	h-smt0	<i>rad51::kan trp2::psv40-GFP-LacI** LacO 7,9Kb:kan t-ura4⁺<ori nmt41::rtf1::sup35 ade6-704 leu1-32</i>	This study
AA223	h-smt0	<i>loxP::rad51+:loxM3 ade6M-375int:puc8/ura4+/ade6-469 ura4D18 leu+</i>	This study
AA237	h-smt0	<i>loxP::rad51-3A:loxM3 ade6M-375int:puc8/ura4+/ade6-469 ura4D18 leu+</i>	This study
AA241	h-smt0	<i>rad51::kan ade6M-375int:puc8/ura4+/ade6469 ura4D18 leu+</i>	This study

Table S2: Primers used in this study (related to Key resources table of the STAR method section).

Name	Distance (pb) from the <i>RTS1</i> -RFB position	Sequence (5'-3')	Experiment
L3F	110	TTTAAATCAAATCTTCCATGCG	ssDNA qPCR
L3R		TGTACCCATGAGCAAAGTGC	ssDNA qPCR
L400F	450	ATCTGACATGGCATTCTCA	ssDNA qPCR
L400R		GATGCCAGACCGTAATGACA	ssDNA qPCR
L1800F	1800	GGCAAAGTAGATCCGACAGC	ssDNA qPCR
L1800R		TGAATACGCCGTTACTCCTAAAG	ssDNA qPCR
L2200F	2200	AAGGCAAGAAACGCTGAGAC	ssDNA qPCR
L2200R		GGCATGCATACTACCCGATAA	ssDNA qPCR
II50F	Locus control (ChrII)	CACCGCAGTTCTACGTATCCT	ssDNA qPCR
II50R		CGATGTAACGGTATGCGGTA	ssDNA qPCR
II150F	Chromosome II	ATCGTCAATCCATTCCGTCT	ssDNA qPCR
II150R		AACCATCTAACATACGATATGAATCCT	ssDNA qPCR
R1800F	-1800	TTACATTGCTCAATGCTGACG	ChIP RPA
R1800R		AACGTGGTAGTACGACAAGGTACA	ChIP RPA
Ura4-1F	-1100	GACTCCACGACCAACAATGA	ChIP RPA
Ura4-1R		CTGGTATCGGCTTGGATGTT	ChIP RPA
R400F	-600	CACACTTGCTCTGTACACGTATTCT	ChIP RPA
R400R		AGGATCCATGATGCACAGATT	ChIP RPA
R5F	-210	TTGCCAAACATCCTCTACC	ChIP RPA
R5R		GAAACACAAGCCAAAGTTGC	ChIP RPA
R3F	160	TTCTGTTCCAACACCAATGTTT	ChIP RPA
R3R		TGTACAAAGCCAATGAAAGATG	ChIP RPA
Ura4-1F	600	GACTCCACGACCAACAATGA	ChIP RPA
Ura4-1R		CTGGTATCGGCTTGGATGTT	ChIP RPA
Ura4-2F	950	TGATATGAGCCCAAGAAGCA	ChIP RPA
Ura4-2R		CAAATTCGCAGACATTGGAA	ChIP RPA
L5F	1500	AGGGCATTAAAGCTTATTTACAGA	ChIP RPA
L5R		TCACGTTTAATTTCAAACATCCA	ChIP RPA
L3F	1850	TTTAAATCAAATCTTCCATGCG	ChIP RPA
L3R		TGTACCCATGAGCAAAGTGC	ChIP RPA
L400F	2200	ATCTGACATGGCATTCTCA	ChIP RPA
L400R		GATGCCAGACCGTAATGACA	ChIP RPA
L600F	2500	CCATTGACTAGGAGGACTTTGAG	ChIP RPA
L600R		CCCTGGCGGTTGTAGTTAGT	ChIP RPA
L1400F	3100	AACATCGGTGACCTCGTTCT	ChIP RPA
L1400R		CTCTTCGCTCCAAGCGTTAT	ChIP RPA
Ade6-23	Chromosome III	GGCTGCCTCTACCATCATT	ChIP RPA
Ade6-25		TTAAGCTGAGCTGCCAAGGT	ChIP RPA

Movie 1: Time-lapse movie of *LacO*-bridges breaking at cytokinesis (related to Figure 1).

Movie 2: Time-lapse movie of RPA-positive *LacO*-bridge showing RPA being recruited to the RFB in the previous G2 phase (related to figure 4).

II. Le facteur du NHEJ Ku joue un rôle dans la résection des fourches de réplication bloquées non cassées

1. Résumé

La dégradation des brins néosynthétisés est une des premières étapes du redémarrage des fourches de réplication dysfonctionnelles. Cette étape doit être finement contrôlée pour prévenir des dégradation excessive et pathologique (cf. publication 1).

Dans ce présent article, la résection des fourches bloquées non cassées a été étudiée en utilisant le système *RTS1*-RFB. Dans ce système, le redémarrage des fourches de réplication par la RH requière l'exposition d'un ADNsb à la fourche. De manière intéressante, ces travaux montrent que la formation de cet ADNsb suit un modèle de résection en deux étapes, comme pour la réparation des CDBs. Plus précisément, une résection initiale dépendante du complexe MRN et Ctp1 s'opère sur une distance de 110pb. Cette résection est nécessaire et suffisante pour le redémarrage des fourches mais aussi pour amorcer la résection extensive. Cette deuxième résection est principalement dépendante de Exo1 qui permet d'exposer environ 1 Kb d'ADNsb. La résection extensive est largement dispensable pour le redémarrage des fourches par la RH. Il s'avère que cette résection en deux étapes est chapeauté par la facteur du NHEJ Ku, et ce malgré l'absence de CDB. En effet, un rôle inattendu dans la coordination de la résection et dans le redémarrage des fourches dysfonctionnelles lui a été attribué grâce à ces travaux. En l'absence de Ku, les fourches de réplication sont dégradées de façon excessive et la dynamique de redémarrage de ces fourches est ralentie.

Les résultats obtenus mettent la lumière sur des fonctions répliquatives de Ku indépendantes de son rôle dans le NHEJ et permettent de mieux étayer le mécanisme de redémarrage des fourches de réplication par la RH. D'abord, Ku se fixe au fourches de réplication bloquées (probablement suite à leur réversion) (Figure 40). Puis, MRN et Ctp1

se chargent d'évincer Ku et génèrent une courte brèche d'ADNsb. Cette brèche est requise pour la résection extensive médiée par Exo1.

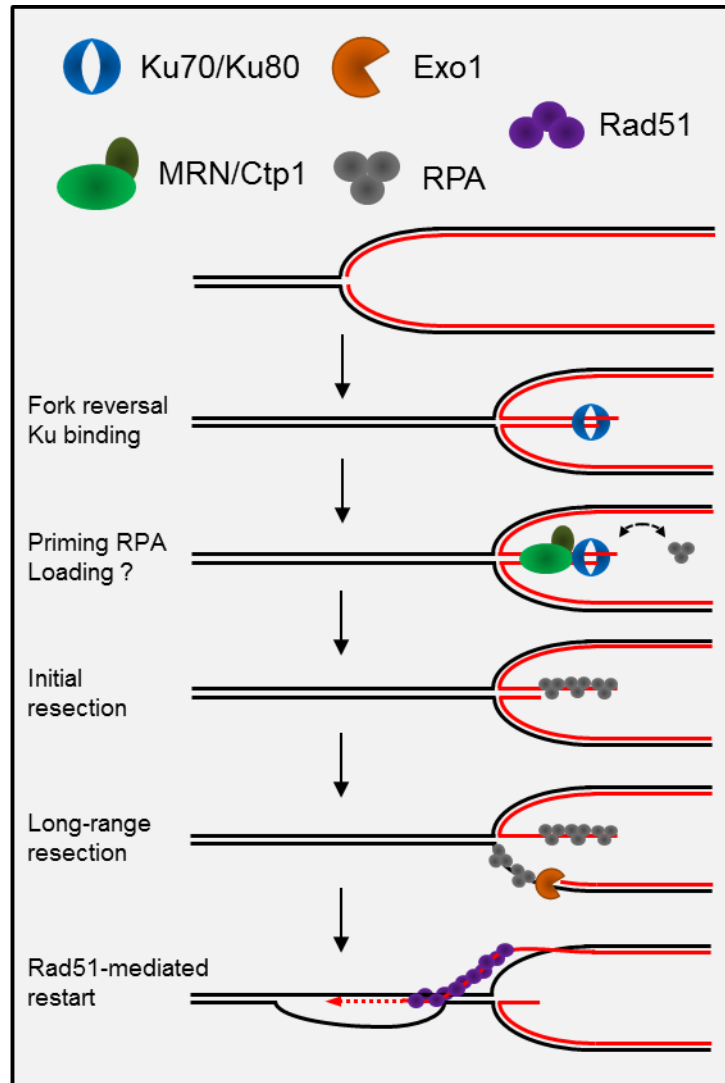


Figure 40 : Modèle proposé pour le redémarrage des fourches de réplication chez *S. pombe*.

2. Publication #2


The non-homologous end-joining factor Ku orchestrates replication fork resection and finetunes Rad51-mediated fork restart

ARTICLE

DOI: 10.1038/s41467-017-02144-5

OPEN

The end-joining factor Ku acts in the end-resection of double strand break-free arrested replication forks

Ana Teixeira-Silva ^{1,2}, Anissia Ait Saada^{1,2}, Julien Hardy^{1,2}, Ismail Iraqui^{1,2}, Marina Charlotte Nocente^{1,2}, Karine Fréon^{1,2} & Sarah A.E. Lambert^{1,2}

Replication requires homologous recombination (HR) to stabilize and restart terminally arrested forks. HR-mediated fork processing requires single stranded DNA (ssDNA) gaps and not necessarily double strand breaks. We used genetic and molecular assays to investigate fork-resection and restart at dysfunctional, unbroken forks in *Schizosaccharomyces pombe*. Here, we report that fork-resection is a two-step process regulated by the non-homologous end joining factor Ku. An initial resection mediated by MRN-Ctp1 removes Ku from terminally arrested forks, generating ~110 bp sized gaps obligatory for subsequent Exo1-mediated long-range resection and replication restart. The mere lack of Ku impacts the processing of arrested forks, leading to an extensive resection, a reduced recruitment of RPA and Rad51 and a slower fork-restart process. We propose that terminally arrested forks undergo fork reversal, providing a single DNA end for Ku binding. We uncover a role for Ku in regulating end-resection of unbroken forks and in fine-tuning HR-mediated replication restart.

¹Institut Curie, PSL Research University, CNRS, UMR3348, Orsay F-91405, France. ²University Paris Sud, Paris-Saclay University, CNRS, UMR3348, Orsay F-91405, France. Anissia Ait Saada and Julien Hardy contributed equally to this work. Correspondence and requests for materials should be addressed to S.A.E.L. (email: sarah.lambert@curie.fr)

At each cell division, ensuring the correct duplication and segregation of the genetic material is crucial for maintaining genome integrity. Although mutational events contribute to genome evolution, DNA lesions trigger genome instability often associated with human diseases such as cancer, genomic disorders, aging and neurological dysfunctions¹.

DNA replication stress constitutes a major peril for genome stability. This is particularly evident in the case of oncogene-induced proliferation, which results in replication stress and faulty genome duplication, contributing to acquire genetic instability in neoplastic lesions^{2,3}. A key feature of replication stress is the alteration of replication fork progression by numerous replication fork barriers (RFBs), DNA damage, clashes between transcription and replication machineries, DNA secondary structures and unbalanced dNTP pools. Replication stress threatens faithful DNA duplication⁴. Fork obstacles impact replisomes' functionality, and may result in replication forks stalling, requiring stabilization by the S-phase checkpoint to ensure DNA synthesis resumption⁵. Fork obstacles may also result in dysfunctional and terminally arrested forks, which lack their replication-competent state, and necessitate additional mechanisms to resume DNA synthesis. Through nucleolytic cleavage, terminally arrested forks are converted into broken forks, exhibiting one ended DSB⁶. A DNA nick directly converts an active fork into a broken fork, accompanied with a loss of some replisome components⁷. Forks lacking their replication competence, and thus terminally arrested, are often referred to as collapsed forks, whether broken or not.

Homologous recombination (HR) is one of the pathways involved in counteracting the deleterious outcomes of replication stress by ensuring the repair of DSBs and securing DNA replication⁸. HR is initiated by the loading of the recombinase Rad51 onto ssDNA, with the assistance of mediators such as yeast Rad52 and mammalian BRCA2. The Rad51 filament then promotes homology search and strand invasion with an intact homologous DNA template. HR allows the repair of forks exhibiting one ended DSB likely through break induced replication^{9–12}. However, growing evidences point out that DSBs are not a pre-requisite neither for the recruitment of HR factors at dysfunctional forks nor for their restart^{13–17}.

DSBs are also repaired by the non-homologous end joining (NHEJ) pathway which promotes the direct ligation of DNA ends with limited or no end-resection¹⁸. While HR is active in S and G2-phase, NHEJ is active throughout the cell cycle. A key component of NHEJ is the heterodimer Ku composed of two subunits, Ku70 and Ku80, both required for the stability of the complex. Yeast Ku binds dsDNA ends, inhibits end-resection, and allows the ligation of DSBs through the recruitment of Ligase 4^{19–21}. Interestingly, Ku is also involved in the repair of replication-born DSBs, where it limits end-resection^{21–24} and yeast Ku acts as a backup to promote cell survival upon replication stress^{25,26}.

In most eukaryotes, DSB resection is a two-step process^{27,28}. An initial 5' to 3' nucleolytic processing, limited to the vicinity of the DNA end, is mediated by the MRN (Mre11-Rad50-Nbs1) complex which binds DSBs as an early sensor²⁹. MRN then recruits Ctp1, a protein reported to share a conserved C-terminal domain with the mammalian nuclease CtIP and with *Saccharomyces cerevisiae* Sae2^{30,31}. The endo- and exo-nuclease activities of Mre11, stimulated by Sae2, are not strictly required to DNA end resection at "clean" DSBs, but are critical to process "dirty" ends (generated by gamma-irradiation) or blocked ends such as meiotic DSBs at which Spo11 remains covalently attached to the DNA^{19,32–35}. In yeasts, the nuclease activity of Mre11 and the Ctp1-dependent clipping function are required for Ku removal from DSBs^{19,36–38}. The second DNA end-resection step consists of a 5' to 3' long-range resection mediated by two conserved

but separate pathways dependent on either the exonuclease Exo1 or the helicase-nuclease Sgs1 (the *S. pombe* Rqh1 and the mammalian BLM orthologue)-Dna2^{27,28}. The long-range resection creates a longer 3' tailed ssDNA coated by RPA, up to 2–4 kb²⁹.

The nucleolytic processing of nascent strands at stalled replication forks is central to resume DNA synthesis but uncontrolled resection is detrimental to genome stability³⁹. There is a growing interest in understanding how ssDNA forms at forks since it constitutes a key activator of the DNA replication checkpoint, an anti-cancer therapeutic target⁴⁰. Also, fork-degradation prevented by BRCA2 plays a pivotal role in the chemo-resistance of breast cancer cell lines⁴¹. Many of the factors required for DSBs resection are also involved in the end-resection of replication forks, such as MRN, DNA2 and CtIP^{13,15,42–44}. However, contrary to DSBs, the orchestration of fork-resection is poorly understood.

Here, we investigated the formation of ssDNA gaps using a model of terminally and DSB-free arrested forks. Resection of newly replicated strands occurs in two steps. An initial resection mediated by MRN-Ctp1 generates short ssDNA gaps of ~110 bp in size which are obligatory to promote Rad51-mediated fork-restart. A long-range resection mediated by Exo1, but not Rqh1, generates larger ssDNA gaps which are dispensable to replication restart. Unexpectedly, despite the absence of DSB, we found that the MRN-Ctp1 pathway removes Ku from terminally arrested forks, allowing long-range resection to occur. The mere lack of Ku results in an extensive fork-resection, a reduced amount of RPA and Rad51 recruited to arrested forks and in slower replication fork-restart. We propose that Ku regulates the resection of DSB-free arrested forks by ensuring that fork-resection occurs as a two-step process. Our data are consistent with dysfunctional forks undergoing fork reversal, which provides a single DNA end for Ku binding. We uncover a role for Ku in regulating the resection of terminally arrested forks, in the absence of DSB, and in fine-tuning replication restart.

Results

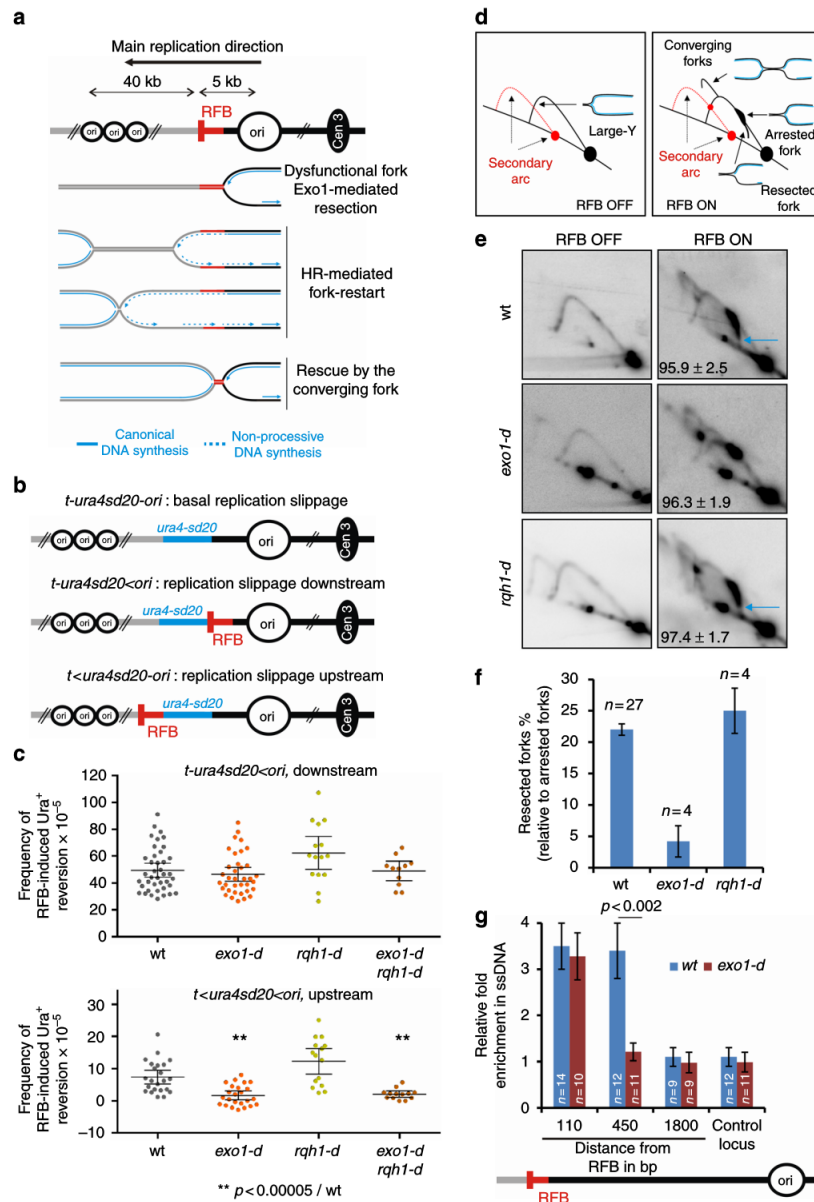
Conditional RFBs to monitor fork-resection and restart. We exploited a previously described conditional replication fork barrier (RFB), named *RTS1*, to block a replisome in a polar manner at a specific locus⁴⁵ (Fig. 1a). The blockage of the replication fork is mediated by the *RTS1*-bound protein Rtf1 whose expression is controlled through the *nmt41* promoter repressed in the presence of thiamine. Upon Rtf1 expression, > 90% of forks travelling in the main replication direction are blocked at the *RTS1*-RFB resulting in dysfunctional forks. These terminally arrested forks are either restarted by HR or rescued by the progression of opposite forks¹⁷. HR-mediated replication restart occurs in 20 min and is initiated by an ssDNA gap, not a DSB, onto which RPA, Rad52 and Rad51 are loaded^{46–48}.

Restarted forks are associated with a non-processive DNA synthesis, liable to replication slippage (RS)^{46,49}. Both strands of restarted forks are synthesized by Polymerase delta, reflecting a non-canonical replisome likely insensitive to the RFB⁵⁰. We have previously developed a reporter assay consisting of an inactivated allele of *ura4*, *ura4-sd20*, which allows us to infer the degree of RS caused by the restarted fork by monitoring the frequency of Ura⁺ reversion upon expression of Rtf1 (Supplementary Fig. 1). The frequency of Ura⁺ reversion is used as readout of the frequency at which the *ura4-sd20* allele is replicated by a restarted fork in the cell population⁴⁹. The *ura4-sd20* allele was inserted either downstream or upstream from the *RTS1*-RFB to generate the construct *t-ura4sd20 < ori* or *t < ura4sd20-ori* (*t* for telomere, < for the *RTS1*-RFB and its polarity), respectively (Fig. 1b). To monitor the basal level of RS in different genetic backgrounds,

we also generated a *t-ura4sd20-ori* construct, devoid of the *RTS1*-RFB. To obtain the true occurrence of RS by the *RTS1*-RFB, independently of the genetic background, we subtracted the RS frequency of the strain devoid of RFB from the frequency of the strain containing the *t-ura4sd20 < ori* construct, upon expression of Rtf1 (Supplementary Fig. 1). We showed that RS occurring upstream and downstream from the *RTS1*-RFB are both consequences of restarted forks and dependent on Rad51 and Rad52 (Supplementary Fig. 1)⁴⁹. Indeed, DNA synthesis associated with Rad51-mediated fork-restart occurs occasionally upstream from the initial site of fork arrest, as a consequence of ssDNA gap formation by Exo1⁴⁷. Thus, the RFB-induced Ura⁺

reversion assay allows the quantification of replication restart efficiency and an indirect monitoring of fork-resection.

A two-step resection occurs at terminally arrested forks. HR-mediated fork-restart at the *RTS1*-RFB is initiated by ssDNA gaps of ~ 1 kb in size formed upstream from terminally arrested forks⁴⁷. Indeed, no site-specific DSBs were detectable at the active *RTS1*-RFB by pulsed field gel electrophoresis and Southern-blot, even in the absence of HR^{16,17}. Also, the analysis of recombination intermediates at the *RTS1*-RFB was consistent with fork-restart occurring through a template switch event initiated by a



ssDNA gap and not a DSB¹⁷. Exo1 is the main nuclease responsible for the formation of these gaps, but the lack of Exo1 does not impair the efficiency of replication restart, suggesting that additional nucleases are likely involved⁴⁷. The DSB long-range resection is mediated by two independent parallel pathways: Exo1 and Rqh1^{Sgs1/BLM} together with Dna2^{27,28}. Upstream RFB-induced Ura⁺ reversion was abolished in *exo1-d* cells, whereas downstream RFB-induced Ura⁺ reversion was not affected (Fig. 1c)⁴⁷. The lack of Rqh1 did not affect upstream and downstream RFB-induced Ura⁺ reversion, even when *exo1* was deleted, indicating that Rqh1 is not required for fork-resection and restart (Fig. 1c).

We recently reported a novel method to monitor fork-resection by bi-dimensional gel electrophoresis (2DGE)⁵¹. We identified an intermediate originating from the fork arrest signal and descending towards the linear arc, indicative of a loss of mass and shape (Fig. 1d, e, see blue arrow). Alkaline 2DGE showed that this tail signal corresponds to terminally arrested forks containing newly replicated strands undergoing resection⁵¹. Consistent with this, the tail signal was abolished in *exo1-d* (Fig. 1e, f) as previously reported⁵¹. Importantly, the mass of resected forks is consistent with forks arrested at the *RTS1*-RFB being unbroken. Indeed, a break introduced in one chromatid arm near the fork junction would result in a loss of mass, so intermediates would migrate faster than the monomer. Thus, these analyses of fork-resection by 2DGE further support that end-resection occurs at a DSB-free arrested fork. We analysed fork-resection by 2DGE in *rqh1-d* cells. The tail signal was unaffected in *rqh1-d* cells compared to wt cells, confirming that Rqh1 is not part of a long-range resection pathway of terminally arrested forks (Fig. 1e, f).

To get a deeper analysis of ssDNA length generated upstream from the *RTS1*-RFB, we have recently developed a qPCR assay to directly monitor the presence of ssDNA, based on ssDNA being refractory to restriction digestion^{51,52}. As previously reported, in wt cells, ssDNA was enriched 110 bp and 450 bp upstream from the *RTS1*-RFB but was undetectable at 1.8 kb from the RFB (Fig. 1g). Yet, in the absence of Exo1, ssDNA was still enriched at 110 bp but not at 450 bp. These data hint at the presence of additional nucleases acting on DSB-free arrested forks to generate short ssDNA gap and subsequent replication restart.

Ctp1 acts with MRN in promoting fork-resection and restart. We investigated the role of Rad50 and Ctp1 in fork-resection and restart. Compared to wt cells, downstream RFB-induced Ura⁺ reversion was decreased by 1.8- and 3.4-fold in *ctp1-d*

and *rad50-d* cells, respectively (Fig. 2a, upper panel). The *ctp1-d rad50-d* double mutant showed a defect similar to each single mutant, showing that MRN and Ctp1 act in the same pathway. We estimated that the lack of MRN and Ctp1 results in ~70 % of forks irreversibly terminally arrested at the *RTS1*-RFB.

As observed in *exo1-d* cells, upstream RFB-induced Ura⁺ reversion was similarly abolished in *ctp1-d*, *rad50-d* and *ctp1-d rad50-d* double mutant, suggesting that MRN-Ctp1 act in fork-resection to ensure efficient DNA synthesis resumption (Fig. 2a, bottom panel). Consistent with this, analysis of fork-resection by 2DGE showed that the level of resected forks was severely and similarly decreased in both *rad50-d* and *ctp1-d* cells (Fig. 2b, c). We concluded that MRN-Ctp1 act together in promoting fork-resection and subsequent fork-restart.

We reported that Rad52 recruitment to the *RTS1*-RFB relies on Mre11, independently of its nuclease activity. We analysed two *mre11* mutated alleles (Mre11-D65N and Mre11-H134S), defective for both the endo- and exo-nuclease activities^{53–55}. These mutants showed no defect in RFB-induced Ura⁺ reversion, upstream and downstream from the RFB (Supplementary Fig. 2a). Cells expressing the Mre11-D65N mutated form showed no defect in the level of resected forks analysed by 2DGE (Supplementary Fig. 2b, c). Thus, MRN-Ctp1-dependent fork-resection and restart requires an intact MRN complex but not the Mre11 nuclease activity.

A ~110 bp sized ssDNA gap is necessary to restart fork. In contrast to Exo1-mediated fork-resection, the MRN-Ctp1-dependent resection is critical to ensure an efficient restart of DNA synthesis. We tested if MRN-Ctp1 acts upstream Exo1 in promoting the formation of ssDNA gaps. In the simultaneous absence of Exo1 and either Ctp1 or Rad50, upstream and downstream RFB-induced Ura⁺ reversion were decreased to the same extent as the single deletion of either *ctp1* or *rad50* (Fig. 2a). Fork-resection analysis by 2DGE revealed a similar defect in the single *ctp1-d* mutant and in the double *ctp1-d exo1-d* mutant (Fig. 2b, c). These data indicate that the role of MRN-Ctp1 is not redundant with Exo1 function, and that MRN-Ctp1 act upstream Exo1. To clarify the role of these factors in ssDNA gaps formation, we monitored the level of ssDNA by qPCR in *ctp1-d* and *ctp1-d exo1-d* cells. The enrichment in ssDNA at 110 bp and 450 bp was dependent on Ctp1. Thus, short and large ssDNA gaps are dependent on the MRN-Ctp1 axis (Fig. 2d). Furthermore, Exo1 was no longer required for ssDNA formation at 110 bp in the absence of Ctp1. As shown for DSB resection^{27,28}, we propose that fork-resection is a two-step process: MRN-Ctp1

Fig. 1 Short and long-range resection occurs at terminally arrested forks. **a** Scheme of the *RTS1*-RFB (red bar) integrated 5 kb away from a strong replication origin (*ori*). The *RTS1*-RFB has been integrated at the *ura4* locus, where most forks travel from the centromere-proximal origin toward the telomere. “Cen3” indicates centromere position. Distances between replication origins and the *RTS1*-RFB are indicated. 16 h after thiamine removal, forks traveling from the centromere toward the telomere are blocked in a polar manner. **b** Diagrams of constructs containing the reporter gene *ura4-sd20*, associated or not to the *RTS1*-RFB (Supplementary Fig. 1). The *ura4-sd20* allele contains a 20 nt duplication flanked by 5 bp of micro-homology⁴⁹. When the *ura4-sd20* allele is replicated by a restarted fork, the non-processive DNA synthesis undergoes replication slippage resulting in the deletion of the duplication and the restoration of a functional *ura4*⁺ gene. **c** Frequency of upstream and downstream RFB-induced Ura⁺ reversion. Each dot represents one sample from independent biological replicate. Bars indicate mean values \pm 95 % confidence interval (CI). Statistics were calculated using Mann-Whitney *U* test (Supplementary Data 1). **d** Scheme of replication intermediates (RI) analysed by neutral-neutral 2DGE of the *AseI* restriction fragment. Psoralen crosslinked DNA samples are prone to partial *AseI* digestion resulting in a secondary arc which is indicated by red dashed lines in RFB OFF and ON conditions. **e** Representative RI analysis by 2DGE in RFB ON and OFF conditions. Blue arrows indicate DSB-free arrested forks containing nascent strands undergoing resection. Numbers indicate % of blocked forks \pm standard deviation (SD). **f** Quantification of resected forks (tail signal), relative to the intensity of arrested forks. Values are means of *n* samples from independent biological replicates \pm 95% CI. **g** Relative enrichment of ssDNA formed upstream from the *RTS1*-RFB (see Methods). Data show the fold enrichment in ssDNA in the RFB ON relative to OFF condition. A locus on chromosome II is used as control. Values are means of *n* samples from independent biological replicates \pm standard error of the mean (SEM). Statistics were calculated using Mann-Whitney *U* test

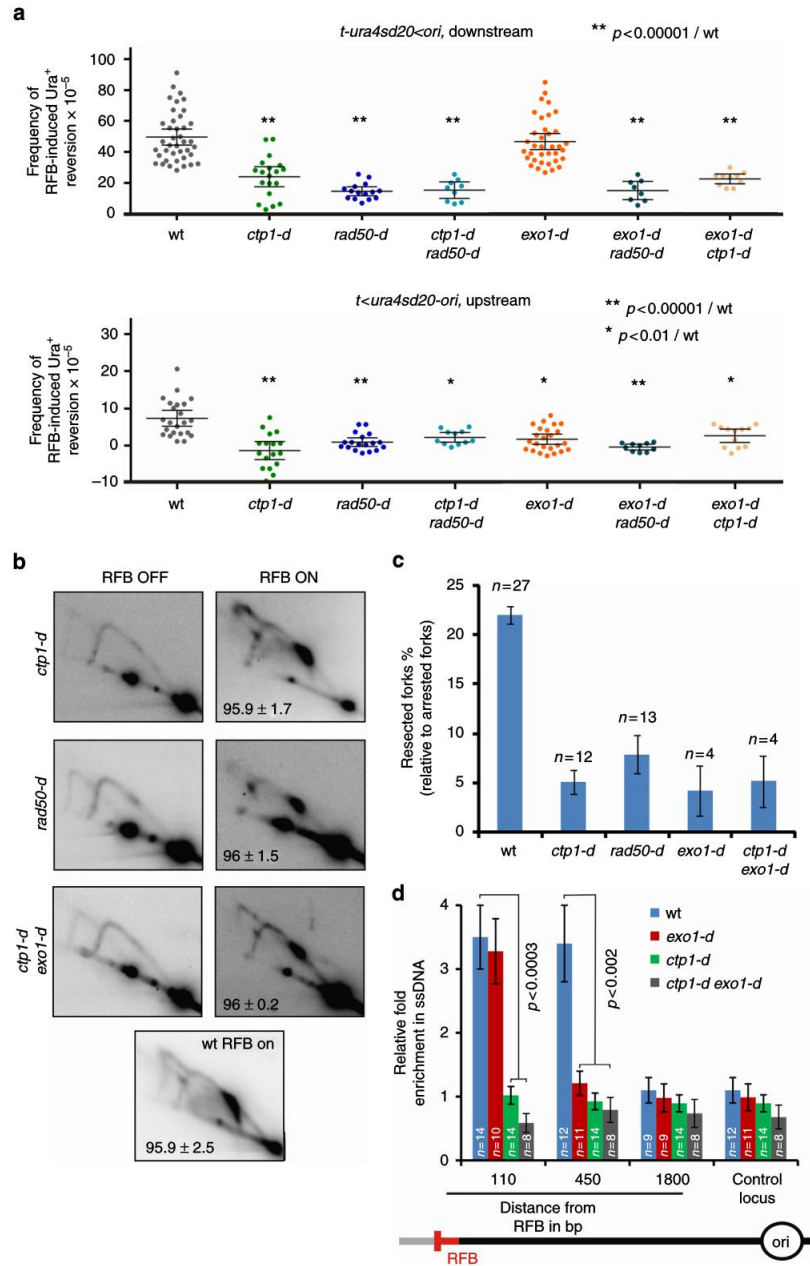


Fig. 2 MRN-Ctp1-mediated initial fork-resection primes long-range resection by Exo1. **a** Frequency of downstream RFB-induced Ura⁺ reversion (top panel, *t-ura4sd20 < ori*) and upstream RFB-induced Ura⁺ reversion (bottom panel, *t < ura4sd20-ori*) as described on Fig. 1c. **b** Representative RI analysis by 2DGE in indicated strains upon activation (RFB ON) or not (RFB OFF) of the *RTS1*-RFB, as described on Fig. 1e. **c** Quantification of forks undergoing resection (“tail signal”), relative to the intensity of terminally arrested forks, as described on Fig. 1f. Values are means of *n* samples from independent biological replicates \pm 95% CI. **d** Relative enrichment of ssDNA formed upstream from the *RTS1*-RFB, as described on Fig. 1g. Values are means of *n* samples from independent biological replicates \pm SEM. Statistics were calculated using the non-parametric Mann-Whitney *U* test. See Supplementary Fig. 2 for the analysis of the *mre11* nuclease dead mutant

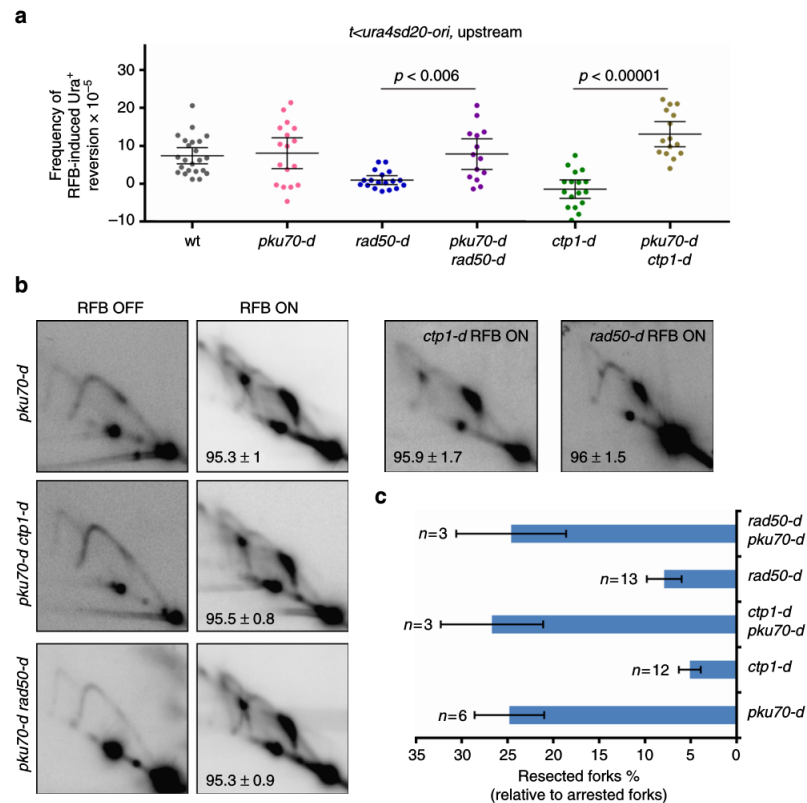


Fig. 3 The lack of Ku bypasses the initial resection of DSB-free arrested forks. **a** Frequency of upstream RFB-induced Ura^+ reversion, as described on Fig. 1c. **b** Representative RI analysis by 2DGE upon activation (RFB ON) or not (RFB OFF) of the *RTS1*-RFB, as described on Fig. 1e. Numbers indicate the % of forks blocked at the *RTS1*-RFB \pm SD. **c** Quantification of forks undergoing resection ("tail signal"), relative to the intensity of terminally arrested forks, as described on Fig. 1f. Values are means of n samples from independent biological replicates \pm 95% CI

promotes the formation of short ssDNA gaps of ~ 110 bp in size which primes Exo1-mediated long-range resection; the initial resection being critical for restarting replication forks, but not the extensive one.

MRN-Ctp1 removes Ku from terminally arrested forks. Despite the absence of detectable DSB at the *RTS1*-RFB, we tested the role of Ku in the resection of terminally arrested forks. The deletion of *pku70* on its own did not impact upstream RFB-induced Ura^+ reversion, but rescued the defect observed in *rad50-d* and *ctp1-d* cells (Fig. 3a). Analyses by 2DGE allow us to assess the level of resection at the DSB-free arrested fork. We found that the level of resected forks was fully restored in *ctp1-d pku70-d* and *rad50-d pku70-d* cells (Fig. 3b, c). Thus, the lack of Ku bypasses the requirement of MRN-Ctp1 in promoting initial resection of DSB-free arrested forks.

We investigated the recruitment of Pku70 to the *RTS1*-RFB by ChIP-qPCR. In wt cells, Pku70 was recruited to telomeres but no recruitment to the active *RTS1*-RFB was detectable (Fig. 4a, b). Possibly, the binding of Ku to terminally arrested forks is too transitory, as observed for DSBs³⁶. In the absence of Rad50, Pku70 accumulated upstream from the active *RTS1*-RFB. A similar recruitment, although to a lesser extent, was observed in *ctp1-d* cells (Fig. 4a). Consistent with the nuclease activity of Mre11 being dispensable in promoting fork-resection, Pku70 was

not detected at the *RTS1*-RFB in *mre11-D65N* cells whereas it was recruited to telomeres (Supplementary Fig. 2d, e). Collectively, these data suggest a role of MRN-Ctp1 in releasing Ku from terminally arrested forks.

The lack of Ku suppresses the sensitivity of *ctp1-d* and *rad50-d* cells not only to DSB-inducing agents but also to replication-blocking agents^{19,22,23,36}. These data were interpreted as a role of Ku in binding replication-born DSBs formed in the vicinity of stressed forks. As reported, we found that, in the strains used in this study, the deletion of *pku70* partially rescued the sensitivity of *ctp1-d* and *rad50-d* cells to very low doses of camptothecin (CPT) and methyl methane-sulfonate (MMS) (Supplementary Fig. 3). CPT is an inhibitor of topoisomerase I, which slows down replication fork progression while MMS is an alkylating agent leading to damaged replication forks. Both drugs do not induce detectable DSBs at very low doses^{56,57}. We tested whether similar genetic interactions were observed upon induction of the *RTS1*-RFB. Both *ctp1-d* and *rad50-d* cells showed a loss of viability upon induction of the *RTS1*-RFB, that is rescued by deleting *pku70* (Fig. 4c). Altogether, these data support that the inability of MRN-Ctp1 to remove Ku from terminally arrested forks is a lethal event.

Ku ensures that DSB-free forks are resected in two steps. In the absence of Ku, MRN-Ctp1 is no longer needed to promote

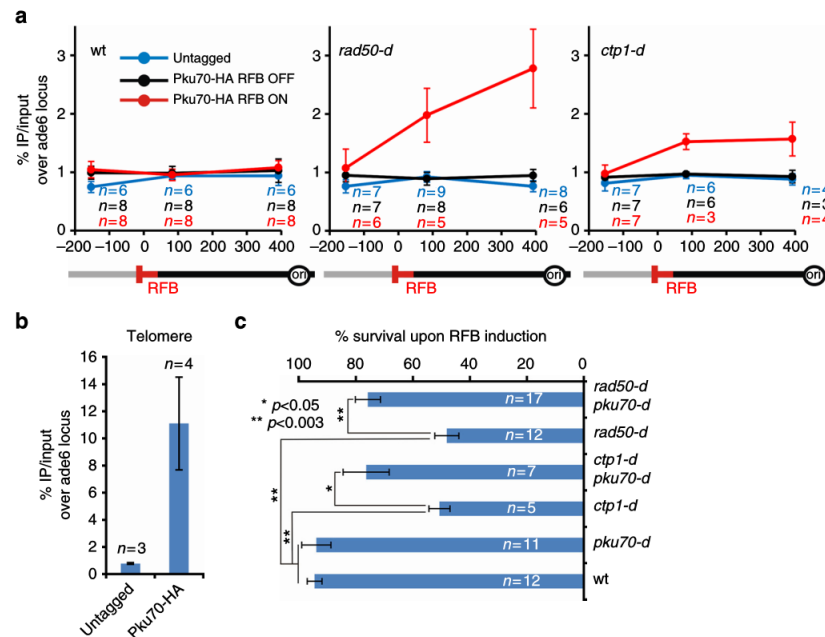


Fig. 4 MRN-Ctp1 allow Ku eviction from terminally arrested forks. **a** Analysis of Ku recruitment to the *RTS1*-RFB by ChIP-qPCR in indicated strains and conditions. Upstream and downstream distances from the RFB are indicated in base pairs (bp). Values are means of n samples from independent biological replicates \pm SEM. Statistical analysis was performed using the non-parametric Mann-Whitney U test. **b** Analysis of Ku recruitment to telomeres in wt strain. Values are means of n samples from independent biological replicates \pm SD. **c** Survival of the indicated strains upon activation of the barrier relative to OFF condition. Values are means of n samples from independent biological replicates \pm SEM. Statistics were calculated using the non-parametric Mann-Whitney U test. See Supplementary Fig. 3 for the analysis of cell sensitivity to CPT and MMS

ssDNA gap formation. We tested whether fork-resection is dependent on Exo1 in the absence of Ku. First, upstream RFB-induced Ura^+ reversion observed in the *pku70-d ctp1-d* double mutant was dependent on Exo1 (Fig. 5a). Second, 2DGE analysis revealed that fork-resection occurring in *ctp1-d pku70-d* cells was dependent on Exo1 (Fig. 5b, c). Third, as reported by Langerak et al.³⁶, the suppressive effect of *pku70* deletion on *ctp1-d* cells sensitivity to CPT and MMS was dependent on Exo1 as the *pku70-d ctp1-d exo1-d* triple mutant exhibited the same sensitivity as the single *ctp1-d* mutant (Supplementary Fig. 3). These data establish that the bypass of initial fork-resection by the lack of Ku relies on Exo1. We propose that Ku has an inhibitory effect on the Exo1-mediated long-range fork-resection, requiring a MRN-Ctp1 relief, as proposed for DSBs and telomeres resection.

In the absence of Ku, DSB-free arrested forks are no longer resected in a two-step manner and ssDNA gaps are directly formed by Exo1. Quantification of ssDNA by qPCR showed that ssDNA was significantly more abundant at 1.8 kb upstream from the *RTS1*-RFB in *pku70-d* cells compared to wt cells (Fig. 5d). 2DGE analysis revealed that this extensive fork-resection relies on Exo1 (Fig. 5b, c). Thus, in the absence of Ku, DSB-free arrested forks are excessively resected through the Exo1-mediated long-range resection. We propose that Ku regulates the formation of ssDNA gaps by ensuring that fork-resection occurs in a two-step manner.

The lack of Ku delays fork-restart independently of NHEJ. To test whether the lack of Ku impairs HR-mediated fork-restart, we

applied the downstream RS assay to *pku70-d* cells. RFB-induced Ura^+ reversion was decreased by 2.2-fold compared to wt, indicating that the downstream *ura4-sd20* allele is less frequently replicated by a restarted fork in the absence of Ku (Fig. 6a). This cannot be explained by a lower expression of Rad51, Rad52 and RPA (Supplementary Fig. 4a, b). We tested a possible involvement of Ligase 4, and found no defect in upstream and downstream RFB-induced Ura^+ reversion in *lig4-d* cells, showing that Ligase 4 is not required to promote fork-resection and subsequent restart (Supplementary Fig. 4c).

We asked whether excessive fork-resection occurring in *pku70-d* cells impacts downstream RFB-induced Ura^+ reversion. We analysed the *pku70-d exo1-d* double mutant in which long-range resection is abolished, and the *pku70-d ctp1-d*, and the *pku70-d rad50-d* double mutants, in which long-range resection still occurs (Fig. 5b). The three strains behave as the single *pku70-d* strain, with a \sim 2-fold reduction in RFB-induced Ura^+ reversion compared to wt (Fig. 6a and Supplementary Fig. 4d). Thus, the lack of Ku decreases the frequency at which the downstream *ura4-sd20* allele is replicated by a restarted fork, regardless of the extent of fork-resection and the length of ssDNA gaps.

Next, we tested a strain in which fork convergence from the distal side is minimized by the presence of 10 repeats of the TER2 and TER3 rDNA rRFBs (Fig. 6b). Unlike the *RTS1*-RFB, TER2 and TER3 slow down fork progression without inducing terminally arrested forks and recruitment of HR factors⁴⁶. Delaying the arrival of opposite forks allows more time for the process of HR-mediated fork-restart to occur at the *RTS1*-RFB⁵⁰. We monitored the level of downstream RFB-induced Ura^+ reversion in wt and *pku70-d* and observed no significant

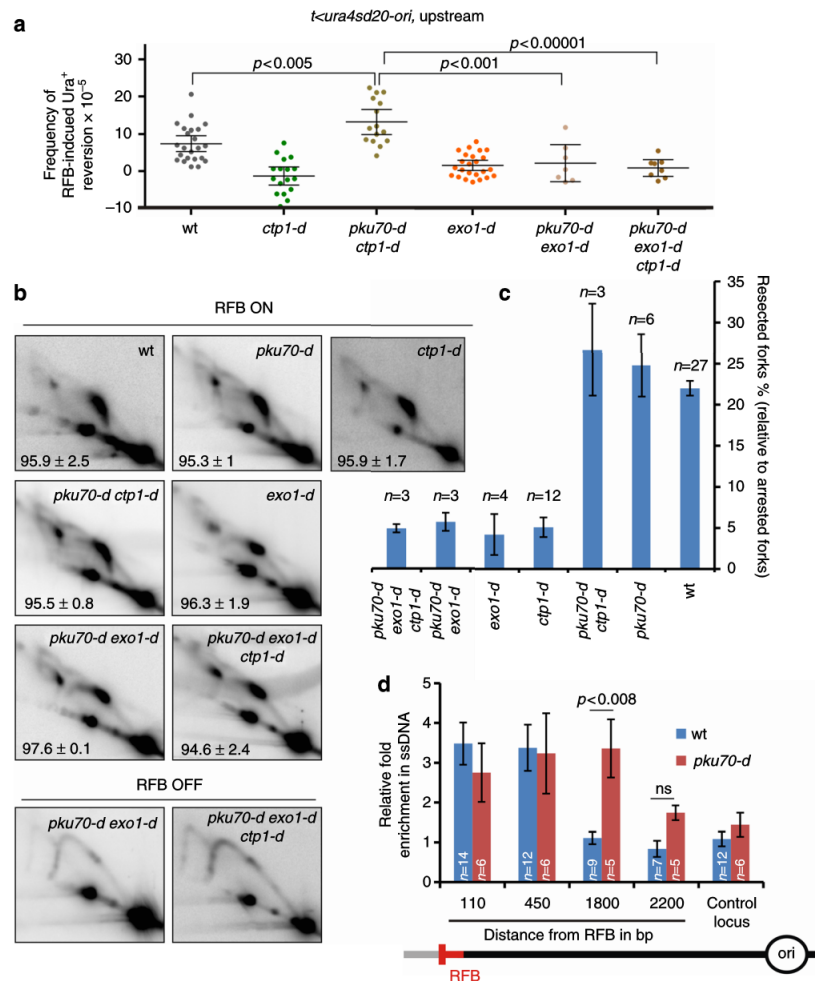


Fig. 5 Ku ensures that fork-resection occurs as a two-step process. **a** Frequency of upstream RFB-induced Ura^+ reversion, as described on Fig. 1c. **b** Representative RI analysis by 2DGE upon activation (RFB ON) or not (RFB OFF) of the *RTS1*-RFB, as described on Fig. 1e. **c** Quantification of forks undergoing resection (“tail signal”), relative to the intensity of terminally arrested forks, as described on Fig. 1f. Values are means of n samples from independent biological replicates \pm 95% CI. **d** Relative enrichment of ssDNA formed upstream from the *RTS1*-RFB in indicated strains. The data shown are the fold enrichment in ssDNA in the ON condition (RFB active) relative to the OFF condition (RFB inactive). Values are means of n samples from independent biological replicates \pm SEM. Statistics were calculated using Mann-Whitney U test

differences, even when the *Exo1*-mediated long-range resection was abolished (Fig. 6b). Thus, the defect in RFB-induced Ura^+ reversion is rescued by delaying the arrival of converging forks. These data suggest that the *ura4-sd20* allele is less frequently replicated by a restarted fork in the absence of Ku because of a slow HR-mediated fork-restart process rather than an inability to restart replication forks.

The lack of Ku impairs RPA and Rad51 recruitment. We investigated the dynamics of RPA recruitment to the *RTS1*-RFB by fluorescence-based imaging in living cells. We employed a strain in which a GFP-LacI-bound *LacO* array was integrated close to the *RTS1*-RFB, and expressing the RPA subunit Ssb3 fused to mCherry⁵¹ (Fig. 7a). In both wt and *pku70-d* strains, we observed a similar increase in S-phase cells showing RPA

recruitment to the *LacO*-marked RFB (Fig. 7b). Such recruitment did not occur in G2 cells. Thus, RPA is recruited to resected forks in S-phase cells and then evicted once arrested forks have been arrested or rescued by converging forks. Thus, despite that the absence of Ku slows down the process of fork-restart, this does not result in an accumulation of unresolved arrested forks in G2 cells, showing that dysfunctional forks are ultimately rescued by the progression of opposite forks.

When performing cell imaging, we noticed that RPA foci were less bright in the absence of Ku, so we quantified the area and intensity of RPA foci recruited to the *LacO*-marked RFB. We found that the area was not affected, whereas the intensity of RPA foci was decreased by half in *pku70-d* cells compared to wt (Fig. 7c). We have analysed the recruitment of RPA and Rad51 to the *RTS1*-RFB by ChIP-qPCR and found that both RPA and Rad51 were less recruited to arrested forks in *pku70-d* cells

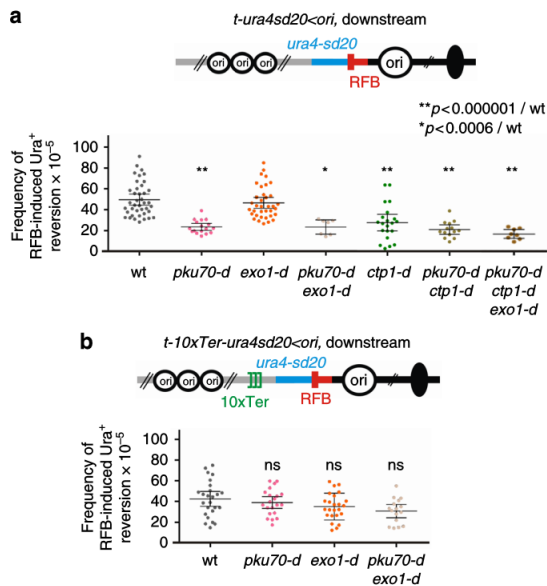


Fig. 6 The lack of Ku slows down HR-mediated fork-restart. **a** Frequency of downstream RFB-induced Ura⁺ reversion, as described on Fig. 1c. **b** Frequency of downstream RFB-induced Ura⁺ reversion using the *t-10xTer-ura4sd20 < ori* construct at which the progression of the converging fork is delayed. Each dot represents one sample from independent biological replicates. Bars indicate mean values ± 95% CI. Statistics were calculated using the Mann-Whitney *U* test. See Supplementary Fig. 4 for the expression of recombination factors and analysis of the *lig4-d* mutant

compared to wt (Fig. 7d). This defect in recruiting single stranded DNA binding proteins cannot be explained by a reduced amount of ssDNA in the absence of Ku, as ssDNA gaps are ~ twice longer than in wt cells (Fig. 5d). In addition, as observed in budding yeast, we found that Pku70 interacts with RPA, independently of DNA and RNA⁵⁸. Indeed, Pku70-HA co-immuno-precipitated with two RPA subunits, Rad11-YFP and Ssb3-YFP, from protein extracts treated with benzonase (Fig. 7e and Supplementary Fig. 5). Thus, we identify unexpected outcomes at a DSB-free arrested fork in the mere absence of Ku, including extensive fork-resection, reduced recruitment of HR factors and a slow-down on the HR-mediated fork-restart process.

Discussion

Rad51-dependent processing of replication forks can occur independently of DSB^{14,17}. In this work, we investigated the resection step of DSB-free arrested forks, a critical step to expose ssDNA and subsequent recruitment of RPA and Rad51 to promote fork-restart⁴⁷. We made unexpected findings. First, the two-step model of DSB resection applies to DSB-free arrested forks. Secondly, the initial step of fork-resection includes Ku eviction, suggesting that dysfunctional forks undergo fork reversal, providing a single dsDNA end for Ku binding. Third, the lack of Ku impacts several steps of HR-mediated fork processing, independently of NHEJ, resulting in an extensive fork-resection, a reduced recruitment of RPA and Rad51 and a slower HR-mediated fork-restart process.

We show that Ku is recruited to terminally arrested forks. Our previous studies have revealed that no site-specific DSB could be detected at the *RTS1*-RFB, even in the absence of HR^{16,17}.

Recently, we established that in the absence of Rad52 or Rad51, arrested forks are unprotected and converted into mitotic sister chromatid bridges which favor chromosome breakage randomly during mitosis but not in S-phase⁵¹. The analysis of fork-derived intermediates by 2DGE relies on the identification of replication intermediates based on their mass and shape. Our 2DGE analyses are consistent with end-resection of nascent strands being initiated from a DSB-free arrested fork⁵¹. Exploiting the *RTS1*-RFB, our data strongly suggest that Ku is recruited to DSB-free arrested forks at which it ensures that fork-resection occurs as a two-step process. Indeed, we establish that Ku inhibits Exo1-mediated long-range resection of DSB-free arrested forks. MRN-Ctp1 counteracts this inhibition. Ku binds dsDNA ends with high affinity, and with poor affinity for ssDNA⁵⁹. Despite the lack of DSBs, we demonstrate that Ku is recruited to the RFB. These surprising findings favor a model in which DSB-free arrested forks undergo fork reversal⁵⁶ (Fig. 8). Reversed forks are DNA structures in which newly replicated strands are annealed together, exposing a single dsDNA end for Ku binding. Fork reversal was shown, in mammals, to occur in response to various replication stresses, such as low doses of CPT and MMS, even in absence of replication-born DSBs¹⁴.

Ku is involved in the repair of replication-born DSB, either generated by defect in processing Okazaki fragments, CPT-induced, or genetically engineered^{19,22–24,36}. The mammalian Ku associates with nascent strands after CPT treatment⁶⁰ and fission yeast Ku is recruited to the rDNA RFB to stabilize blocked forks²⁶. While these data are consistent with Ku being recruited to one ended DSB formed in the vicinity of replication forks, our finding suggest an alternative route to Ku recruitment, independently of DSBs. We propose that the DNA end of reversed fork is recognized and processed as a DSB, despite the absence of detectable DNA breakage (Fig. 8).

MRN and Ctp1 act together to expose ssDNA at DSB-free arrested forks. The lack of the MRN-Ctp1 axis results in Ku persisting at replication forks. Possibly, MRN-Ctp1 initiates fork-resection to create a substrate less favorable to Ku binding¹⁹. However, the lack of Ku impacts replication and recombination outcomes at the RFB, suggesting that Ku binds arrested forks even if the MRN-Ctp1 axis is functional. Thus, we propose that Ku is recruited early, likely on the reversed arm, and is then quickly evicted by MRN-Ctp1. In support of this, a rapid interplay, occurring within seconds after DNA damage, have been reported between mammalian Ku and MRN in mammals⁶¹.

MRN has a catalytic and structural role in DSBs resection⁶². As observed for the resection of “clean” DSBs^{32,36}, the Mre11 nuclease activity is dispensable to the process of fork-resection and restart. Langerak et al. have reported that Ku removal from DSBs requires MRN, Ctp1 and the nuclease activity of Mre11³⁶. Thus, the requirement of the Mre11 nuclease activity in Ku removal is different at DSB-free arrested forks and DSBs. The tetrameric form of Ctp1 has a scaffolding role in DSBs resection, through DNA binding and bridging activities⁶³. Purified Ctp1 shows a binding preference for branched structure containing dsDNA and ssDNA, but no apparent nucleolytic activity was detected in vitro, in contrast to Sae2 and CtIP⁶³. We propose that MRN-Ctp1 functions in initiating fork-resection, promoting Ku eviction and HR-mediated fork-restart involve a structural rather than a nucleolytic role. Possibly, MRN-Ctp1 may recruit additional nucleases which remain to be identified.

MRN-Ctp1 and their homologues counteract the accumulation of Ku at one-ended DSB to promote Exo1-dependent resection^{23,36,38}. The persistence of Ku on DNA end impairs the recruitment of yeast RPA and mammalian Rad51 without affecting end-resection^{24,36}. In fission yeast, a single broken fork is lethal in *ctp1-d* cells³⁶. Here, we establish that a single

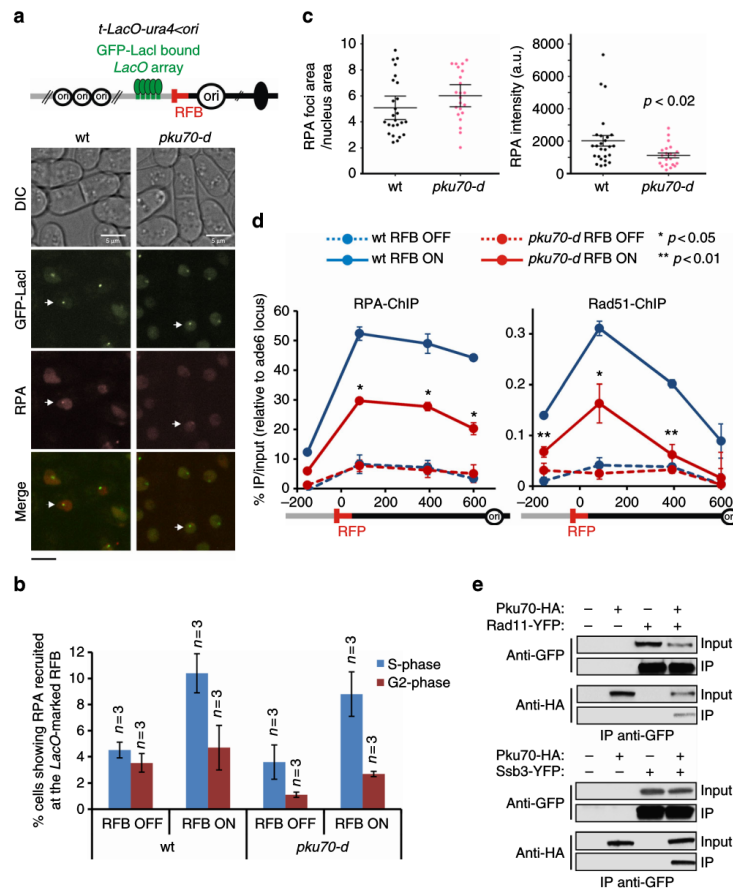


Fig. 7 The lack of Ku impairs RPA and Rad51 recruitment to terminally arrested forks. **a** Top panel: scheme of the *LacO*-marked *RTS1*-RFB. Bottom panel: representative images showing RPA (labelled with Ssb3-mCherry) recruitment to the *LacO*-marked RFB. Of note, to avoid biases toward a random localization of GFP-LacI and RPA foci, cells with ≥ 3 RPA foci were excluded from the analysis. Scale bars correspond to 5 μ m. **b** % of cells showing RPA recruitment to the *LacO*-marked RFB, according to cell cycle phase. G2 and S-phase cells are mononucleated cells and bi-nucleated cells with a septum, respectively. Values are means of *n* samples from independent biological replicates \pm SD. **c** Area and intensity of RPA foci recruited to the *LacO*-marked RFB. Each dot represents one RPA foci in S-phase upon RFB activation. Bars indicate the mean value \pm 95% CI. Statistics were calculated using the non-parametric Mann-Whitney *U* test. **d** Analysis of RPA and Rad51 recruitment to the *RTS1*-RFB by ChIP-qPCR in indicated strains and conditions. Upstream and downstream distances from the RFB are indicated in base pairs (bp). The values are the means of three to four samples from independent biological replicates \pm SEM. Statistical analysis was performed using the Mann-Whitney *U* test. **e** Co-immunoprecipitation of Pku70-HA with two subunits of RPA, Rad11 and Ssb3, fused to the YFP epitope. Experiments were performed in the presence of benzonase. For a longer exposure, see Supplementary Fig. 5

terminally arrested fork is lethal in the absence of either MRN or Ctp1. This lethality is in part caused by the binding of Ku to dysfunctional forks. Thus, we propose that Ku eviction from DSB-free arrested forks by MRN-Ctp1 is an essential step for subsequent replication restart and cell viability.

Together with our previous work, our data establish that the resection of DSB-free arrested forks occurs as a two-step process which is regulated by Ku. The initial MRN-Ctp1-dependent resection promotes Ku eviction and generates ~ 110 bp of ssDNA, essential to the recruitment of HR factors and subsequent fork-restart⁴⁷. The second step is a long-range resection, mediated by

Exo1, but not Rqh1, generating up to 1 kb of ssDNA which is not strictly required to the resumption of DNA synthesis. Thus, a limited amount of ssDNA is sufficient to promote Rad51-mediated fork-restart, whereas long-range resection may reinforce checkpoint activation.

In the absence of Ku, MRN-Ctp1 is no longer required to initiate fork-resection, which then relies only on Exo1. As a consequence, DSB-free arrested forks are extensively resected with an accumulation of ~ 2 kb of ssDNA. This supports the notion that Exo1 inhibition by Ku takes place at the initial resection step even with a functional MRN-Ctp1 axis.

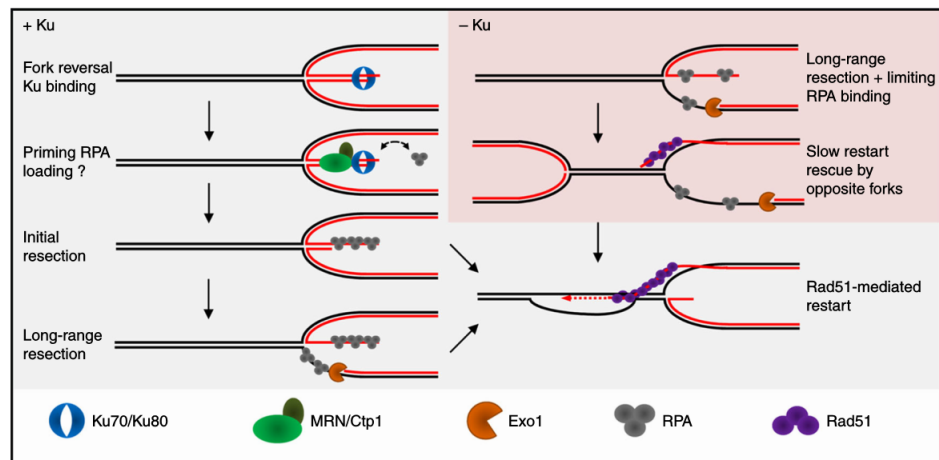


Fig. 8 Model of two-step resection of DSB-free arrested forks regulated by Ku. In wt cells, DSB-free arrested forks undergo fork reversal providing a single DNA end for Ku binding. MRN-Ctp1 allows Ku removal, generating a 110 bp sized ssDNA on which Rad51 nucleates to promote strand invasion within the restored parental duplex. The initial fork-resection primes the Exo1-mediated long-range resection. Through direct or indirect physical interactions, Ku may be recruited in association with RPA to facilitate its loading on ssDNA. In the absence of Ku, the reversed arm is directly resected by Exo1 resulting in an extensive fork-resection. Possibly, this may destabilize the reversed fork and impact the recruitment of HR factors

Remarkably, the initial resection of DSBs and telomeres is increased in the absence of Ku^{21,38}. Thus, Ku plays an important role in ensuring that fork-resection occurs in two steps to avoid unnecessary extensive resection, which can be detrimental to genome stability.

Previous works have proposed a NHEJ-independent role of Ku at replication-born DSBs, to channel repair towards the HR pathway^{22,23,36}. Fission yeast genetics indicate a role for Ku in the recovery from replication stress and stabilizing replication forks^{25,26}. An important finding we made is that the mere lack of Ku slows down the process of HR-mediated fork-restart, accompanied with a reduced recruitment of RPA and Rad51. These data contrast with Ku acting as a barrier against RPA loading onto ssDNA during DSB repair³⁶, suggesting replicative-specific functions for Ku. Possibly, Ku may help to transiently stabilize the reversed arm to maintain the fork in a recombination-dependent state. RPA is a critical factor to control end-resection, stability of ssDNA and subsequent recruitment of HR factors⁶⁴. As observed in budding yeast⁵⁸, we report physical interactions between Ku and RPA in the absence of exogenous DNA damage, indicating that a cellular fraction of Ku proteins is associated with RPA, directly or indirectly. Thus, Ku may also be recruited to arrested forks in association with RPA to facilitate RPA loading onto ssDNA. We propose that Ku fine-tunes HR-mediated fork-restart by an unknown mechanism (Fig. 8).

Ku allows the recruitment of downstream NHEJ factors such as Ligase 4 to promote DSBs ligation. We found no role for Ligase 4 in promoting fork-resection and restart. Rather, our data suggest that NHEJ inhibition enhances HR-mediated replication restart. Given the potential deleterious outcomes of error-prone NHEJ events on genome stability, it is possible that the recruitment of additional NHEJ factors is prevented to avoid unwanted ligation of the reversed arm at terminally arrested forks.

Recent reports indicate that ssDNA stabilization by RPA influences repair pathway choice at DSB between BIR and microhomology-mediated end joining (MMEJ)^{65,66}. MMEJ is an alternative NHEJ mechanism, independent of Ku and Ligase 4 that promotes DSB repair toward chromosomal rearrangement. We

propose that the lack of Ku, resulting in reduced RPA and Rad51 recruitment to dysfunctional forks, may favor MMEJ events.

Methods

Standard yeast genetics. Yeast strains used in this work are listed in Supplementary Table 1. Gene deletion and gene tagging were performed by classical and molecular genetics techniques⁶⁷. Strains containing the replication *RTS1*-RFB were grown in supplemented EMM-glutamate media containing thiamine at 60 μ M. To induce the *RTS1*-RFB, cells were washed twice in water and grown in supplemented EMM-glutamate media containing thiamine (Rtf1 repressed, RFB OFF condition) or not (Rtf1 expressed, RFB ON condition) for 24 h.

Analysis of replication intermediates by 2DGE. Replication intermediates were analyzed by 2DGE as follows⁵¹. Exponentially growing cells (2.5×10^9) were harvested with 0.1% sodium azide and frozen EDTA (80 mM final concentration). Genomic DNA was crosslinked by adding trimethyl psoralen (0.01 mg/ml, TMP, Sigma, 3902-71-4) to the cell suspensions, for 5 min in the dark. Then, cells were exposed to UV-A (365 nm) for 90 s at a flow of 50 mW/cm². Cells were lysed with 0.625 mg/ml lysing enzyme (Sigma, L1412) and 0.5 mg/ml zymolyase 100 T (Amsbio, 120493-1). The resulting spheroplasts were then embedded into 1% low melting agarose (InCert Agarose, Lonza) plugs, and then incubated overnight at 55 °C in a digestion buffer containing 1 mg/ml of proteinase K (Euromedex EU0090) and then washed and stored in TE (50 mM Tris, 10 mM EDTA) at 4 °C. DNA digestion was performed with 60 units per plug of the restriction enzyme *AseI* and equilibrated at 0.3 M NaCl. Replication intermediates were enriched using BND cellulose columns (Sigma, B6385) as described in Lambert et al.¹⁷. RIs were migrated in 0.35% agarose gel in TBE for the first dimension. The second dimension was migrated in 0.9% agarose gel-TBE supplemented with EtBr⁶⁸. DNA was transferred to a nylon membrane in 10 \times SSC. Membranes were incubated with a ³²P radio-labeled *ura4* probe, and RIs were detected using phosphor-imager software (Typhoon-trio) and quantified with ImageQuantTL.

Live cell imaging. Cell preparation was done as follows⁵¹. Cells were grown in supplemented filtered EMM-glutamate, washed twice and resuspended in fresh filtered media without supplements. A drop of 1–2 μ l of exponentially growing cultures was placed on a well of a microscope slide (Thermo Scientific) coated with 1.4% ultrapure agarose (Invitrogen, 16500–500) prepared in filtered EMM. Acquisition was performed using an automated spinning disc confocal microscope (Nikon Ti Eclipse inverted) equipped with an ORCA Flash 4.0 camera, a temperature control box set at 30 °C and a 100 \times oil immersion objective with a numerical aperture of 1.49. Z-stack image acquisition was performed using the METAMORPH software, and the analysis of the resulting images was performed using ImageJ (<https://imagej.nih.gov/ij/>). Image acquisition and analysis were performed on workstations of the PICT-IBISA Orsay Imaging facility of Institut Curie. Ssb3-mCherry and GFP-LacI foci merging/touching was analyzed taking into account cell cycle phase and RFB activation (OFF and ON). "Foci merging/"

touching” refers to foci that partially or completely overlap, or to joint foci. The area of Ssb3-mCherry foci that merge with GFP-LacI foci in S-phase cells in ON condition was normalized by the total area of the nucleus. Ssb3-mCherry foci intensity was measured using ImageJ (IntDen); to that value, the nucleus background fluorescence intensity was subtracted.

DNA extraction and quantification of ssDNA by qPCR. DNA extraction was performed as follows⁵¹. 1 to 2×10^8 cells were mechanically broken by vortexing with glass beads (425–600 μm , Sigma). Genomic DNA was extracted by classical phenol/chloroform extraction. 5 μg of DNA were digested (or not) with 100 units of the restriction enzyme *MseI*. 30 ng of digested and mock-digested DNA were amplified by qPCR using primers surrounding *MseI* restriction site (primers are listed in Supplementary table 2). ssDNA quantification was based on the work of Zierhut & Diffley⁵², using the formula:

$$100 / \left(\left(1 + [\text{Target}]^{\Delta\text{Ct}(\text{uncut}-\text{cut})} / [\text{Econtrol}]^{\Delta\text{Ct}(\text{uncut}-\text{cut})} \right) / 2 \right),$$

in which ΔCt is the difference between the threshold cycles of digested (cut) and undigested (uncut) DNA. E is amplification efficiency. A control locus (II-150) that does not contain *MseI* restriction sites was used as a DNA loading control.

Chromatin immunoprecipitation of Pku70-HA. Pku70-HA enrichment at *RTS1-RFB* was performed using strains expressing Pku70–3xHA. CHIP experiments were performed as follows⁵⁶. Samples were crosslinked with fresh 1% formaldehyde (Sigma, F-8775) for 15 min. Sonication was performed using a Diagenod Bioruptor at high setting for 8 cycles: 30 s ON + 30 s OFF. Immunoprecipitation was performed using anti-HA antibody coupled to magnetic beads (Thermo Scientific, Pierce 88837, 50 μl in 600 μl final volume). Cell lysis and immunoprecipitation steps were performed in presence of RNase inhibitors (10 units/sample of RNasin, Promega $\text{\textcircled{R}}$). Crosslink was reversed over night at 70 $^{\circ}\text{C}$. Samples were then incubated with Proteinase K and the DNA was purified using Qiagen PCR purification kit and eluted in 200 μl of water. The relative amount of DNA was quantified by qPCR (primers are listed in Supplementary Table 2). Pku70-HA enrichment was normalized to an internal control locus (*ade6*).

Chromatin immunoprecipitation of RPA (Ssb3-YFP) and Rad51. RPA enrichment at *RTS1-RFB* was performed using strains expressing a tagged RPA subunit, Ssb3-YFP. RPA and Rad51 ChIP experiments were performed as follows⁴⁷. Samples were crosslinked with 10 mM DMA (dimethyl adipimidate, Thermo Scientific, 20660) and 1% formaldehyde (Sigma, F-8775). Chromatin was sonicated with a Diagenod Bioruptor set on high for 10 cycles of 30 s ON + 30 s OFF. Immunoprecipitation was performed with an anti-GFP antibody against Ssb3-YFP (Molecular probe, A11122) or anti-Rad51 antibody (Thermo Scientific PA1–4968) at 1:300 and Protein G Dynabeads (Invitrogen, 10003D). The immunoprecipitated DNA was purified with a Qiaquick PCR purification kit (Qiagen, 28104) and eluted in 200 μl of water. The relative amount of DNA was determined by qPCR (iQ SYBR green supermix, Biorad, 1708882, primers listed in Table 2). RPA and Rad51 enrichment was normalized relative to an internal control locus (*ade6*).

Replication slippage assay with *ura4-sd20* allele. Replication slippage using the *ura4-sd20* allele was performed as follows⁴⁹. 5-FOA resistant colonies were grown on uracil-containing plates with or without thiamine for 2 days at 30 $^{\circ}\text{C}$, and then inoculated in uracil-containing EMM for 24 h. Cells were diluted and plated on YE plates (for survival counting) and on uracil-free plates containing thiamine to determine the reversion frequency. Colonies were counted after 5 to 7 days of incubation at 30 $^{\circ}\text{C}$. Statistics were performed using the non-parametric Mann-Whitney U test. Strains used in this study are liable to suppressor accumulation. To avoid taking into account events that do not represent the behavior of each mutant (such as suppressor or other additional spontaneous mutations), outliers were not included in the statistical analysis or graphical representation. Outliers were calculated according to the formula: superior outlier $> 1.5 \times (Q3 - Q1) + Q3$, and inferior outlier $< 1.5 \times (Q3 - Q1) - Q1$, where $Q1$ is the first quartile, and $Q3$ is the third quartile.

Cell viability. Cell viability assays were performed as follows¹⁷. Cells were grown on supplemented EMM without thiamine for 14 h, then they were appropriately diluted and plated on EMM plates with (RFB OFF) or without thiamine (RFB ON). Colonies were counted after 5–7 days incubation at 30 $^{\circ}\text{C}$ and viability was calculated as the ratio of colonies growing in ON condition relative to those growing in OFF condition.

Co-immunoprecipitation. 5.10^8 cells were harvested, washed in cold water and resuspended in 400 μl of EB buffer (50 mM HEPES High salt, 50 mM KOAc pH 7.5, 5 mM EGTA, 1% triton X-100, 1 mM PMSF, and protease inhibitors). Cell lysis was performed with a Precellys homogenizer. The lysate was treated with 250 mU/ μl of benzonase for 30 min. After centrifugation, the supernatant

was recovered and an aliquot of 50 μl was saved as the INPUT control. 2 μl of anti-GFP antibody (A11122 from Life Technologies, dilution 1:150) were added to 300 μl of protein extract and incubated for 1 h 30 min at 4 $^{\circ}\text{C}$ on a wheel. Then, 20 μl of Protein G Dynabeads (Invitrogen, 10003D), prewashed in PBS, were added and then incubated at 4 $^{\circ}\text{C}$ overnight. Beads were then washed twice 10 min in EB buffer before migration on acrylamide gel for analysis by Western blot. Pku70-HA, and Ssb3-YFP and Rad11-YFP were detected using anti-HA high-affinity antibody (Roche, 11867423001, 1:500) and using anti-GFP antibody (Roche, 11814460001, 1:1000), respectively. The Supplementary Fig. 5 shows that Pku70-HA was slightly interacting in an unspecific way with anti-GFP antibody. However, the intensity of Pku70-HA in the IP fraction was highly increased in cells expressing Ssb3-YFP or Rad11-YFP, showing that most interactions with Pku70-HA are specific.

Quantification and statistical analysis. Quantitative densitometric analysis of the Southern-blots (2DGE) was performed using ImageQuant software. The “tail signal” was normalized to the total signal of arrested forks. Cell images were collected using METAMORPH software and analyzed using ImageJ software. The definitions of values and errors bars are mentioned in the figures legend. For most experiments, the number of sample is $n > 3$ obtained from independent biological replicates. Sample size was chosen to demonstrate biological reproducibility and statistical significance if applicable. Statistical analysis was performed using the Mann-Whitney U tests and the Student t test. When no statistics are mentioned, errors bars correspond to the 99 or 95% confidence interval.

Data availability. The authors declare that all relevant data supporting the findings of this study are available within the article and its Supplementary Information files or from the corresponding author upon request. Raw data for images and blots have been deposited to Mendeley data and are available at <https://data.mendeley.com/datasets/7fpxmtzxp/1>

Received: 18 April 2017 Accepted: 8 November 2017

Published online: 07 December 2017

References

- Gu, W., Zhang, F. & Lupski, J. R. Mechanisms for human genomic rearrangements. *Pathogenetics* **1**, 4 (2008).
- Gorgoulis, V. G. et al. Activation of the DNA damage checkpoint and genomic instability in human precancerous lesions. *Nature* **434**, 907–913 (2005).
- Tubbs, A. & Nussenzweig, A. Endogenous DNA damage as a source of genomic instability in cancer. *Cell* **168**, 644–656 (2017).
- Lambert, S. & Carr, A. M. Impediments to replication fork movement: stabilisation, reactivation and genome instability. *Chromosoma* **122**, 33–45 (2013).
- Magdalou, I., Lopez, B. S., Pasero, P. & Lambert, S. A. The causes of replication stress and their consequences on genome stability and cell fate. *Semin. Cell. Dev. Biol.* **30**, 154–164 (2014).
- Hanada, K. et al. The structure-specific endonuclease Mus81 contributes to replication restart by generating double-strand DNA breaks. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **14**, 1096–1104 (2007).
- Hashimoto, Y., Puddu, F. & Costanzo, V. RAD51- and MRE11-dependent reassembly of uncoupled CMG helicase complex at collapsed replication forks. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **19**, 17–24 (2011).
- Carr, A. M. & Lambert, S. Replication stress-induced genome instability: the dark side of replication maintenance by homologous recombination. *J. Mol. Biol.* **425**, 4733–4744 (2013).
- Mayle, R. et al. DNA REPAIR. Mus81 and converging forks limit the mutagenicity of replication fork breakage. *Science* **349**, 742–747 (2015).
- Costantino, L. et al. Break-induced replication repair of damaged forks induces genomic duplications in human cells. *Science* **343**, 88–91 (2014).
- Moriel-Carretero, M. & Aguilera, A. A postincision-deficient TFIIF causes replication fork breakage and uncovers alternative Rad51- or Pol32-mediated restart mechanisms. *Mol. Cell* **37**, 690–701 (2010).
- Sotiriou, S. K. et al. Mammalian RAD52 functions in break-induced replication repair of collapsed DNA replication forks. *Mol. Cell* **64**, 1127–1134 (2016).
- Hashimoto, Y., Ray Chaudhuri, A., Lopes, M. & Costanzo, V. Rad51 protects nascent DNA from Mre11-dependent degradation and promotes continuous DNA synthesis. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **17**, 1305–1311 (2010).
- Zellweger, R. et al. Rad51-mediated replication fork reversal is a global response to genotoxic treatments in human cells. *J. Cell. Biol.* **208**, 563–579 (2015).
- Schlacher, K. et al. Double-strand break repair-independent role for BRCA2 in blocking stalled replication fork degradation by MRE11. *Cell* **145**, 529–542 (2011).
- Mizuno, K., Lambert, S., Baldacci, G., Murray, J. M. & Carr, A. M. Nearby inverted repeats fuse to generate acentric and dicentric palindromic

- chromosomes by a replication template exchange mechanism. *Genes Dev.* **23**, 2876–2886 (2009).
17. Lambert, S. et al. Homologous recombination restarts blocked replication forks at the expense of genome rearrangements by template exchange. *Mol. Cell.* **39**, 346–359 (2010).
 18. Betermier, M., Bertrand, P. & Lopez, B. S. Is non-homologous end-joining really an inherently error-prone process? *PLoS Genet.* **10**, e1004086 (2014).
 19. Mimitou, E. P. & Symington, L. S. Ku prevents Exo1 and Sgs1-dependent resection of DNA ends in the absence of a functional MRX complex or Sae2. *EMBO J.* **29**, 3358–3369 (2010).
 20. Shim, E. Y. et al. Saccharomyces cerevisiae Mre11/Rad50/Xrs2 and Ku proteins regulate association of Exo1 and Dna2 with DNA breaks. *EMBO J.* **29**, 3370–3380 (2010).
 21. Clerici, M., Mantiero, D., Guerini, I., Lucchini, G. & Longhese, M. P. The Yku70–Yku80 complex contributes to regulate double-strand break processing and checkpoint activation during the cell cycle. *EMBO Rep.* **9**, 810–818 (2008).
 22. Foster, S. S., Balestrini, A. & Petrini, J. H. Functional interplay of the Mre11 nuclease and Ku in the response to replication-associated DNA damage. *Mol. Cell Biol.* **31**, 4379–4389 (2011).
 23. Balestrini, A. et al. The Ku heterodimer and the metabolism of single-ended DNA double-strand breaks. *Cell Rep.* **3**, 2033–2045 (2013).
 24. Chanut, P., Britton, S., Coates, J., Jackson, S. P. & Calsou, P. Coordinated nuclease activities counteract Ku at single-ended DNA double-strand breaks. *Nat. Commun.* **7**, 12889 (2016).
 25. Miyoshi, T., Kanoh, J. & Ishikawa, F. Fission yeast Ku protein is required for recovery from DNA replication stress. *Genes Cells* **14**, 1091–1103 (2009).
 26. Sanchez, A. & Russell, P. Ku stabilizes replication forks in the absence of Brc1. *PLoS ONE* **10**, e0126598 (2015).
 27. Mimitou, E. P. & Symington, L. S. Sae2, Exo1 and Sgs1 collaborate in DNA double-strand break processing. *Nature* **455**, 770–774 (2008).
 28. Zhu, Z., Chung, W. H., Shim, E. Y., Lee, S. E. & Ira, G. Sgs1 helicase and two nucleases Dna2 and Exo1 resect DNA double-strand break ends. *Cell* **134**, 981–994 (2008).
 29. Cejka, P. DNA end resection: nucleases team up with the right partners to initiate homologous recombination. *J. Biol. Chem.* **290**, 22931–22938 (2015).
 30. Limbo, O. et al. Ctp1 is a cell-cycle-regulated protein that functions with Mre11 complex to control double-strand break repair by homologous recombination. *Mol. Cell.* **28**, 134–146 (2007).
 31. Clerici, M., Mantiero, D., Lucchini, G. & Longhese, M. P. The Saccharomyces cerevisiae Sae2 protein promotes resection and bridging of double strand break ends. *J. Biol. Chem.* **280**, 38631–38638 (2005).
 32. Llorente, B. & Symington, L. S. The Mre11 nuclease is not required for 5' to 3' resection at multiple HO-induced double-strand breaks. *Mol. Cell Biol.* **24**, 9682–9694 (2004).
 33. Garcia, V., Phelps, S. E., Gray, S. & Neale, M. J. Bidirectional resection of DNA double-strand breaks by Mre11 and Exo1. *Nature* **479**, 241–244 (2011).
 34. Nicolette, M. L. et al. Mre11–Rad50–Xrs2 and Sae2 promote 5' strand resection of DNA double-strand breaks. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **17**, 1478–1485 (2010).
 35. Cannavo, E. & Cejka, P. Sae2 promotes dsDNA endonuclease activity within Mre11–Rad50–Xrs2 to resect DNA breaks. *Nature* **514**, 122–125 (2014).
 36. Langerak, P., Mejia-Ramirez, E., Limbo, O. & Russell, P. Release of Ku and MRN from DNA ends by Mre11 nuclease activity and Ctp1 is required for homologous recombination repair of double-strand breaks. *PLoS Genet.* **7**, e1002271 (2011).
 37. Jensen, K. L. & Russell, P. Ctp1-dependent clipping and resection of DNA double-strand breaks by Mre11 endonuclease complex are not genetically separable. *Nucleic Acids Res.* **44**, 8241–8249 (2016).
 38. Hardy, J., Churikov, D., Geli, V. & Simon, M. N. Sgs1 and Sae2 promote telomere replication by limiting accumulation of ssDNA. *Nat. Commun.* **5**, 5004 (2014).
 39. Berti, M. & Vindigni, A. Replication stress: getting back on track. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **23**, 103–109 (2016).
 40. Puigvert, J. C., Sanjiv, K. & Helleday, T. Targeting DNA repair, DNA metabolism and replication stress as anti-cancer strategies. *FEBS J.* **283**, 232–245 (2016).
 41. Chaudhuri, A. R. et al. Replication fork stability confers chemoresistance in BRCA-deficient cells. *Nature* **535**, 382–387 (2016).
 42. Higgs, M. R. et al. BOD1L is required to suppress deleterious resection of stressed replication forks. *Mol. Cell.* **59**, 462–477 (2015).
 43. Colosio, A., Frattini, C., Pellicano, G., Villa-Hernandez, S. & Bermejo, R. Nucleolytic processing of aberrant replication intermediates by an Exo1–Dna2–Sae2 axis counteracts fork collapse-driven chromosome instability. *Nucleic Acids Res.* **44**, 10676–10690 (2016).
 44. Couch, F. B. et al. ATR phosphorylates SMARCAL1 to prevent replication fork collapse. *Genes Dev.* **27**, 1610–1623 (2013).
 45. Lambert, S., Watson, A., Sheedy, D. M., Martin, B. & Carr, A. M. Gross chromosomal rearrangements and elevated recombination at an inducible site-specific replication fork barrier. *Cell* **121**, 689–702 (2005).
 46. Mizuno, K., Miyabe, I., Schallbetter, S. A., Carr, A. M. & Murray, J. M. Recombination-restarted replication makes inverted chromosome fusions at inverted repeats. *Nature* **493**, 246–249 (2013).
 47. Tsang, E. et al. The extent of error-prone replication restart by homologous recombination is controlled by Exo1 and checkpoint proteins. *J. Cell. Sci.* **127**, 2983–2994 (2014).
 48. Nguyen, M. O., Jalan, M., Morrow, C. A., Osman, F. & Whitby, M. C. Recombination occurs within minutes of replication blockage by RTS1 producing restarted forks that are prone to collapse. *Elife* **4**, e04539 (2015).
 49. Iraqi, I. et al. Recovery of arrested replication forks by homologous recombination is error-prone. *PLoS Genet.* **8**, e1002976 (2012).
 50. Miyabe, I. et al. Polymerase delta replicates both strands after homologous recombination-dependent fork restart. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **22**, 932–938 (2015).
 51. Ait Saada, A. et al. Unprotected replication forks are converted into mitotic sister chromatid bridges. *Mol. Cell.* **66**, 398–410 e4 (2017).
 52. Zierhut, C. & Diffley, J. F. Break dosage, cell cycle stage and DNA replication influence DNA double strand break response. *EMBO J.* **27**, 1875–1885 (2008).
 53. Hartsuiker, E. et al. Ctp1CtIP and Rad32Mre11 nuclease activity are required for Rec12Spo11 removal, but Rec12Spo11 removal is dispensable for other MRN-dependent meiotic functions. *Mol. Cell Biol.* **29**, 1671–1681 (2009).
 54. Krogh, B. O., Llorente, B., Lam, A. & Symington, L. S. Mutations in Mre11 phosphoesterase motif I that impair Saccharomyces cerevisiae Mre11–Rad50–Xrs2 complex stability in addition to nuclease activity. *Genetics* **171**, 1561–1570 (2005).
 55. Moreau, S., Ferguson, J. R. & Symington, L. S. The nuclease activity of Mre11 is required for meiosis but not for mating type switching, end joining, or telomere maintenance. *Mol. Cell Biol.* **19**, 556–566 (1999).
 56. Chaudhuri, A. R. et al. Topoisomerase I poisoning results in PARP-mediated replication fork reversal. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **19**, 417–423 (2012).
 57. Vazquez, M. V., Rojas, V. & Tercero, J. A. Multiple pathways cooperate to facilitate DNA replication fork progression through alkylated DNA. *Dna Repair (Amst.)* **7**, 1693–1704 (2008).
 58. Luciano, P. et al. RPA facilitates telomerase activity at chromosome ends in budding and fission yeasts. *EMBO J.* **31**, 2034–2046 (2012).
 59. Yuan, Y. et al. Single-stranded DNA oligomers stimulate error-prone alternative repair of DNA double-strand breaks through hijacking Ku protein. *Nucleic Acids Res.* **43**, 10264–10276 (2015).
 60. Ribeyre, C. et al. Nascent DNA proteomics reveals a chromatin remodeler required for topoisomerase I loading at replication forks. *Cell Rep.* **15**, 300–309 (2016).
 61. Hartlerode, A. J., Morgan, M. J., Wu, Y., Buis, J. & Ferguson, D. O. Recruitment and activation of the ATM kinase in the absence of DNA-damage sensors. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **22**, 736–743 (2015).
 62. Seeber, A. et al. RPA mediates recruitment of MRX to forks and double-strand breaks to hold sister chromatids together. *Mol. Cell.* **64**, 951–966 (2016).
 63. Andres, S. N. et al. Tetrameric Ctp1 coordinates DNA binding and DNA bridging in DNA double-strand-break repair. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **22**, 158–166 (2015).
 64. Chen, H., Lisby, M. & Symington, L. S. RPA coordinates DNA end resection and prevents formation of DNA hairpins. *Mol. Cell.* **50**, 589–600 (2013).
 65. Ruff, P., Donnianni, R. A., Glancy, E., Oh, J. & Symington, L. S. RPA Stabilization of Single-Stranded DNA Is Critical for Break-Induced Replication. *Cell Rep.* **17**, 3359–3368 (2016).
 66. Deng, S. K., Gibb, B., de Almeida, M. J., Greene, E. C. & Symington, L. S. RPA antagonizes microhomology-mediated repair of DNA double-strand breaks. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **21**, 405–412 (2014).
 67. Moreno, S., Klar, A. & Nurse, P. Molecular genetic analysis of fission yeast Schizosaccharomyces pombe. *Methods Enzymol.* **194**, 795–823 (1991).
 68. Brewer, B. J., Lockshon, D. & Fangman, W. L. The arrest of replication forks in the rDNA of yeast occurs independently of transcription. *Cell* **71**, 267–276 (1992).

Acknowledgements

We thank Fuyuki Ishikawa for the gift of the Pku70-HA strain, Tony Carr for the *lig4-d* strain, and Paul Russell for the *mre11-H134S* strain. We thank Vincent Geli for critical comments of the manuscript. We also thank the PICT-IBISA@Orsay Imaging Facility of the Institut Curie. We thank Soraya Benazzouk and Yasmina Chekkal for their technical assistance. This study was supported by grants from the Institut Curie, the CNRS, the Fondation ARC, the Fondation Ligue (comité Essonne), l'Agence Nationale de la Recherche ANR-14-CE10-0010-01, the Institut National du Cancer INCA 2013-1-PLBIO-14, and the Fondation pour la Recherche Médicale "Equipe FRM DEQ20160334889". A.T.-S., A.A.S., and I.I. were funded by the Institut Curie

international PhD program, a French governmental fellowship and the Fondation pour la Recherche Medicale (ING20111223450), respectively. ATS was supported by a 4th year PhD fellowship from Fondation pour la Recherche Medicale (FDT20160435131). The funders had no role in study design, data collection and analysis, the decision to publish, or preparation of the manuscript.

Author contributions

A.T.-S., A.A.S., I.I., M.C.N., K.F., J.H., and S.A.E.L., performed the experiments. A.T.-S., A.A.S., I.I., and S.A.E.L. designed experiments and analyzed the data. A.T.-S. and S.A.E.L. wrote the paper.

Additional information

Supplementary Information accompanies this paper at <https://doi.org/10.1038/s41467-017-02144-5>.

Competing interests: The authors declare no competing financial interests.

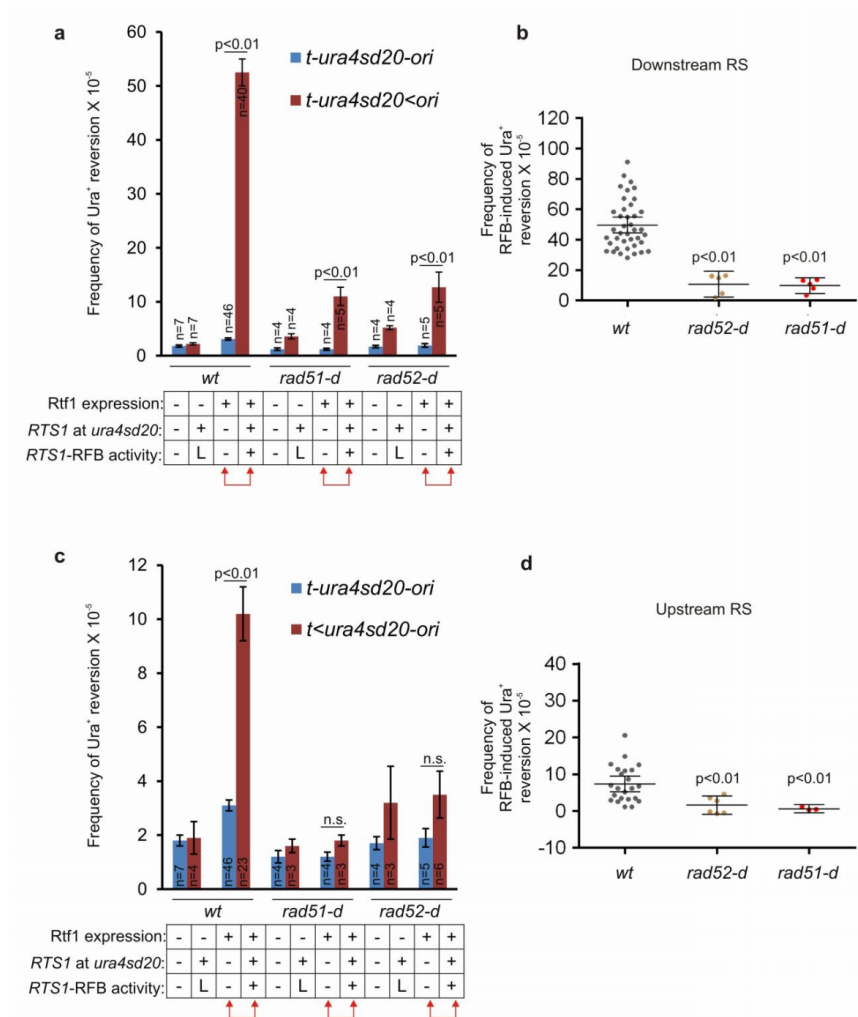
Reprints and permission information is available online at <http://npg.nature.com/reprintsandpermissions/>

Publisher's note: Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2017



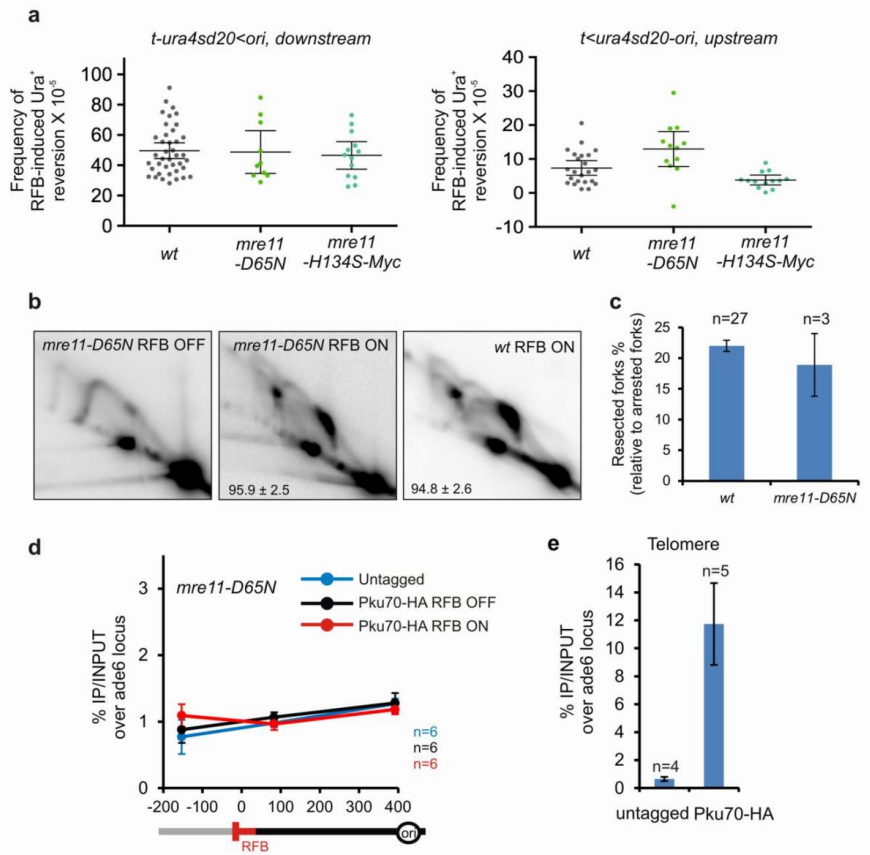
Supplementary Figure 1: A genetic assay to monitor HR-mediated replication restart and investigate fork-resection and the RTS1-RFB

(a) Frequency of Ura⁺ reversion in indicated strains, using the indicated constructs containing the *ura4-sd20* reporter gene (*t-ura4sd20-ori* in blue and *t-ura4sd20<ori* in red), in indicated conditions and as previously reported¹. The *ura4-sd20* allele contains a 20 nt duplication flanked by 5 bp of microhomology. When the *ura4-sd20* allele is replicated by a restarted fork, the non-processive DNA synthesis undergoes replication slippage (RS) resulting in the deletion of the duplication and the restoration of a functional *ura4⁺* gene (Ura⁺ reversion)². Values are means of *n* samples from independent biological replicates ± standard error of the mean (SEM). Statistics were calculated using the Mann and Whitney *U* test. The expression of Rtf1 (“-” for repressed and “+” for expressed), presence of the RTS1-RFB (“-” for absence and “+” for presence) and activity of the RTS1-RFB (“-” for its absence, “+” for active, and “L” for leaky) are indicated on the panel below the histogram. The frequency of downstream RS was increased by 23 fold upon expression of Rtf1 (*t-ura4sd20<ori*, compare Rtf1 repressed to expressed situation) and by 17 fold compared to the strain devoid of RFB

(*t-ura4sd20-ori*). In *rad51* or *rad52* deleted strains, the leakiness of Rft1 repression was more obvious as the RS frequency was slightly higher when Rft1 was repressed compared to the strain devoid of RFB (compare Rft1 expression: -, *RTS1*: -, RFB activity: - with Rft1 expression: -, *RTS1*: +, RFB: L). Thus, to obtain the true occurrence of Ura⁺ reversion by the *RTS1*-RFB, independently of the genetic background, we subtracted the RS frequency of the strain devoid of RFB from the frequency of the strain containing the *t-ura4sd20<ori* construct, upon expression of Rft1 (red arrows). The red arrows indicate the values used to obtain RFB-induced RS represented on the panel B.

(b) Frequency of RFB-Induced Ura⁺ reversion in indicated strains. The frequency of RS monitored with the *t-ura4sd20-ori* construct was subtracted to the frequency obtained with the *t-ura4sd<ori* construct upon expression of Rft1 to disregard genetic backgrounds effect and obtain the true induction of RS by the *RTS1*-RFB. Each dot represents one value obtained from the subtraction of each value obtained with the *t-ura4sd20<ori* construct to the mean of the values obtained with *t-ura4sd20-ori*. Bars indicate the mean value \pm 95 % confidence interval (CI). P-values were calculated using the Mann and Whitney *U* test.

(c) and (d) Same representation as (A) and (B), respectively, using the constructs containing the *ura4sd20* reporter gene (*t-ura4sd20-ori* in blue and *t<ura4sd20-ori* in red), in indicated conditions.



Supplementary Figure 2: The nuclease activity of Mre11 is dispensable to promote fork-resection and restart

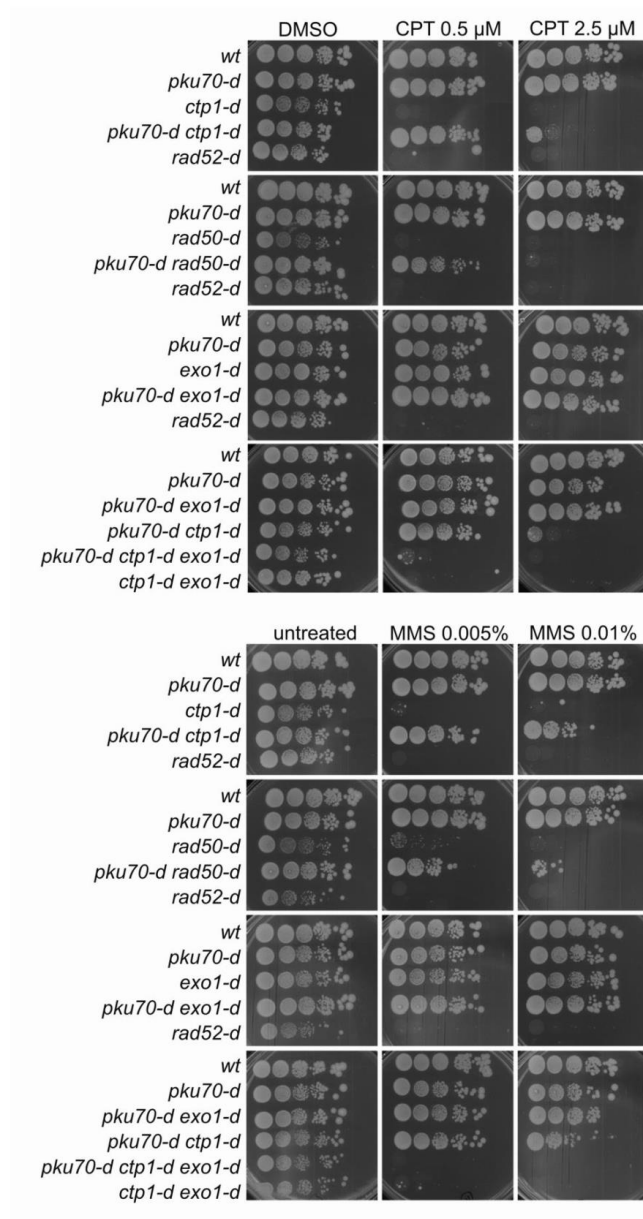
(a) Frequency of downstream RFB-induced Ura⁺ reversion (left panel, *t-ura4sd20<ori*) and upstream RFB-induced Ura⁺ reversion (right panel, *t<ura4sd20-ori*) in indicated strains. Each dot represents one sample from independent biological replicates. Bars indicate the mean value ± 95 % CI. Statistics were calculated using the non-parametric Mann and Whitney *U* test. No statistical differences were detected between *wt* and the two *mre11* nuclease dead alleles.

(b) Representative RI analysis by 2DGE in indicated strains upon activation (RFB ON) or not (RFB OFF) of the *RTS1*-RFB. Numbers indicate the % of forks blocked at the *RTS1*-RFB ± SD.

(c) Quantification of forks undergoing resection (“tail signal”), relative to the intensity of terminally-arrested forks. Values are means of *n* samples from independent biological replicates ± 95% CI.

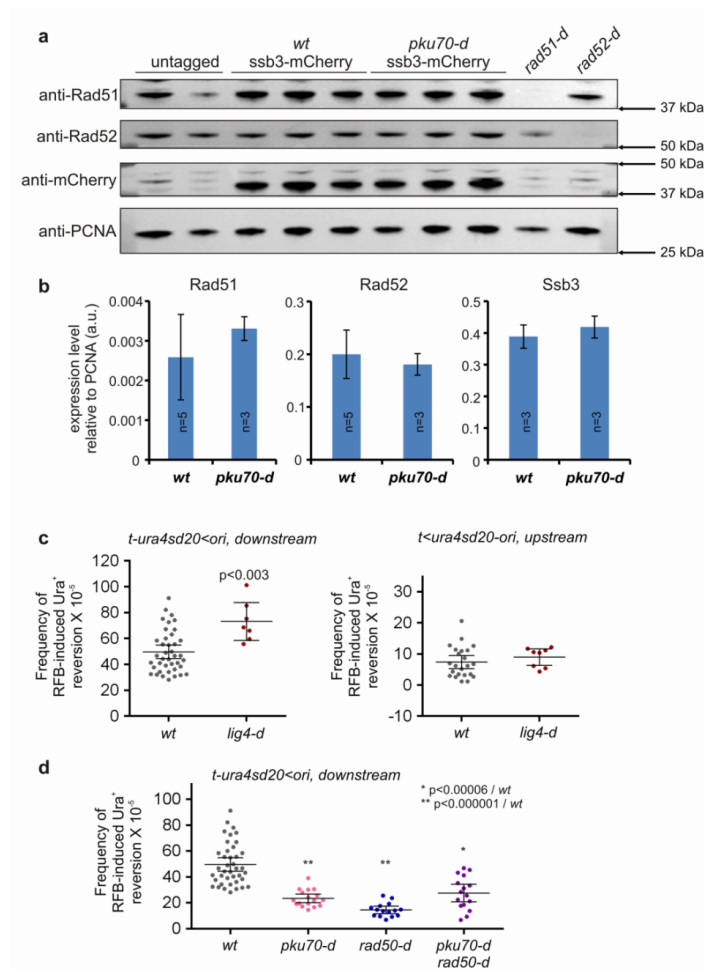
(d) Analysis of Ku recruitment to the *RTS1*-RFB by ChIP-qPCR in *mre11-D65N* strain. Upstream and downstream distances from the RFB are indicated in base pairs (bp). Values are means of *n* samples from independent biological replicates ± SEM.

(e) Analysis of Ku recruitment to telomeres in *mre11-D65N* strain. Values are means of *n* samples from independent biological replicates ± SD.



Supplementary Figure 3: The deletion of *pku70* partially rescues the sensitivity of *ctp1-d* and *rad50-d* cells to CPT and MMS, in an Exo1-dependent manner

Tenfold serial dilution of indicated strains on plates containing the indicated doses of CPT and MMS.



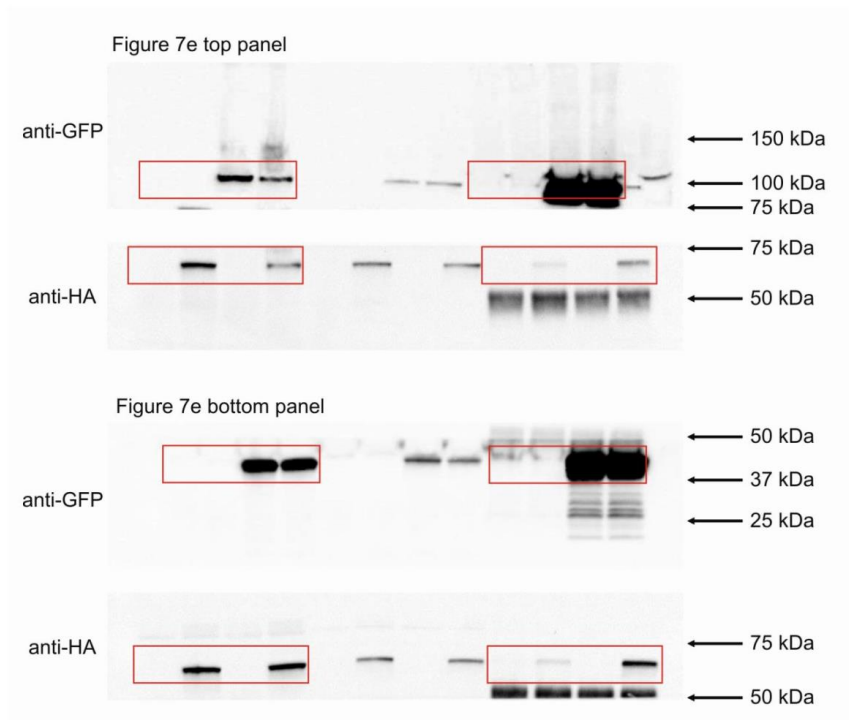
Supplementary Figure 4: The lack of Ku impairs the dynamics of HR-mediated fork restart, independently of NHEJ

(a) Expression of Rad51, Rad52 and Ssb3-mCherry in *wt* and *pku70-d* strains. Untagged, *rad51-d* and *rad52-d* strains were included as controls for antibodies specificity. PCNA was used as loading control.

(b) Quantification of protein expression relative to PCNA. Values indicate the mean (a.u.) of at least three independent experiments \pm SD.

(c) Frequency of downstream RFB-induced Ura⁺ reversion (left panel, *t-ura4sd20<ori*) and upstream RFB-induced Ura⁺ reversion (right panel, *t-ura4sd20-ori*) in indicated strains. Each dot represents one sample from independent biological replicates. Bars indicate the mean value \pm 95 % CI. Statistics were calculated using the non-parametric Mann and Whitney *U* test.

(d) Frequency of downstream RFB-induced Ura⁺ reversion in indicated strains. Each dot represents one sample from independent biological replicates. Bars indicate the mean value \pm 95 % CI. Statistics were calculated using the non-parametric Mann and Whitney *U* test.



Supplementary Figure 5: Uncropped blots from figure 7

Supplementary Table 1: Strains used in this study (related to all figures)

Strain	Genotype	Reference
SL350	<i>h-smt0 t-ura4<ori sup35:nmt41:rtf1+ ade6-704 leu1-32</i>	3
YC6	<i>h-smt0 t-ura4-SD20-ori sup35:nmt41:rtf1+ ade6-704 leu1-32</i>	2
YC21	<i>h-smt0 t>ura4-SD20-ori sup35:nmt41:rtf1+ ade6-704 leu1-32</i>	2
YC13	<i>h-smt0 t-ura4-SD20<ori sup35:nmt41:rtf1+ ade6-704 leu1-32</i>	2
YC76	<i>h-smt0 rad51::KAN t-ura4-SD20-ori sup35:nmt41:rtf1+ ade6-704 leu1-32</i>	2
YC82	<i>h+ rad51::KAN t>ura4-SD20-ori sup35:nmt41:rtf1+ ade6-704 leu1-32</i>	This study
YC80	<i>h-smt0 rad51::KAN t-ura4-SD20<ori sup35:nmt41:rtf1+ ade6-704 leu1-32</i>	2
YC86	<i>h+ rad52::NAT t-ura4-SD20-ori sup35:nmt41:rtf1+ ade6-704 leu1-32</i>	2
YC91	<i>h-smt0 rad52::NAT t>ura4-SD20-ori sup35:nmt41:rtf1+ ade6-704 leu1-32</i>	This study
YC90	<i>h-smt0 rad52::NAT t-ura4-SD20<ori sup35:nmt41:rtf1+ ade6-704 leu1-32</i>	2
II264	<i>h- exo1::NAT t-ura4-SD20-ori sup35:nmt41:rtf1+ ade6-704 leu1-32</i>	1
II324	<i>h- smt0 exo1::NAT t<ura4-SD20-ori sup35:nmt41:rtf1+ ade6-704 leu1-32</i>	1
II268	<i>h- exo1::NAT t-ura4-SD20<ori sup35:nmt41:rtf1+ ade6-704 leu1-32</i>	2
II383	<i>h- rqh1::KAN t-ura4-SD20-ori sup35:nmt41:rtf1+ ade6-704 leu1-32</i>	This study
II376	<i>h- rqh1::KAN t<ura4-SD20-ori sup35:nmt41:rtf1+ ade6-704 leu1-32</i>	This study
II381	<i>h- rqh1::KAN t-ura4-SD20<ori sup35:nmt41:rtf1+ ade6-704 leu1-32</i>	This study
II487	<i>h- rqh1::KAN exo1::NAT t-ura4-SD20-ori sup35:nmt41:rtf1+ ade6-704 leu1-32</i>	This study
II492	<i>h- rqh1::KAN exo1::NAT t<ura4-SD20-ori sup35:nmt41:rtf1+ ade6-704 leu1-32</i>	This study
II490	<i>h- rqh1::KAN exo1::NAT t<ura4-SD20-ori sup35:nmt41:rtf1+ ade6-704 leu1-32</i>	This study
II445	<i>h- smt0 ctp1::NAT t-ura4-SD20-ori sup35:nmt41:rtf1+ ade6-704 leu1-32</i>	This study
II440	<i>h- smt0 ctp1::NAT t>ura4-SD20-ori sup35:nmt41:rtf1+ ade6-704 leu1-32</i>	This study
II437	<i>h- smt0 ctp1::NAT t-ura4SD20<ori sup35:nmt41:rtf1+ ade6-704 leu1-32</i>	This study
II518	<i>h- ctp1::HYGRO t-ura4-SD20-ori sup35:nmt41:rtf1+ ade6-704 leu1-32</i>	This study
II527	<i>h+ ctp1::HYGRO t>ura4-SD20-ori sup35:nmt41:rtf1+ ade6-704 leu1-32 his*</i>	This study
II525	<i>h- ctp1::HYGRO t-ura4-SD20<ori sup35:nmt41:rtf1+ ade6-704 leu1-32 his*</i>	This study
YC65	<i>h smt0 rad50::KAN t-ura4-SD20-ori sup35:nmt41:rtf1+ ade6-704 leu1-32</i>	2
YC70	<i>rad50::KAN t>ura4-SD20-ori sup35:nmt41:rtf1+ ade6-704 leu1-32</i>	This study
YC67	<i>h smt0 rad50::KAN t-ura4-SD20<ori sup35:nmt41:rtf1+ ade6-704 leu1-32</i>	2
II541	<i>h- ctp1::HYGRO rad50::KAN t-ura4-SD20-ori sup35:nmt41:rtf1+ ade6-704 leu1-32</i>	This study
II547	<i>h- ctp1::HYGRO rad50::KAN t>ura4-SD20-ori sup35:nmt41:rtf1+ ade6-704 leu1-32</i>	This study
II544	<i>h- ctp1::HYGRO rad50::KAN t-ura4-SD20<ori sup35:nmt41:rtf1+ ade6-704 leu1-32</i>	This study
II483	<i>h+ ctp1::HYGRO exo1::NAT t-ura4-SD20-ori sup35:nmt41:rtf1+ ade6-704</i>	This study
II486	<i>h- ctp1::HYGRO exo1::NAT t>ura4-SD20-ori sup35:nmt41:rtf1+ ade6-704</i>	This study
II484	<i>h- ctp1::HYGRO exo1::NAT t-ura4-SD20<ori sup35:nmt41:rtf1+ ade6-704</i>	This study
II532	<i>h- rad50::KAN exo1::NAT t-ura4-SD20-ori sup35:nmt41:rtf1+ ade6-704 leu1-32</i>	This study
II535	<i>h- rad50::KAN exo1::NAT t-ura4-SD20<ori sup35:nmt41:rtf1+ ade6-704 leu1-32</i>	This study
II538	<i>h- rad50::KAN exo1::NAT t>ura4-SD20-ori sup35:nmt41:rtf1+ ade6-704 leu1-32</i>	This study
YC259	<i>h- mre11-D65N t-ura4-SD20-ori sup35:nmt41:rtf1+ ade6-704 leu1-32</i>	This study
YC264	<i>h- mre11-D65N t>ura4SD20-ori sup35:nmt41:rtf1+ ade6-704 leu1-32</i>	This study
YC262	<i>h- mre11-D65N t-ura4-SD20<ori sup35:nmt41:rtf1+ ade6-704 leu1-32</i>	This study
II594	<i>h+ pku70::leu2 t-ura4-SD20-ori sup35:nmt41:rtf1+ ade6-704 leu1-32</i>	This study
II603	<i>h- pku70::leu2 t>ura4-SD20-ori sup35:nmt41:rtf1+ ade6-704 leu1-32</i>	This study
II598	<i>h+ pku70::leu2 t-ura4-SD20<ori sup35:nmt41:rtf1+ ade6-704 leu1-32</i>	This study
AS18	<i>h+ pku70::leu2 ctp1::HYGRO t-ura4-SD20-ori sup35:nmt41:rtf1+ ade6-704 leu1-32</i>	This study
AS30	<i>h- pku70::leu2 ctp1::HYGRO t>ura4-SD20-ori sup35:nmt41:rtf1+ ade6-704 leu1-32</i>	This study
AS23	<i>h- pku70::leu2 ctp1::HYGRO t-ura4S-D20<ori sup35:nmt41:rtf1+ ade6-704 leu1-32</i>	This study
AS1	<i>h- pku70::leu2 rad50::KAN t-ura4-SD20-ori sup35:nmt41:rtf1+ ade6-704 leu1-32</i>	This study
AS6	<i>h- pku70::leu2 rad50::KAN t>ura4SD20-ori sup35:nmt41:rtf1+ ade6-704 leu1-32</i>	This study
AS12	<i>h+ pku70::leu2 rad50::KAN t-ura4-SD20<ori sup35:nmt41:rtf1+ ade6-704 leu1-32</i>	This study
AS52	<i>h- pku70::leu2 exo1 ::NAT t-ura4-SD20-ori sup35:nmt41:rtf1+ ade6-704 leu1-32</i>	This study
AS56	<i>h+ pku70::leu2 exo1 ::NAT t>ura4-SD20-ori sup35:nmt41:rtf1+ ade6-704 leu1-32</i>	This study
AS178	<i>h+ pku70::leu2 exo1 ::NAT t-13xter-ura4-SD20-ura5<ori sup35:nmt41:rtf1+ ura5::HYGRO ade6-704 leu1-32</i>	This study

AS63	<i>h+</i>	<i>pku70::leu2 exo1 ::NAT ctp1::HYGRO t-ura4-SD20-ori sup35:nmt41:rtf1⁺ ade6-704 leu1-32</i>	<i>This study</i>
AS67	<i>h-</i>	<i>pku70::leu2 exo1 ::NAT ctp1::HYGRO t>ura4sd20-ori sup35:nmt41:rtf1⁺ ade6-704 leu1-32</i>	<i>This study</i>
AS70	<i>h-</i>	<i>pku70::leu2 exo1 ::NAT ctp1::HYGRO t-ura4-SD20<ori sup35:nmt41:rtf1⁺ ade6-704 leu1-32</i>	<i>This study</i>
AS120	<i>h+</i>	<i>lig4::KAN t-ura4-SD20-ori sup35:nmt41:rtf1⁺ ade6-704 leu1-32</i>	<i>This study</i>
AS116	<i>h+</i>	<i>lig4::KAN t>ura4sd20-ori sup35:nmt41:rtf1⁺ ade6-704 leu1-32</i>	<i>This study</i>
AS111	<i>h+</i>	<i>lig4::KAN t-ura4-SD20<ori sup35:nmt41:rtf1⁺ ade6-704 leu1-32 his3-DL</i>	<i>This study</i>
YC266	<i>h-</i>	<i>t-13xter-ura4-SD20-ura5<ori sup35:nmt41:rtf1⁺ ura5::HYGRO ade6-704 leu1-32</i>	4
AS128	<i>h-</i>	<i>pku70::leu2 t-13xter-ura4-SD20-ura5<ori sup35:nmt41:rtf1⁺ ura5 ::HYGRO ade6-704 leu1-32</i>	<i>This study</i>
II606	<i>h-</i>	<i>ctp1::NAT t-13xter-ura4-SD20-ura5<ori sup35:nmt41:rtf1⁺ ura5::HYGRO ade6-704 leu1-32</i>	<i>This study</i>
AS182	<i>h+</i>	<i>pku70 :: leu1 ctp1::NAT t-13xter-ura4-SD20-ura5<ori sup35:nmt41:rtf1⁺ ura5::HYGRO ade6-704 leu1-32</i>	<i>This study</i>
II561	<i>h-</i>	<i>rad50::KAN t-13xter-ura4-SD20-ura5<ori sup35:nmt41:rtf1⁺ ura5::HYGRO ade6-704 leu1-32</i>	<i>This study</i>
AS254	<i>h+</i>	<i>pku70::leu2 rad50 ::KAN t-13xter-ura4-SD20-ura5<ori sup35:nmt41:rtf1⁺ ura5 ::HYGRO ade6-704 leu1-32</i>	<i>This study</i>
AS97	<i>h90</i>	<i>pku70-3HA:ura4⁺ t-ura4-SD20<ori sup35:nmt41:rtf1⁺ ade6-704 leu1-32</i>	<i>This study</i>
AS132	<i>h+</i>	<i>rad50::KAN pku70-3HA:ura4⁺ t-ura4-SD20<ori sup35:nmt41:rtf1⁺ ade6-704 leu1-32</i>	<i>This study</i>
AS134	<i>h+</i>	<i>ctp1::HYGRO pku70-3HA:ura4⁺ t-ura4-SD20<ori sup35:nmt41:rtf1⁺ ade6-704 leu1-32</i>	<i>This study</i>
AS359	<i>h-</i>	<i>mre11-D65N pku70-3HA:ura4⁺ t-ura4S-D20<ori sup35:nmt41:rtf1⁺ ade6-704 leu1-32</i>	<i>This study</i>
AS39	<i>h+</i>	<i>arg3::psv40-GFP-LacI** ssb3-mCherry:KAN lacO 7,9Kb:KAN t-ura4⁺<ori sup35:nmt41:rtf1⁺ ade6-704 leu1-32</i>	4
AS206	<i>h+</i>	<i>pku70::leu2 arg3::psv40-GFP-LacI** ssb3-mCherry:KAN lacO 7,9Kb:KAN t-ura4⁺<ori sup35:nmt41:rtf1⁺ ade6-704 leu1-32</i>	<i>This study</i>
AC147	<i>h+</i>	<i>ssb3-YFP:NAT t-ura4⁺<ori sup35:nmt41:rtf1⁺ ade6-704 leu1-32</i>	<i>This study</i>
SL1507	<i>h+</i>	<i>pku70-3HA:ura4⁺ ssb3-YFP:NAT t-ura4-SD20-ori sup35:nmt41:rtf1⁺ ade6-704 leu1-32</i>	<i>This study</i>
AC61	<i>h-smt0</i>	<i>rad11-YFP:NAT t-ura4⁺<ori sup35:nmt41:rtf1⁺ ade6-704 leu1-32</i>	<i>This study</i>
SL1498	<i>h+</i>	<i>pku70-3HA:ura4⁺ rad11-YFP:NAT t-ura4-SD20<ori sup35:nmt41:rtf1⁺ ade6-704 leu1-32</i>	<i>This study</i>
AS344	<i>h+</i>	<i>mre11-H134S-13*myc-KAN t-ura4-SD20-ori sup35:nmt41:rtf1⁺ ade6-704 leu1-32</i>	<i>This study</i>
AS345	<i>h-</i>	<i>mre11-H134S-13*myc-KAN t-ura4-SD20<ori sup35:nmt41:rtf1⁺ ade6-704 leu1-32</i>	<i>This study</i>
AS347	<i>h-</i>	<i>mre11-H134S-13*myc-KAN t<ura4-SD20-ori sup35:nmt41:rtf1⁺ ade6-704 leu1-32</i>	<i>This study</i>

Supplementary Table 2: List of primers used in this study (related to Fig. 1g, 2d, 4a, 5d and 7d)

Name	Distance (bp) from RTS1 / position	Sequence (5'-3')	Experiment
L3F	110	TTTAAATCAAATCTCCATGCG	ssDNA qPCR
L3R		TGTACCCATGAGCAAAGTGC	ssDNA qPCR
L400F	450	ATCTGACATGGCATTCTCA	ssDNA qPCR
L400R		GATGCCAGACCGTAATGACA	ssDNA qPCR
L1800F	1800	GGCAAAGTAGATCCGACAGC	ssDNA qPCR
L1800R		TGAATACGCCGTTACTCCTAAAG	ssDNA qPCR
L2200F	2200	AAGGCAAGAAACGCTGAGAC	ssDNA qPCR
L2200R		GGCATGCATACTACCCGATAA	ssDNA qPCR
II50F	Locus control (ChrII)	CACCGCAGTTCTAGTATCCT	ssDNA qPCR
II50R		CGATGTAACGGTATGCGGTA	ssDNA qPCR
L5F	-153	AGGGCATTAAAGGCTTATTTACAGA	ChIP Pku70-HA, Rad51 and Ssb3-YFP
L5R		TCACGTTTAATTTCAAACATCCA	ChIP Pku70-HA, Rad51 and Ssb3-YFP
L3F	110	TTTAAATCAAATCTCCATGCG	ChIP Pku70-HA, Rad51 and Ssb3-YFP
L3R		TGTACCCATGAGCAAAGTGC	ChIP Pku70-HA, Rad51 and Ssb3-YFP
L400F	450	ATCTGACATGGCATTCTCA	ChIP Pku70-HA, Rad51 and Ssb3-YFP
L400R		GATGCCAGACCGTAATGACA	ChIP Pku70-HA, Rad51 and Ssb3-YFP
Ade6-23	Chromosome III	GGCTGCCTCTACCATCATTC	ChIP Pku70-HA, Rad51 and Ssb3-YFP
Ade6-25		TTAAGCTGAGCTGCCAAGGT	ChIP Pku70-HA, Rad51 and Ssb3-YFP
TelF ⁵	Telomeres	CGGCTGACGGGTGGGGCCAATA	ChIP Pku70-HA
TelR ⁵		GTGTGGAATTGAGTATGGTGAA	ChIP Pku70-HA

Supplementary References

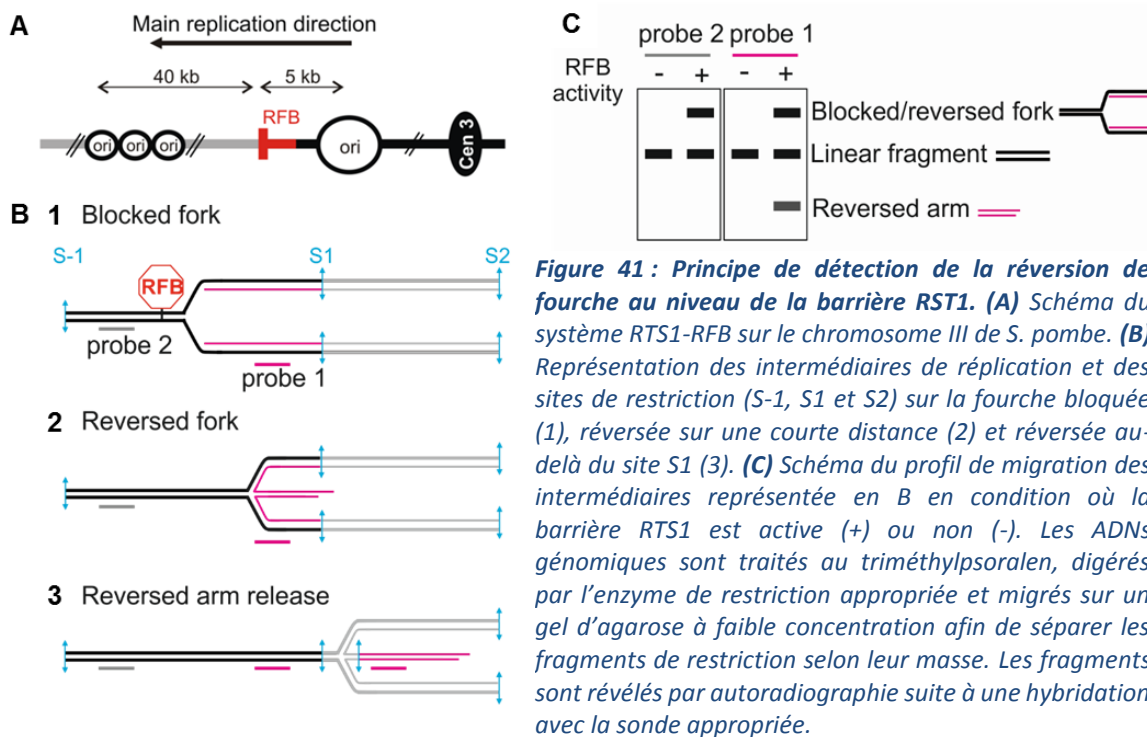
1. Tsang, E. *et al.* The extent of error-prone replication restart by homologous recombination is controlled by Exo1 and checkpoint proteins. *J. Cell Sci.* **127**, 2983–2994 (2014).
2. Iraqui, I. *et al.* Recovery of arrested replication forks by homologous recombination is error-prone. *PLoS Genet.* **8**, (2012).
3. Lambert, S., Watson, A., Sheedy, D. M., Martin, B. & Carr, A. M. Gross chromosomal rearrangements and elevated recombination at an inducible site-specific replication fork barrier. *Cell* **121**, 689–702 (2005).
4. Ait Saada, A. *et al.* Unprotected Replication Forks Are Converted into Mitotic Sister Chromatid Bridges. *Mol. Cell* **66**, 398–410.e4 (2017).
5. Tomita, K. *et al.* Competition between the Rad50 Complex and the Ku Heterodimer Reveals a Role for Exo1 in Processing Double-Strand Breaks but Not Telomeres. **23**, 5186–5197 (2003).

III. Exploration de la réversion de fourche dans le système *RTS1*-RFB

Le mécanisme moléculaire par lequel Rad51 et Rad52 agissent pour contrôler la dégradation des fourches dysfonctionnelles n'est pas connu. Nous avons formulé l'hypothèse que les facteurs de la RH remodelent la structure des fourches de réplication dysfonctionnelles en les convertissant en fourches réversées. Cette hypothèse est appuyée par le rôle inattendu de Ku dans la coordination de la résection en deux étapes, ce qui suggère qu'une structure correspondant à un substrat de Ku se forme au niveau du site de blocage *RTS1* (Ait Saada et al., 2017; Teixeira-Silva et al., 2017). La réversion de fourche fournirait une extrémité d'ADN double-brin sur laquelle Ku se fixerait.

1. Mise en évidence de la réversion des fourches bloquées au niveau de la barrière *RTS1*

Afin d'étudier la réversion de fourche au niveau de la barrière *RTS1*, j'ai essayé de mettre au point une technique qui permet de révéler spécifiquement la présence du bras réversé (Figure 41). La technique repose sur la libération du bras réversé par une restriction enzymatique. La réversion d'une fourche de réplication au-delà du site de restriction S1 (situé en amont de *RTS1*) recrée ce site au niveau du bras réversé et du bras parental (Figure 41B). La libération du bras réversé suite à la digestion par l'enzyme de restriction adéquate peut être détectée par *Southern blot* (Figure 41C).



Note sur la présentation des résultats : La détection du fragment linéaire correspondant au bras réversé nécessite un fort contraste. Cela suggère que la réversion de fourche survient à une faible fréquence et/ou que la structure formée est transitoire et dynamique. Dans les résultats que je présente ici, chaque autoradiographie est montrée avec un contraste permettant de distinguer les signaux correspondant aux blocages de fourches (BF, pour *Blocked Fork*) et au fragment linéaire (M, pour *Monomer*). La région comportant le signal du bras réversé est présentée en dessous avec le contraste adéquat. Aussi, j'ai utilisé différentes constructions avec le système *RTS1* et différentes enzymes de restriction pour faire varier la position du site S1. Par des soucis de simplicité, je n'indique que la position de ce site par rapport à la séquence *RTS1*. Dans la section Matériel et Méthodes, se trouvent les détails des enzymes et des constructions utilisées.

Afin d'éviter la dégradation du bras réversé, la réversion de fourche a été analysée dans un fond génétique (*rad50-d exo1-d*) où on estime que le redémarrage et la résection des fourches bloquées sont abolis (voir Figure 2 publication #2). Un signal correspondant à la taille attendue du bras réversé (1 Kb) est détecté suite à l'induction de la barrière *RTS1* dans le double mutant *rad50-d exo1-d* (Figure 42). Le bras réversé est détecté sous forme de bande distincte, suggérant que le bras réversé n'est effectivement pas dégradé.

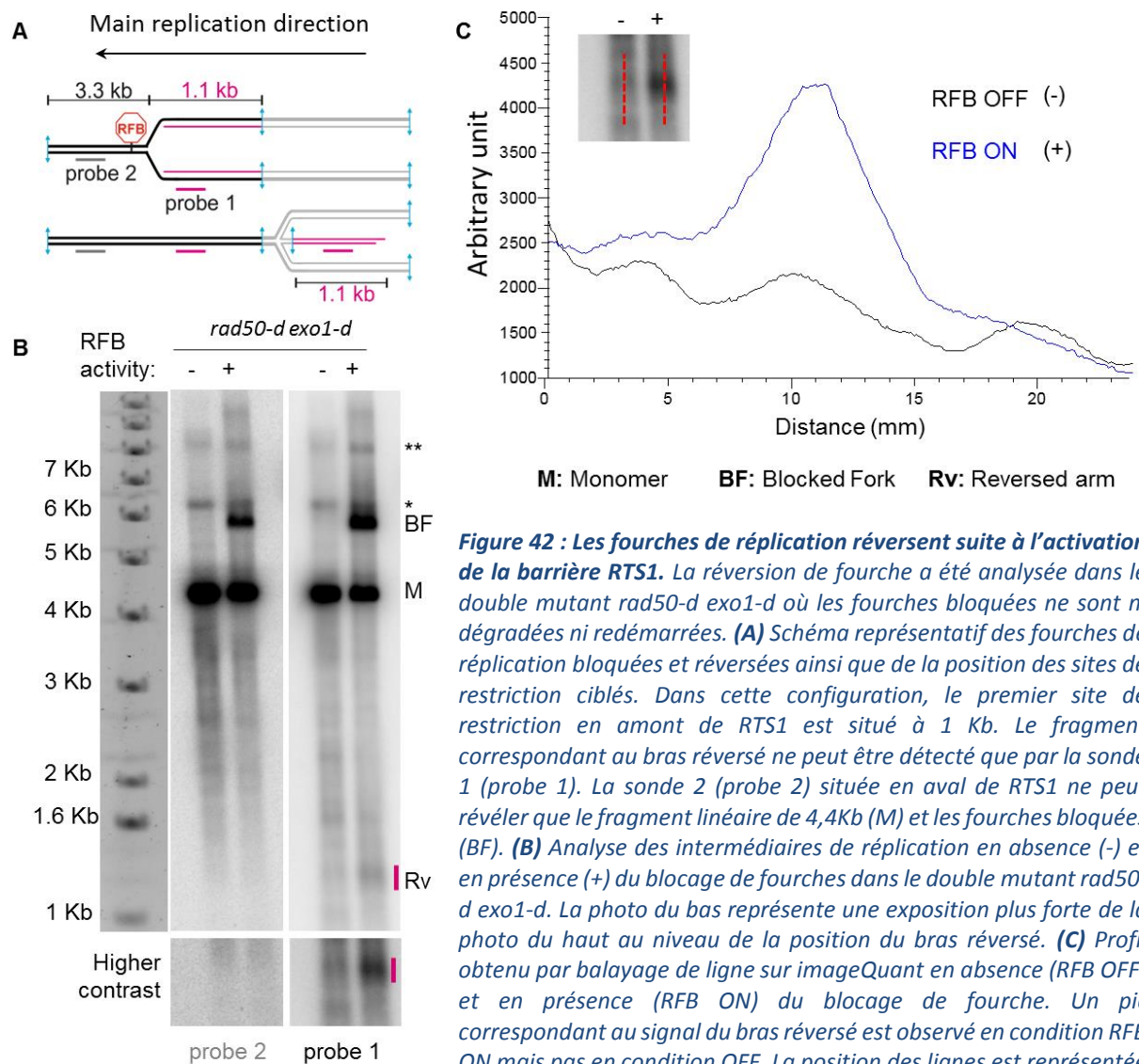
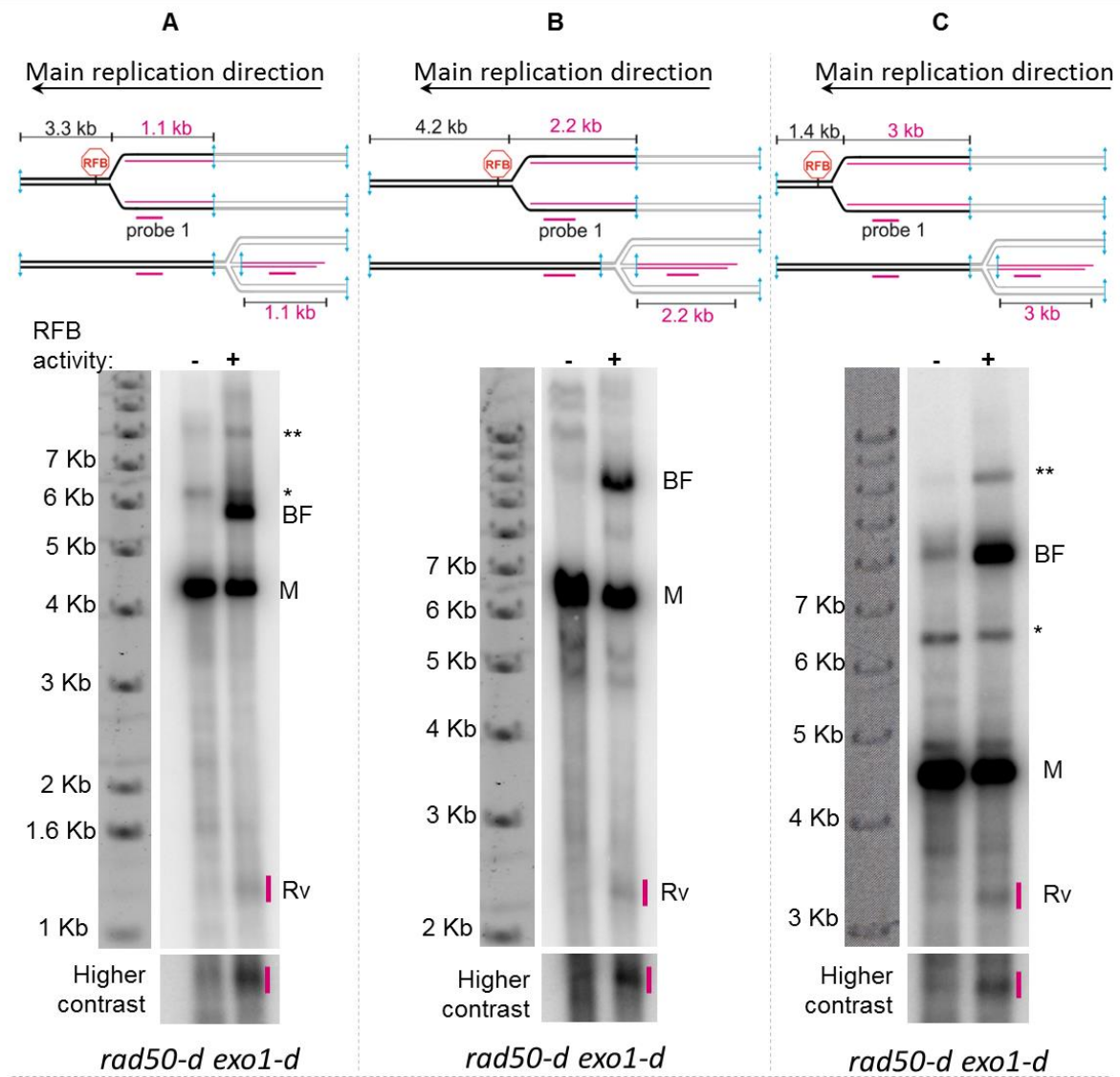


Figure 42 : Les fourches de réplication réversent suite à l'activation de la barrière *RTS1*. La réversion de fourche a été analysée dans le double mutant *rad50-d exo1-d* où les fourches bloquées ne sont ni dégradées ni redémarrées. **(A)** Schéma représentatif des fourches de réplication bloquées et réversées ainsi que de la position des sites de restriction ciblés. Dans cette configuration, le premier site de restriction en amont de *RTS1* est situé à 1 Kb. Le fragment correspondant au bras réversé ne peut être détecté que par la sonde 1 (probe 1). La sonde 2 (probe 2) située en aval de *RTS1* ne peut révéler que le fragment linéaire de 4,4Kb (M) et les fourches bloquées (BF). **(B)** Analyse des intermédiaires de réplication en absence (-) et en présence (+) du blocage de fourches dans le double mutant *rad50-d exo1-d*. La photo du bas représente une exposition plus forte de la photo du haut au niveau de la position du bras réversé. **(C)** Profil obtenu par balayage de ligne sur imageQuant en absence (RFB OFF) et en présence (RFB ON) du blocage de fourche. Un pic correspondant au signal du bras réversé est observé en condition RFB ON mais pas en condition OFF. La position des lignes est représentée en traits discontinus rouge sur l'autoradiographie prise comme exemple (la même que dans B).

Le signal détecté dans la condition où la barrière *RTS1* est activée correspond vraisemblablement au bras réversé car : (i) il est révélé uniquement par la sonde spécifique (*probe 1*) (Figure 42B) ; (ii) le balayage de ligne montre un pic à la position du bras réversé spécifique de l'activation de la barrière *RTS1* (RFB ON) (Figure 42C) ; et (iii) la taille du fragment révélé est corrélée à la position des sites de restriction par rapport au site de blocage de fourche (Figure 43). L'utilisation de sites de restriction plus en amont du site de blocage montre que la fourche de réplication bloquée peut réverser sur une distance pouvant aller jusqu'à plus de 3 Kb (Figure 43C). Rappelons que dans ce fond génétique le redémarrage de fourche par la RH n'est pas opérationnel. On pourrait imaginer que les fourches réversées ne sont pas figées dans le temps. Au contraire, elles pourraient connaître des mouvements de « va et viens » (ou réversion/restauration) jusqu'à ce que la fourche opposée arrive. Une fourche pourrait, a priori, réverser sur des distances assez grandes avant de pouvoir être rejointes par la fourche opposée. Cette hypothèse peut être testée en ciblant des sites de restriction situés au-delà de 3Kb en amont de *RTS1*. La réversion de fourche sur une distance de 4 Kb a été testée, mais malheureusement la qualité des intermédiaires de réplication après leur transfert n'est pas assez bonne pour conclure à une absence ou présence de signal. En termes d'intensité du signal, le bras réversé (Rv) semble moins intense que le signal correspondant au blocage de fourche (BF) (Figure 43). Il est à noter que le site de restriction le plus proche qui a été utilisé jusqu'à présent est situé 1 Kb en amont de *RTS1*. Ainsi, les fourches qui ont réversé sur une distance inférieure à 1 Kb ne sont pas détectées. De ce fait, une quantification de la fréquence de la réversion de fourche reste difficile à estimer.



M: Monomer **BF:** Blocked Fork **Rv:** Reversed arm
****** Partially digested fork-arrest ***** Partially digested monomer

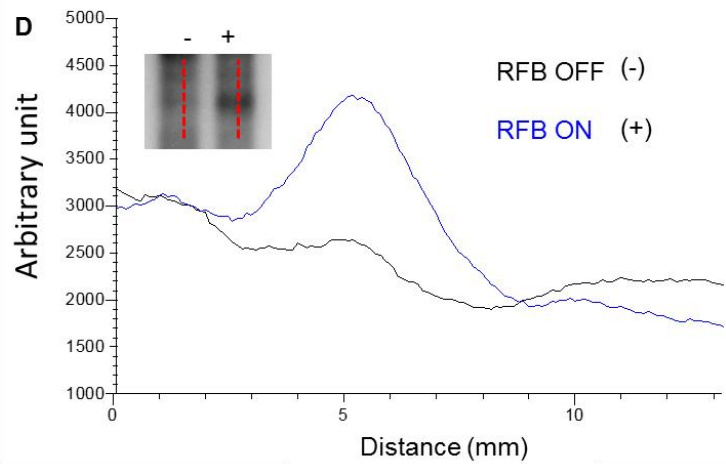


Figure 43 : Estimation de la distance sur laquelle les fourches de réplication réversent. Photos du haut : Trois différentes distances ont été ciblées. Le site de restriction est situé 1,1 Kb (A), 2,2 Kb (B) et 3 Kb (C) en amont de RTS1. Photos du bas : Autoradiographies représentative de l'analyse des Intermédiaire de réplication dans chaque condition. Un signal correspondant au bras réversé (Rv) à la taille attendue est observé lorsque la barrière RTS1 est active (+). Les fragments de restriction sont révélés par la sonde spécifique du bras réversé (probe 1). (D) Profil obtenu par balayage de ligne sur ImageQuant en absence (RFB OFF) et en présence (RFB ON) du blocage de fourche. Un pic correspondant au signal du bras réversé est observé en condition RFB ON uniquement. La position des lignes est représentée en traits discontinus rouge sur l'autoradiographie prise comme exemple (correspond au fragment à 3Kb en C).

La détection du bras réversé dans les cellules sauvages (*wt*) montre un signal plus diffus comparativement au double mutant *rad50-d exo1-d* (Figure 44B et C). Ce profil est indicatif d'une dégradation du bras réversé et renforce l'hypothèse que ce signal correspond à la réversion de fourche. Cela s'explique par le fait que dans les cellules *wt*, les fourches de réplication bloquées suite à l'induction de la barrière RTS1, sont dégradées en grande partie par Exo1 et Rad50 (sur une distance pouvant atteindre 1 Kb) (Ait Saada et al., 2017; Teixeira-Silva et al., 2017; Tsang et al., 2014).

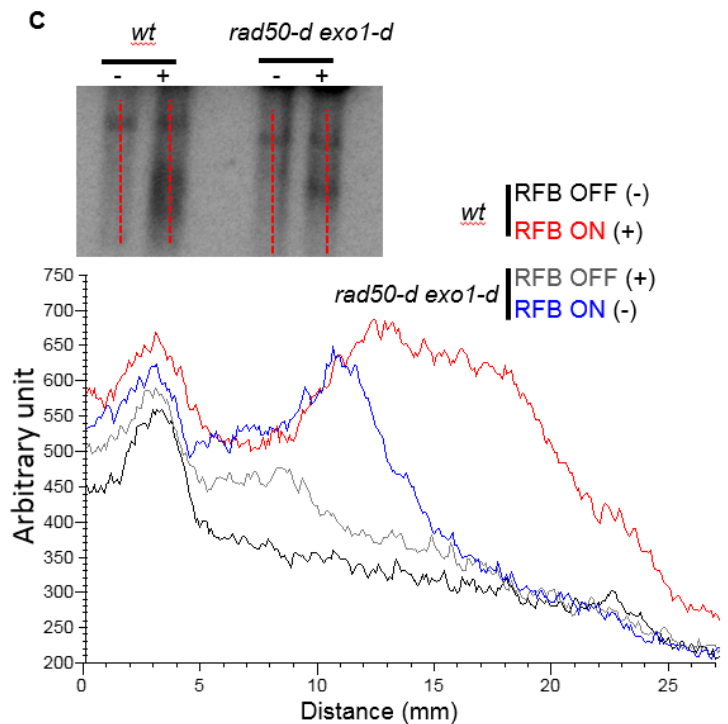
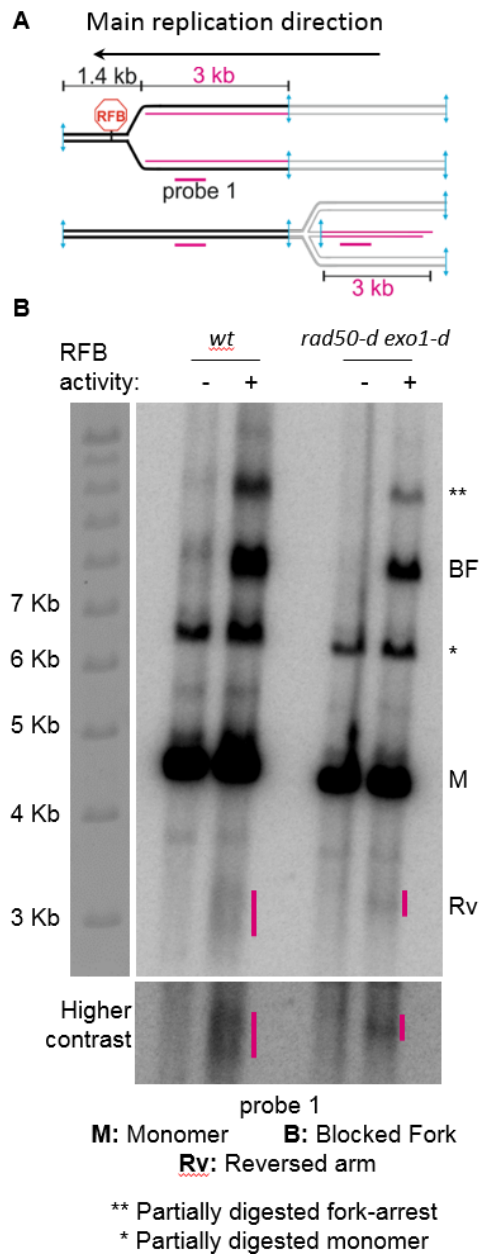


Figure 44 : Profil du bras réversé en fonction de la résection ou non des fourches de réplication bloquées. (A) Représentation de la construction utilisée dans B. Le premier site de restriction est situé à 3 Kb en amont de RTS1. **(B)** Autoradiographie représentative de l'analyse des intermédiaires de réplication dans les cellules wt et le double mutant rad50-d exo1-d. Un plus fort contraste de la région contenant le signal correspondant le bras réversé est présenté. Lorsque la barrière RTS1 est active (+) dans les cellules wt, le bras réversé est détecté sous forme de « smear », ce qui est indicatif d'une dégradation. Dans les cellules du double mutant rad50-d exo1-d montre une bande distincte est observée. **(C)** Profils obtenus par balayage de ligne (sur ImageQuant) au niveau de la position attendue du bras réversé en absence (RFB OFF) et en présence (RFB ON) du blocage de fourche (RFB ON). La position des lignes est représentée sur l'autoradiographie au-dessus du graphe (même exemple que dans B). Ici, pour pouvoir comparer les différentes conditions, le balayage commence à partir d'une bande aspécifique retrouvée dans les quatre conditions. Les profils obtenus montrent un pic correspondant à cette bande aspécifique quelle que soit la condition. Ces pics sont du même ordre de grandeur. A la position du bras réversé, un pic est observé que dans la condition RFB ON, indiquant la spécificité de ce signal. Ce pic est précis dans rad50-d exo1-d et s'étend dans les cellules wt.

Dans un deuxième temps j'ai tenté de détecter la réversion de fourche par une autre technique. Pour cela, j'ai essayé de définir les conditions dans lesquelles il est possible de révéler des structures dont le profil de migration correspond à la fourche réversée par la technique des gels d'ADN bidimensionnels ou 2DGE (pour *bidimensional gel electrophoresis*). Les intermédiaires de réplication contenus dans les fragments de restriction sont d'abord séparés selon leur masse durant la première dimension puis selon leur structure durant leur migration durant la seconde dimension (le principe de la technique est détaillé dans la section Matériel et Méthodes). Une fourche de réplication bloquée au niveau du site *RTS1* et une fourche réversée et non dégradée, générée suite au blocage, possèdent la même masse moléculaire (Figure 41B). De ce fait, les deux structures de fourche, bloquée et réversée, ne devraient pas être séparées suite à leur migration durant la première dimension (Figure 41C). Par contre, au cours de la seconde dimension, la migration de la fourche réversée doit être retardée à cause de sa structure plus branchée (Vengrova and Dalgaard, 2004). Cela se traduit par l'apparition d'un signal de cône ou « *X-shaped structure* » (intermédiaire de réplication plus structuré qu'une fourche en Y) (Figure 45A).

J'ai utilisé la condition dans laquelle le site de restriction ciblé est positionné 3 Kb en amont du site de blocage de fourche. L'analyse des Intermédiaires de réplication par 2DGE dans le double mutant *rad50-d exo1-d* montre la présence d'un signal de cône émanant du site de blocage de fourche lorsque la barrière *RTS1* est active (Figure 45B). Ce signal est absent dans les cellules sauvages (Figure 45B). Cela peut s'expliquer par le fait que les fourches de réplication bloquées sont soumises à une résection par des nucléases (Ait Saada et al., 2017; Teixeira-Silva et al., 2017; Tsang et al., 2014). De ce fait, une fourche réversée dégradée perd une partie de sa structure branchée et ne montre plus de retard de migration sur le gel. Ces résultats indiquent que l'intermédiaire généré suite à la réversion de fourche peut être visualisé lorsque la résection est abolie ou fortement diminuée.

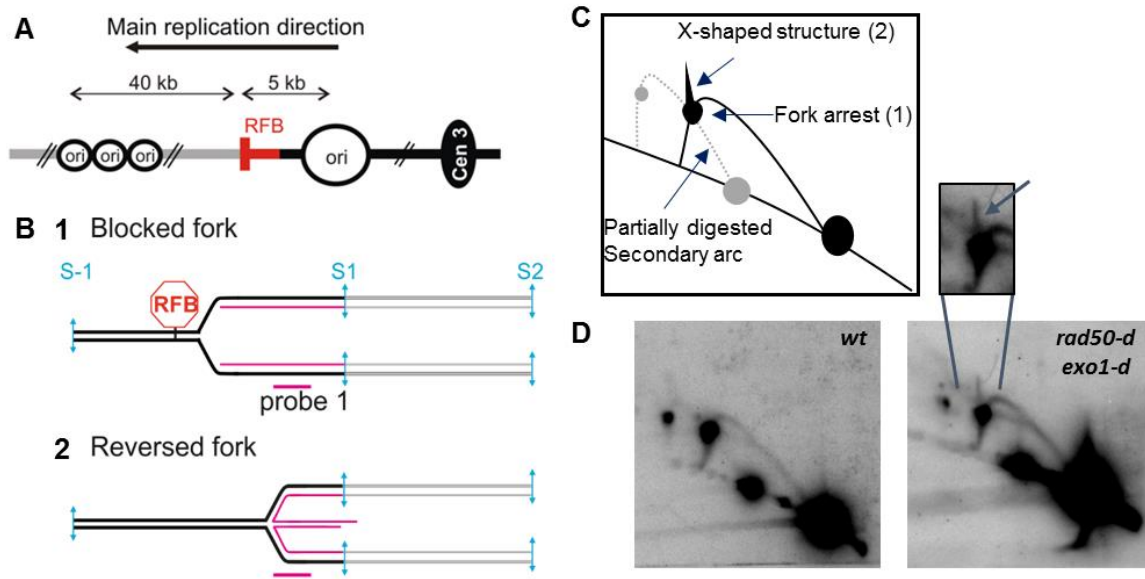
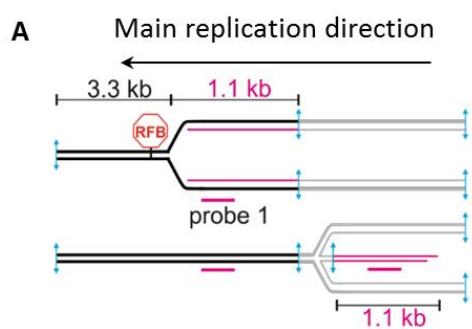


Figure 45 : Analyse de la réversion de fourche par gels d'ADN bidimensionnels. (A) Schéma du système RTS1-RFB sur le chromosome III de *S. pombe*. (B) Représentation de la fourche bloquée (1) et réversée (2). Suite à la restriction enzymatique au niveau du site S1, les fourches bloquée et réversée ont la même masse moléculaire (C) Interprétation des signaux obtenus suite à l'analyse des Intermédiaires de réplication par 2DGE. Le signal de cône (X-shaped structure) correspond à un intermédiaire de réplication plus structuré (B2) qu'une fourche de réplication bloquée. (D) Analyse des Intermédiaires de réplication dans les cellules wt et le double mutant *rad50-d exo1-d* révélés par la sonde 1 (probe 1). Le rectangle noir représente un agrandissement et un plus fort contraste du signal correspondant au blocage de fourche et au signal de cône (flèche bleue) dans les cellules *rad50-d exo1-d*.

Les deux techniques ainsi mises au point pour explorer la réversion de fourche montrent que : (i) les fourches de réplication bloquées au niveau de la barrière *RTS1* réversent (jusqu'à au moins 3 Kb) ; et (ii) l'analyse des fourches réversées est grandement facilitée en absence de résection. Ainsi, la dépendance génétique de la réversion peut être adressée dans un fond génétique où la résection est absente.

2. La réversion des fourches bloquées dans le système *RTS1*-RFB est dépendante de Rad52

L'absence de Exo1 dans le mutant *rad52-d* est suffisante pour supprimer complètement la résection des fourches au niveau de la barrière *RTS1* activée (Ait Saada et al., 2017). L'implication de Rad52 dans la réversion de fourche dans ce système a donc été analysée en absence de Exo1 (*rad52-d exo1-d*). Les résultats montrent que le signal correspondant au bras réversé est absent dans le double mutant *rad52-d exo1-d* (Figure 46). Cela suggère que la



réversion de fourche est dépendante de Rad52 au niveau de la barrière *RTS1* activée. Bien que ces résultats nécessitent d'être confirmés, ils soutiennent que la protection des fourches de réplication par Rad52 (et probablement Rad51) s'opère *via* la promotion de la réversion des fourches dysfonctionnelles.

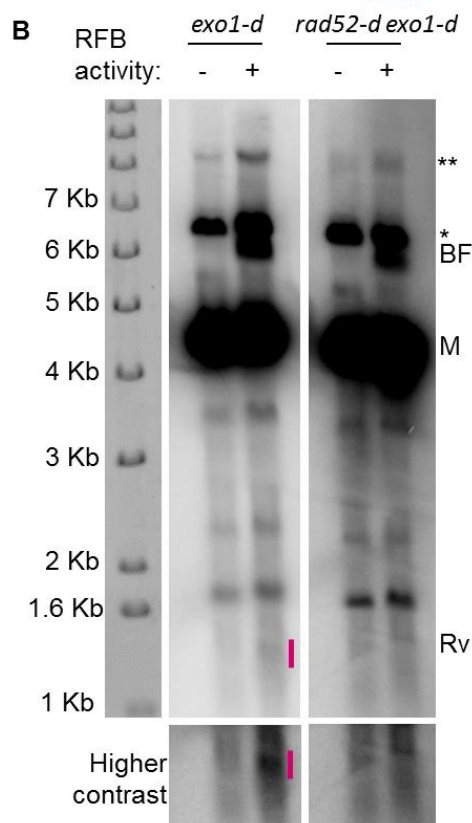


Figure 46 : La réversion de fourche au niveau de la barrière *RTS1* est dépendante de Rad52. (A) Schéma représentant la construction utilisée et la taille attendue du bras réversé (3 Kb). (B) La réversion de fourche a été adressée dans un fond génétique où Exo1 est absente. Il est à noter que le signal correspondant au fragment linéaire (M, pour Monomer) est très intense comparativement à ce qui a été obtenu avec les autres expériences. Cela est dû au fait que les Intermédiaires de réplication ont été purifiés avec des colonnes Qiagen (versus colonnes BND pour les autres expériences) (voir Matériel et méthodes).

M: monomer **BF:** Blocked fork
Rv: Reversed arm

** Partially digested fork-arrest
 * Partially digested monomer

V. Rôle du remodeleur de la chromatine Fft3 au niveau des fourches de réplication dysfonctionnelles

Dans les deux sections précédentes, nous avons pu voir l'importance de la régulation de l'étape de résection au niveau des fourches de réplication dysfonctionnelles. La résection est plutôt régulée négativement par les facteurs de protection Rad51/Rad52 et le facteur du NHEJ Ku. La résection des fourches de réplication s'opérant dans un contexte chromatinien, il est possible que cette étape bénéficie d'une régulation par les remodeleurs de la chromatine.

Au niveau des CDBs, la résection est régulée au niveau de la chromatine par des remodeleurs de la chromatine/des nucléosomes. Parmi ces remodeleurs, Fun30 chez *S. cerevisiae* régule positivement la résection en stimulant la résection extensive des CDBs par Exo1 notamment (Chen et al., 2012; Costelloe et al., 2012; Eapen et al., 2012).

Dans le cadre d'une collaboration avec le laboratoire de Karl Ekwall, nous avons exploré le rôle des homologues de Fun30 chez *S. cerevisiae* dans la réparation des dommages à l'ADN chez *S. pombe*. Les homologues de Fun30 sont au nombre de trois paralogues Fft1, Fft2 et Fft3 (pour *Fission yeast Fun30*). Il a été montré par le laboratoire de Karl Ekwall, que le mutant *fft3-d*, contrairement à *fft1-d* et *fft2-d*, montre une sensibilité au MMS et présente un défaut de résection extensive des CDBs (résultats non présentés). Au laboratoire, je me suis particulièrement intéressée à l'implication de Fft3 dans la résection et le redémarrage des fourches de réplication par la RH.

1. Fft3 est impliquée dans la résection des fourches de réplication dysfonctionnelles

Le rôle de Fft3 dans la résection des fourches bloquées a été adressé *via* l'utilisation du système *RTS1*-RFB. La résection des fourches de réplication peut être étudiée par l'analyse des intermédiaires de réplication par 2DGE (Ait Saada et al., 2017). Les intermédiaires de réplication correspondant à la fourche subissant une dégradation médiée par Exo1, se

traduisent par la présence d'un signal émanant du blocage de fourche et descendant vers l'arc linéaire (Figure 47A). Les résultats montrent que la résection des fourches est affectée en absence de Fft3 mais pas en absence de Fft2 (Figure 47B). La quantification du signal correspondant à la fourche dégradée montre que l'intensité de ce signal est diminuée de moitié dans le mutant *fft3-d* comparativement aux cellules *wt* (Figure 47C). L'implication de l'activité ATPase de Fft3 dans la résection des fourches a été testée. La forme mutée Fft3-K418R (au niveau du domaine ATPase) a été décrite comme une forme catalytiquement inactive de Fft3 (Steglich et al., 2015). Les résultats montrent que Fft3-K418R mime l'absence de Fft3 en ce qui concerne la diminution du niveau de résection des fourches de réplication dysfonctionnelles (Figure 47B et C). L'effet de Fft3-K418R sur la résection est indépendant de l'étiquette Myc étant donné que la fusion de cette étiquette à Fft3 n'impacte pas le niveau de résection (Figure 47B et C). Ces résultats suggèrent que Fft3 participe, *via* son activité ATPase, à la formation de l'ADNsb au niveau des fourches bloquées en promouvant la résection des fourches de réplication par Exo1.

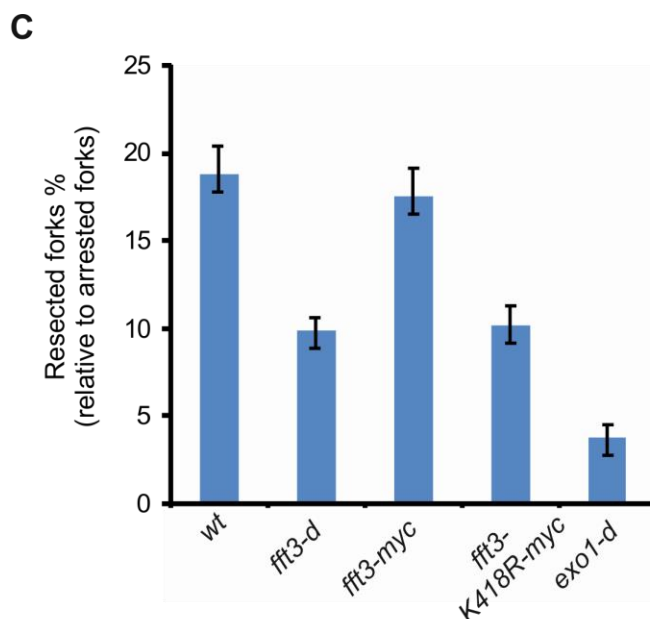
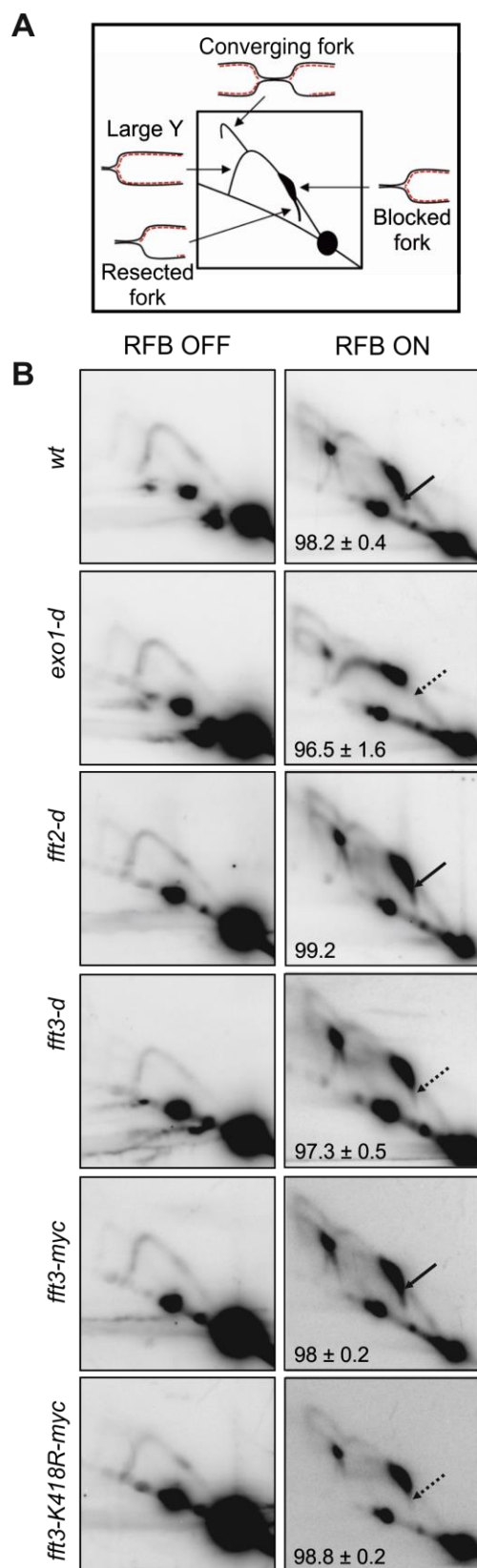


Figure 47 : Fft3 promeut la résection des fourches dysfonctionnelles via son activité ATPase. (A) Schématisation du profil obtenu suite à l'analyse des intermédiaires de réplication par 2DGE et interprétation des signaux générés suite à l'activation de la barrière RTS1 (RFB ON) et en absence du blocage. Les fragments de restriction sont générés par AseI. **(B)** Autoradiographies représentatives de l'analyse des IRs par 2DGE en condition de blocage de fourche dans les souches indiquées. Les signaux sont révélés par une sonde *ura4*. L'efficacité du blocage de fourche est représentée pour chaque souche. Les valeurs correspondent à la moyenne d'au moins trois expériences \pm l'écart type. Les flèches noires (trait plein) indiquent les fourches en cours de résection, les flèches en pointillés indiquent une absence ou un défaut de résection. **(C)** Quantification de la résection des fourches bloquées dans les souches indiquées. Le pourcentage de fourches en cours de résection est calculé par rapport au nombre total des fourches bloquées. Les valeurs correspondent à la moyenne d'au moins trois expériences \pm l'intervalle de confiance à 99%.

2. Recrutement de Fft3 au niveau de la barrière RTS1

L'influence de Fft3 sur la résection peut s'opérer par sa capacité à remodeler les nucléosomes, auquel cas Fft3 devrait être recrutée à la barrière RTS1. Pour tester cette hypothèse, une immuno-précipitation de Fft3 associée à la chromatine a été effectuée. Des régions spécifiques au locus où est insérée la séquence RTS1 ont été amplifiées par qPCR avec des couples d'amorces : P1 à 100pb en aval de RTS1, P2 à 110pb et P3 à 450pb tous deux en amont de RTS1 (Figure 48A). Une construction dépourvue de la séquence RTS1 (*t-ura4-ori*) a été utilisée pour s'affranchir d'un éventuel effet dû à la séquence RTS1. La région *tRNA_{VAL}* est utilisée comme contrôle positif de l'immuno-précipitation de Fft3-myc et Fft3-K418R-myc (Steglich et al., 2015). Les résultats montrent que Fft3-myc est recrutée au niveau des régions ciblées indépendamment de l'expression de Rtf1 (*i.e.* indépendamment de l'activité de la barrière RTS1) mais aussi indépendamment de la présence de la séquence RTS1 (Figure 48B). Fft3 est connue pour sa fixation au niveau de gènes codant des *tRNA*, des *snRNA*. Il se trouve que le locus *ura4* chez *S. pombe* contient un certain nombre de *snRNA* qui pourrait expliquer ce recrutement. De manière surprenante, le mutant ATPase semble être recruté spécifiquement lorsque la barrière est active (*i.e.* condition où Rtf1 exprimée dans *t-ura4sd20<ori*) (Figure 48B). Ce recrutement semble être plus prononcé en amont du site de blocage (P2 et P3), régions où les brins naissants sont dégradés dans un contexte *wt* lorsque la barrière est active (Figure 3B et C publication #1). Toutefois, le recrutement de Fft3-K418R au locus contrôle *tRNA_{VAL}* est très hétérogène en présence ou en absence de Rtf1. Ces résultats sont préliminaires et nécessitent un approfondissement.

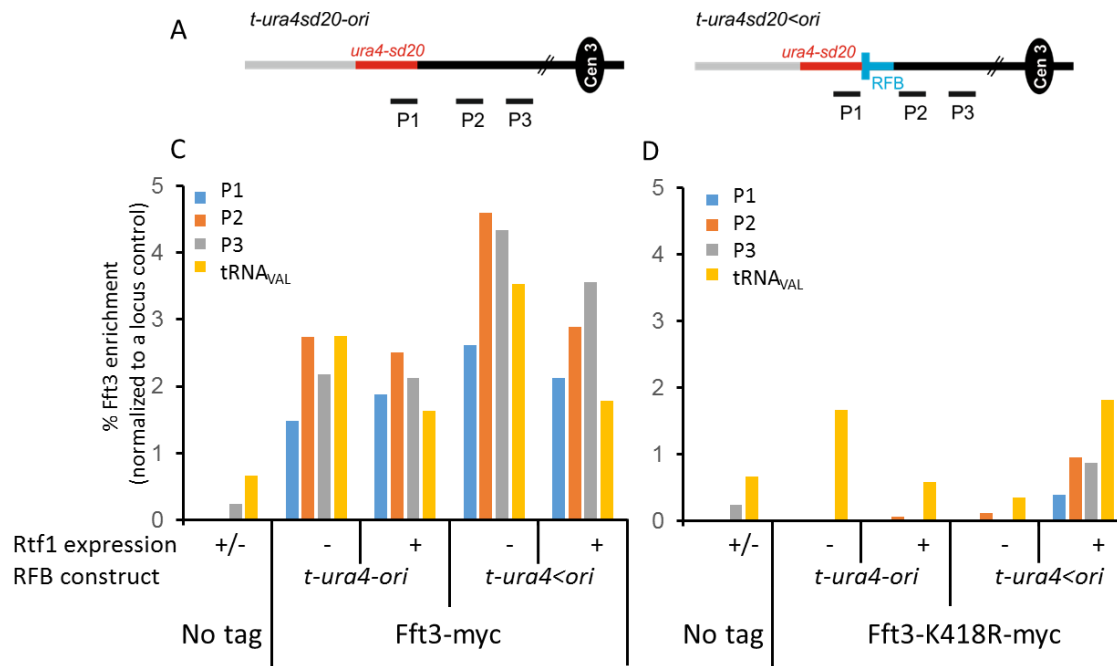


Figure 48 : Immuno-précipitation de Fft3 à la chromatine. (A) Représentation des constructions *t-ura4sd20-ori* (sans *RTS1*) et *t-ura4sd20<ori* (« < » pour *RTS1*). La position des régions amplifiées par qPCR est indiquée par P1, P2, et P3. **(B)** Analyse du recrutement de Fft3 en absence (-) et en présence (+) de Rtf1 dans les souches indiquées. Le pourcentage d'enrichissement de Fft3 est normalisé par rapport à un locus control (control négatif). Les valeurs représentent la moyenne de 2 à 3 expériences indépendantes.

3. Fft3 joue un rôle dans le redémarrage des fourches de réplication bloquées

J'ai testé l'effet de la délétion de *fft3* sur l'efficacité de redémarrage des fourches de réplication par la RH au niveau de la barrière *RTS1*. Le principe de la technique utilisée est décrit en détail dans [Teixeira-Silva et al., 2017](#) (Figure 49). Le redémarrage des fourches dysfonctionnelles par la RH est associé à une synthèse d'ADN fautive sujette à des glissements de la polymérase passible de glissement de la réplication (RS pour *Replication Slippage*). Ces événements de RS sont à l'origine de la réversion du gène rapporteur *ura4sd20* vers un gène *ura4⁺* fonctionnel. Le calcul de la fréquence des RS, en réponse au blocage de fourche, permet donc d'apprécier l'efficacité du redémarrage par la RH. L'allèle *ura4sd20* peut être placé en amont (*t-ura4sd20-ori*) ou en aval (*t-ura4SD20<ori*) de *RTS1* (Figure 49B) ([Iraqui et al., 2012](#)). Afin de déterminer l'efficacité de redémarrage de fourche dans les différents fonds génétiques, la fréquence des RS en condition de blocage de fourche est comparée au taux

basal de la réversion de l'allèle *ura4sd20* (*t-ura4sd20-ori*, construction dépourvue de la séquence *RTS1*).

Dans les cellules *wt*, la fréquence des RS en amont est multipliée par environ 2,6 lorsque la barrière *RTS1* est activée (Figure 49). Dans la construction *t<ura4sd20-ori*, *ura4sd20* est déjà répliqué lorsque la fourche de réplication est bloquée au niveau de la barrière *RTS1*. La fréquence des RS en amont de *RTS1* est indicative de la résection des fourches suivie de son redémarrage dans les cellules *wt*. La délétion de *fft2* n'a pas d'effet sur la fréquence des RS (Figure 49C). Par contre, les souches *fft3-d* et *fft3-K418R-myc* ne montrent pas d'induction de RS en amont de *RTS1*. Cela va dans le sens d'une perturbation de l'étape de la résection dans ces mutants.

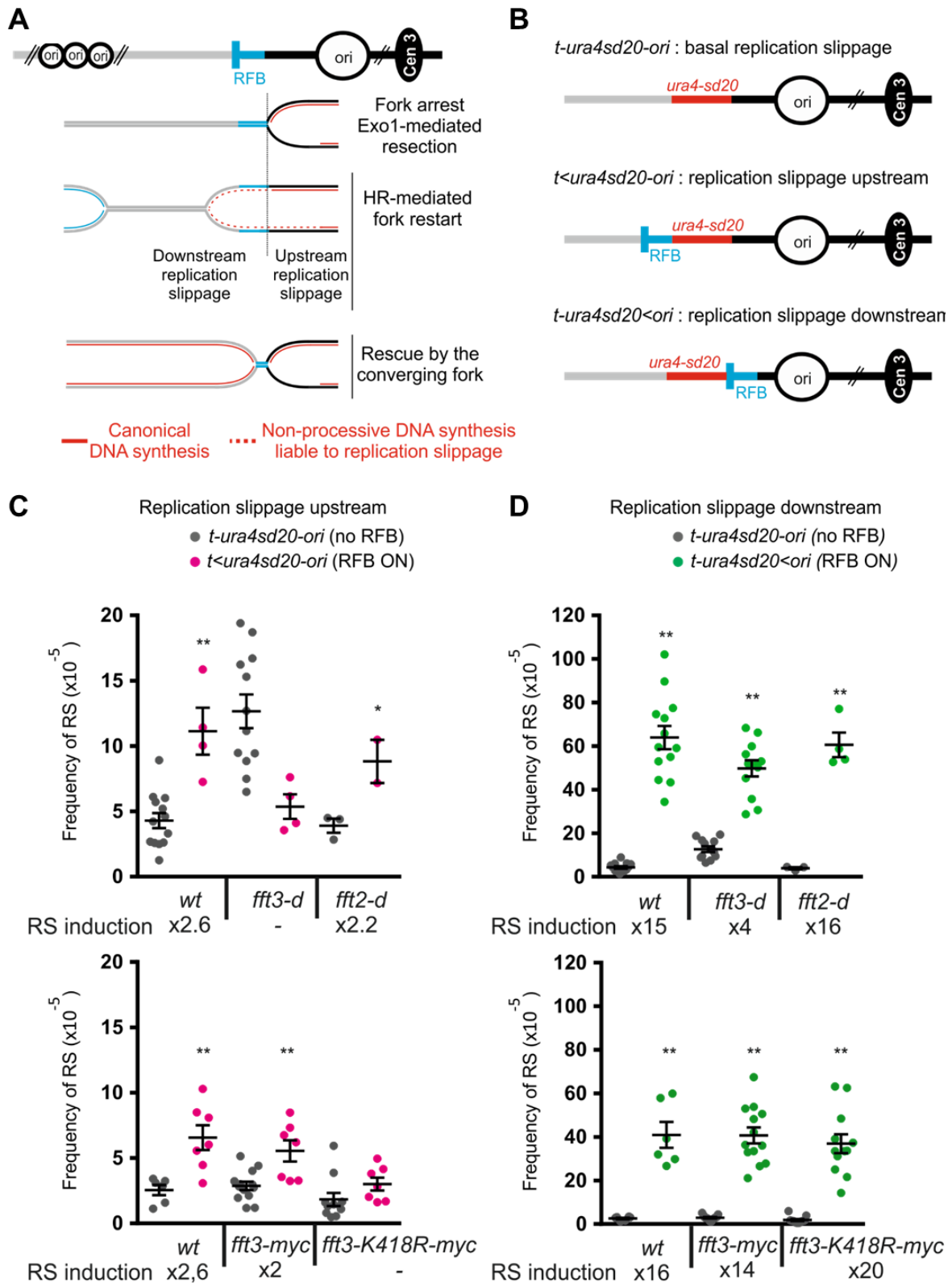


Figure 49 : Fft3 promeut le redémarrage des fourches de réplication par la RH indépendamment de son activité ATPase. (A) Schéma de RTS1-RFB (barre bleue) et de la synthèse d'ADN non processive associée au redémarrage des fourches bloquées. RTS1-RFB est située à 5 kb d'une origine de réplication forte (ori), située du côté centromérique. « Cen3 » indique la position du centromère. Suite à leur blocage, les fourches sont redémarrées

via le RH et le réplisome nouvellement formé est associé à une synthèse d'ADN non processive (lignes rouges discontinues) sujette à des glissements de la réplication (RS, pour Replication Slippage). **(B)** Schéma des constructions contenant le gène rapporteur *ura4sd20* non associé à RTS-RFB (construction du haut) ou situé en amont ou en aval de RTS1-RFB (construction du milieu et du bas respectivement). **(C)** et **(D)** Fréquence des RS en amont (**C**, *t-ura4sd20-ori*) et en aval (**D**, *t-ura4sd20<ori*) du site de blocage de fourche (RFB ON). La construction *t-ura4sd20-ori* (dépourvue de séquence RTS1, no RFB) permet de définir le taux basal des RS. Chaque point représente la fréquence enregistrée pour une culture. Les barres représentent la moyenne des fréquences (barres horizontales) \pm l'erreur type (SEM, pour standard error of the mean). Le test-t a été utilisé pour l'analyse statistique (* $p < 0.04$, ** $p < 0.004$). L'induction des RS (RFB ON/no RFB) est indiquée pour chaque souche.

La fréquence des RS en aval de la barrière *RTS1* activée est 15 fois supérieure au taux basal dans les cellules *wt* (Figure 49B). Le niveau de RS en absence de *fft2* est comparable aux cellules *wt*. En absence de *fft3*, la fréquence des RS n'est multipliée que par 4 suite à l'activation de la barrière *RTS1* (Figure 49B, panneau du haut) ; ce qui indique une diminution d'environ 70% de l'efficacité du redémarrage de fourche (en considérant que cette efficacité est de 100% dans les cellules *wt*). De manière intéressante, le mutant *fft3-K418R-myc* montre une induction des RS comparable aux cellules *wt* et *fft3-myc* (Figure 49B, panneau du bas). Cela indique que l'implication de Fft3 dans le redémarrage des fourches bloquées par la RH ne requière pas son activité ATPase.

Dans l'ensemble, ces résultats montrent que Fft3 joue un rôle dual au niveau des fourches de réplication dysfonctionnelles : (i) en promouvant la résection des fourches *via* son activité ATPase et donc probablement *via* sa fonction de remodelage des nucléosomes ; et (ii) en assurant un redémarrage de fourches efficace par la RH indépendamment de son activité ATPase. Ainsi, le rôle de Fft3 dans la résection des fourches peut être découplé de son rôle dans le redémarrage des fourches.

Discussion

Un des enjeux principaux pour les cellules est de garantir la complétion de la réplication afin d'assurer une ségrégation correcte des chromosomes et d'éviter la transmission des dommages occasionnés durant la phase S. Dans ce travail, nous nous sommes intéressés aux rôles importants que joue la RH dans le maintien de la stabilité des génomes en réponse à des perturbations de la progression des fourches de réplication.

La nucléation de Rad51 sur l'ADNsb promeut le redémarrage des fourches de réplication mais aussi la protection des brins naissants contre une dégradation trop excessive. En utilisant le système de blocage de fourche conditionnel, *RTS1*-RFB chez *S. pombe*, nous avons pu montrer que ces deux fonctions de Rad51/Rad52 sont génétiquement séparables. D'abord, nous avons montré qu'en absence de Rad51/Rad52 les fourches de réplication dysfonctionnelles sont soumises à une dégradation excessive complètement dépendante de la nucléase Exo1. Cela corrobore les études menées chez *E. coli* et chez les métazoaires (Courcelle et al., 2003; Hashimoto et al., 2010; Schlacher et al., 2011) et surtout étend notre compréhension du mécanisme (ou d'un des mécanismes) par lequel les facteurs de la RH préviennent la formation de défauts mitotiques en réponse au stress réplicatif. Le suivi *in vivo* de la barrière *RTS1*, montre qu'une seule fourche de réplication déprotégée est convertie en pont mitotique contenant le site de blocage et rappelant les UFBs chez les mammifères. Cela reflète la persistance d'une connexion entre les deux chromatides sœurs, et ce, malgré la disponibilité d'une fourche convergente pour le sauvetage de la fourche dysfonctionnelle. En effet, l'accumulation exagérée d'ADNsb à la fourche (en absence de Rad52) génère des événements de terminaison pathologique à l'origine du maintien de l'enchevêtrement des chromatides sœurs (Figure 7 publication #1). Il s'avère que la non-formation de cet ADNsb *via* la délétion de Exo1 ou l'expression du mutant Rad51-3A, qui forme un nucléofilament dépourvu de l'activité d'échange de brin, est suffisante pour prévenir la formation de défauts mitotiques en réponse à l'activation de la barrière *RTS1*. La protection des fourches de réplication par les facteurs de la RH, Rad51/Rad52, s'inscrit donc incontestablement parmi les voies assurant la stabilité du génome et prévenant la transmission de dommages à l'ADN au cours du stress réplicatif. Les travaux réalisés durant cette thèse permettent de proposer le modèle décrit dans la (Figure 50).

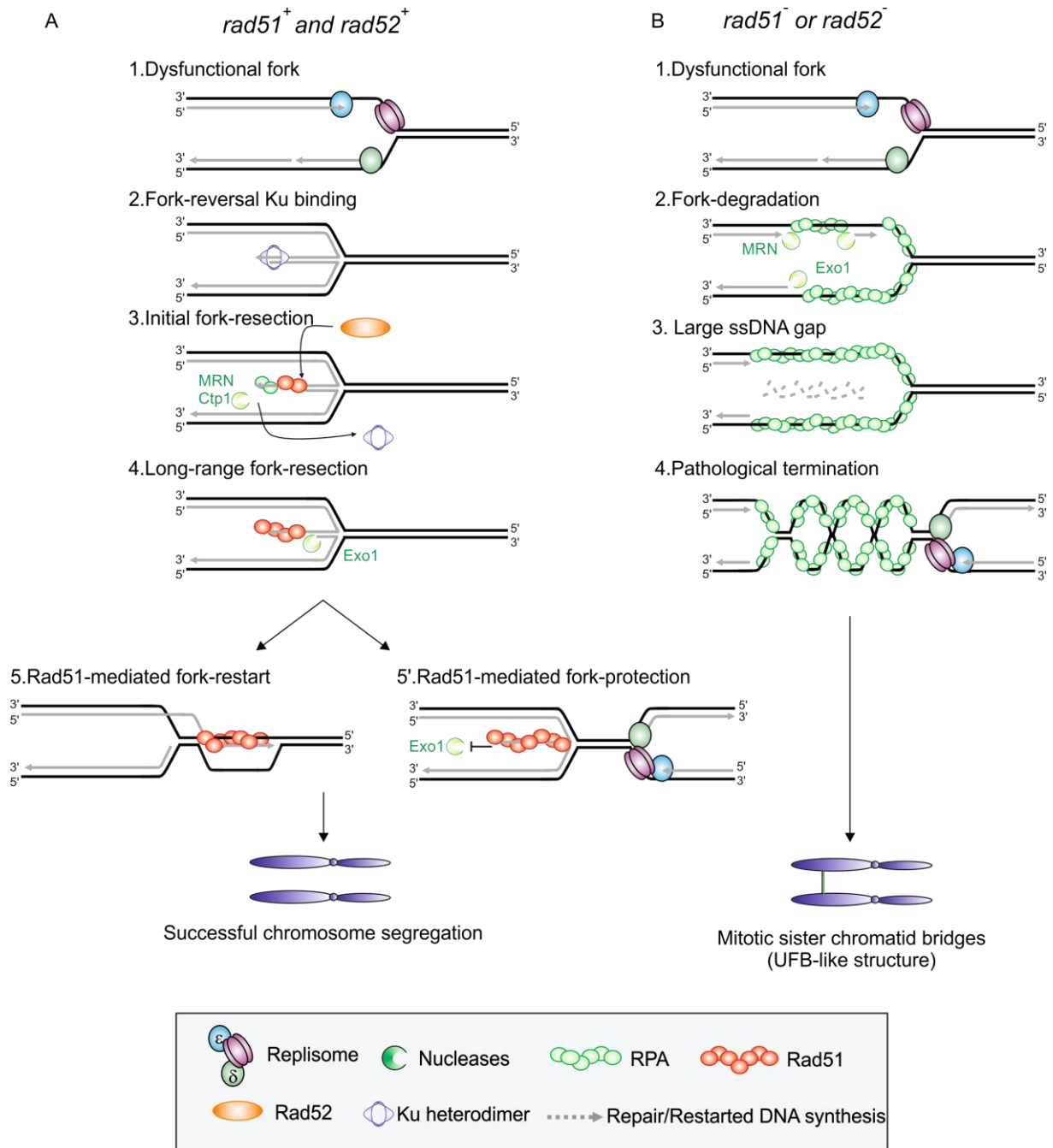


Figure 50 : Modèle proposé pour le rôle de Rad51 dans la protection et le redémarrage des fourches de réplication chez *S. pombe*. (A) Les fourches de réplication dysfonctionnelles réversent et fournissent une extrémité double-brin sur laquelle Ku se fixe (1-2). MRN et Ctp1 initie la résection initiale en libérant le fragment de Ku et en fournissant un ADNsb sur lequel les facteurs de la RH peuvent être recrutés (3). Exo1 procède alors à la résection extensive pour générer une large brèche d'ADNsb ce qui permet à Rad51 de continuer sa nucléation sur l'ADNsb (4). (5) Rad51 procède à l'invasion du duplexe d'ADN parental, ce qui amorce la synthèse d'ADN et la restauration de la fourche. En même temps, le filament Rad51 protège le bras réversé contre une résection trop extensive par Exo1 (5'), maintenant ainsi la structure de la fourche propice à une fusion avec la fourche convergente. (B) En l'absence de Rad51 ou Rad52, une fourche dysfonctionnelle subit une dégradation excessive des brins néosynthétisés par la machinerie de résection, notamment par Exo1 (1-2). L'ADNsb en excès qui en résulte (> 3kb) est responsable de l'échec de la terminaison de la réplication (3-4). Ces événements de terminaison pathologique sont responsables de la non-disjonction des chromatides sœurs en mitose, ce qui se traduit par la formation de ponts anaphasiques type UFB susceptibles de casser durant la mitose.

J'ouvre ici une parenthèse pour dire que : historiquement, la RH a été associée à la réparation des CDBs *via* un échange génétique avec une séquence homologue. Les fonctions de la RH au cours de la réplication ont d'abord été attribuées à sa capacité de réparation des CDBs. Plusieurs études, incluant les travaux présentés dans ce manuscrit, soutiennent maintenant que l'intervention de la RH au niveau des fourches de réplication peut intervenir en absence de CDBs et même en absence d'échange de brin médié par Rad51 (Ait Saada et al., 2017; Lambert et al., 2010; Mizuno et al., 2009; Petermann et al., 2010; Schlacher et al., 2011; Teixeira-Silva et al., 2017). De ce fait, la qualification « recombinaison homologue » serait littérairement et en terme de mécanisme impropre à l'emploi dans ce contexte, étant donné que Rad51 ne fait intervenir ni sa fonction « recombinaison » ni sa fonction « recherche d'homologie ». Il y a donc une distinction à faire entre le « recombinosome » et « protectosome ». Rad51 faisant partie des deux complexes, les conditions durant lesquelles cette protéine passe de sa fonction protectrice à sa fonction recombinase ne sont pas connues, mais il n'est pas exclu que des transitions conformationnelles de Rad51, de concert avec l'intervention de médiateurs, jouent un rôle dans la régulation de ces fonctions. Clairement, les facteurs de la RH (qui ne font pas que de la RH) n'ont pas fini de livrer tous leurs secrets.

I. L'absence de Rad51/Rad52 révèle le côté obscur de la résection par Exo1

Une des caractéristiques des fourches de réplication altérées est la présence d'ADNsb. Cet ADNsb est recouvert par RPA, ce qui sert à recruter et à activer les protéines du checkpoint (ATR/Rad3/Mec1). Différents mécanismes peuvent participer à la formation de l'ADNsb à la fourche tels que le découplage des activités des hélicases et des polymérases ou la dégradation des brins néosynthétisés par des nucléases (Pasero and Vindigni, 2017).

Les nucléases agissant au niveau des CDBs jouent également un rôle dans la résection des fourches de réplication (Mre11, Ctp1/CtIP/Sae2, Exo1 et Dna2 entre autres). L'intervention de ces nucléases jouent un rôle important dans l'activation de ATR mais aussi dans le recrutement des facteurs de la RH pour promouvoir le RDR et prévenir l'accumulation de CDBs

aux fourches (Nakada et al., 2004; Teixeira-Silva et al., 2017; Tsang et al., 2014). Néanmoins, la régulation de l'activité de ces nucléases est tout aussi importante que leur intervention aux fourches de réplication. En effet, une activité non contrôlée de ces nucléases conduit à une accumulation d'ADNsb, ce qui peut être très préjudiciable pour les cellules.

Les résultats présentés dans Teixeira et al., permettent de disséquer plus en détail comment s'opère la résection des fourches dysfonctionnelles. Cette résection se produit en deux étapes : une résection initiale et une résection extensive. La résection initiale est opérée par MRN et Ctp1 et cela a deux rôles : (i) évincer Ku de la fourche dysfonctionnelle et (ii) exposer un court fragment d'ADNsb (environ 110pb), vraisemblablement généré indépendamment de l'activité nucléase de Mre11 (Figure S2 publication #2). Cette résection initiale est critique pour promouvoir le redémarrage de fourche par Rad51 et la résection extensive par Exo1 (voir section 3 de la partie Discussion).

Les facteurs de la RH chez les métazoaires, RAD51, BRCA2 et FANCD2 préviennent la dégradation excessive des fourches de réplication par MRE11 et DNA2 (Hashimoto et al., 2010; Schlacher et al., 2011, 2012; Zellweger et al., 2015). Dans ce travail, nous montrons que les fourches de réplication non protégées par un filament Rad51 sont à la merci de la nucléase Exo1 et non de Mre11. Les fourches de réplication non protégées par Rad51 voient leur chance de sauvetage par l'arrivée de la fourche convergente s'amenuiser car l'accumulation d'ADNsb à la fourche génère des événements de terminaison pathologique. Cela se traduit en mitose par la formation de ponts anaphasiques type UFBs composés d'ADNsb émanant du site de blocage de fourche. Ces ponts présentent une configuration suggérant une résection des deux brins néosynthétisés car le marquage RPA est retrouvé de façon symétrique le long du pont anaphasique (Figure 4C publication #1). Cette hypothèse peut être testée par 2DGE en condition dénaturante (Figure S3A et B publication #1) associée à une hybridation spécifique de brin. Il est à noter que la résection des deux brins néosynthétisés est contre-intuitive étant donné la polarité de Exo1 (5'>3'). Cela suggère que d'autres nucléases interviennent en ne générant que des coupures endonucléasiques étant donné que la résection est complètement dépendante de Exo1 en absence de Rad52 (Figure 3 publication #1). Une deuxième possibilité est la présence de courtes brèches d'ADNsb situées en amont de *RTS1*-RFB. La résection des

deux brins néosynthétisés a été observée chez le xénope en absence de BRCA2. En effet, des bulles de réplication entièrement composées d'ADNsb ont été observées (Kolinjivadi et al., 2017).

Ce n'est pas la première fois que la nucléase Exo1 est impliquée dans la dégradation pathologique des fourches de réplication. Il a été montré qu'en absence de WRN, plus précisément de son activité exonucléase, EXO1, mais pas DNA2, est impliquée dans la dégradation des brins néosynthétisés en réponse à une inhibition de la topoisomérase 1 (en présence de CPT) (Iannascoli et al., 2015). Récemment, Sen1 et MRX ont été identifiés comme des facteurs prévenant la dégradation extensive par Exo1 lorsque les fourches de réplication entrent en collision avec la machinerie de transcription (Brambati et al., 2018). Rad3^{ATR} et Rad53^{CHK2} limitent la dégradation des fourches de réplication par Exo1 chez *S. pombe* (au niveau de la barrière *RTS1*) et chez *S. cerevisiae* (en réponse à l'hydroxyurée), respectivement (Cotta-Ramusino et al., 2005; Sogo et al., 2002; Tsang et al., 2014).

A côté de ces facteurs qui régulent négativement son activité, Exo1 peut être régulée positivement. L'intervention de Exo1 au niveau de la barrière *RTS1* est stimulée par Rad9 (complexe 9-1-1) et probablement par le remodeleur de la chromatine Fft3 (Figure 47) (Tsang et al., 2014). La contribution de ces facteurs dans la dégradation non contrôlée des brins néosynthétisés par Exo1 en absence de Rad52 n'est pas connue. Cela peut être testé en étudiant l'état de dégradation des fourches de réplication dans les doubles mutants *rad52-d rad9-d* et *rad52-d fft3-d*. L'action de Fun30 dans la promotion de la résection par Exo1 au niveau des CDBs est contrecarrée par Rad9^{53BP1} (Chen et al., 2012). Il a été montré récemment que Rad9^{53BP1} intervient au niveau des fourches de réplication pour limiter leur dégradation, notamment par Exo1 (Villa et al., 2018). Le rôle de Crb2^{53BP1} chez *S. pombe* peut être un facteur limitant la résection au niveau de la barrière *RTS1*. De même, sa délétion dans le mutant *rad52-d* pourrait aggraver les phénotypes rapportés dans ce mutant.

II. Quand la stabilité du filament Rad51 prime sur sa capacité d'échange de brin

Rad51 et son chargeur, Rad52, sont impliqués dans plusieurs transactions qui s'opèrent aux alentours des fourches de réplication fonctionnelles et dysfonctionnelles. Comme mentionné précédemment, les fonctions de Rad51 à la fourche incluent : (i) la stabilisation des fourches en limitant leur dégradation, (ii) le redémarrage des fourches bloquées, (iii) le maintien de la continuité de la réplication et (iv) la réversion de fourches de réplication. Il n'est pas clair si toutes ces fonctions sont engagées lorsque Rad51 prend en charge une fourche de réplication ou si elles le sont de façon séquentielles. Toutefois, la nature de la lésion rencontrée par les fourches peut dicter l'angle par lequel Rad51 va sauver la fourche dysfonctionnelle. Par exemple, le redémarrage de fourches est observé en réponse à un traitement à l'hydroxyurée ou au CPT mais pas en réponse aux UVs. Par contre, la protection des fourches de réplication par RAD51 est observée en réponse à l'hydroxyurée et aux UVs. De manière surprenante et que je ne saurais pas expliquer, RAD51 ne semble pas être impliquée dans la protection des fourches de réplication, dont la progression est perturbée en présence de CPT (Iannascoli et al., 2015; Vallerga et al., 2015). Chez les eucaryotes et notamment chez *S. pombe* la camptothécine (tout comme plusieurs autres drogues) peut promouvoir une réparation des lésions induites indépendamment de Rad51 (Doe et al., 2004). Il est à noter que le mutant Rad51-3A qui forme un filament stable sur l'ADNsb montre une légère résistance au CPT comparativement au mutant nul (*rad51-d*) (Annexe 1). Cela suggère que parmi les lésions induites par le CPT, celles prises en charge par Rad51 requièrent en partie sa fonction de protection des fourches chez *S. pombe*.

Nous avons montré ici que la fixation de Rad51 est suffisante pour protéger la stabilité des fourches de réplication et prévenir l'instabilité génétique en réponse au stress répliatif. En parallèle du travail présenté ici, plusieurs travaux menés par d'autres laboratoires soulèvent également l'importance de la protection des fourches de réplication. Des mutations de RAD51, retrouvées chez les patients atteints de l'anémie de Fanconi, ont été caractérisées pour leur incapacité à protéger les fourches de réplication, et ce à cause de la formation d'un

filament nucléoprotéique RAD51 instable (Kolinjivadi et al., 2017; Mijic et al., 2017; Wang et al., 2015; Zadorozhny et al., 2017).

1.1. La protection et le redémarrage des fourches par Rad51/Rad52 sont génétiquement séparables

Les caractéristiques principales de Rad51 lors de la réparation/redémarrage est la formation d'un nucléofilament Rad51 et l'invasion d'une séquence homologe. Il a été montré à de nombreuses reprises que les fonctions de réparation des CDBs et de redémarrage/protection des fourches de réplication peuvent être génétiquement séparables (Kolinjivadi et al., 2017; Petermann et al., 2010; Schlacher et al., 2011). Chez les métazoaires, il a été montré que la capacité de RAD51 à protéger et à redémarrer les fourches de réplication dépend de sa stabilisation sur l'ADNsb (Kim et al., 2014; Kolinjivadi et al., 2017; Petermann et al., 2010). Il s'avère que la région C-terminale de BRCA2 qui a été décrite comme nécessaire à la stabilisation de RAD51 et la protection des fourches de réplication (Schlacher et al., 2011) est également importante pour le redémarrage des fourches de réplication (Kim et al., 2014; Kolinjivadi et al., 2017).

En utilisant le mutant de séparation de fonction Rad51-3A, nous montrons ici que (i) non seulement la simple fixation de Rad51 sur l'ADNsb de manière stable a des vertus bénéfiques en ce qui concerne la stabilisation des fourches de réplication et (ii) cette fonction est nécessaire et suffisante pour assurer la terminaison de la réplication *via* la convergence de fourche (Ait Saada et al., 2017). Cette fonction étant indépendante du redémarrage de fourche par Rad51, cela illustre le fait que la protection et le redémarrage de fourche sont deux fonctions portées par Rad51 génétiquement distinctes et séparables.

Le fait que la fonction de protection des fourches de réplication tienne un rôle important dans le sauvetage des fourches de réplication altérées, *via* la convergence de fourche, est en accord avec la nature multi-origine des chromosomes eucaryotes. La convergence de fourches limiterait ainsi le recours à des mécanismes de redémarrage/réparation par la RH

potentiellement mutagènes et illustre l'avantage d'un excès en origines de réplication chez eucaryotes.

Ainsi, la RH est vectrice de la stabilité et de l'instabilité génétique à la fois. D'un côté, la RH est nécessaire au maintien de l'intégrité du génome, de l'autre elle génère de l'instabilité génétique lorsque ses activités recombino-gènes sont sollicitées. Etant donné que la majorité des sauvetages de fourche repose sur l'arrivée de la fourche opposée (Kawabata et al., 2011), la relevance fonctionnelle du redémarrage de fourche par la RH n'est pas toujours évidente. Il se peut qu'en réponse au stress réplicatif, les facteurs de la RH (Rad51/Rad52) protègent en première instance les fourches de réplication en régulant négativement l'activité des nucléases. Puis, de concert avec d'autres régulateurs de la résection (checkpoints, Ku, MRN/X ...), une résection contrôlée des fourches est amorcée afin de redémarrer/réparer les fourches altérées, et ce lorsque la convergence de fourches ne peut pas terminer la réplication.

III. Ku se fait complice de la RH pour le redémarrage des fourches non cassées

Plusieurs études ont permis de lier les fonctions réplicatives de Ku à la réparation des fourches de réplication cassées (Chanut et al., 2016; Foster et al., 2011; Sun et al., 2012). En effet, l'extrémité double-brin générée suite à la cassure des fourches dysfonctionnelles présente un substrat propice à la fixation par l'hétérodimère Ku. En réponse à un traitement à la camptothécine, l'éviction de Ku de l'extrémité double-brin de la cassure générée nécessite l'intervention de MRE11 et CtIP chez les mammifères (Chanut et al., 2016). Chez *S. pombe*, Ku est retrouvé au niveau de la barrière du rDNA, où il stabilise les fourches de réplication bloquées en absence de Brc1 (Sánchez and Russell, 2015).

Les travaux présentés dans Teixeira et al., montrent que Ku est recruté au niveau de la barrière *RTS1* activée et ce, indépendamment de la formation de cassures (Teixeira-Silva et al., 2017). Ainsi, une structure, vraisemblablement une fourche réversée, favorisant la fixation de Ku est formée en réponse au blocage de fourche (Figure 50A).

Comme pour les CDBs, les télomères et les fourche cassées (Foster et al., 2011; Hardy et al., 2014; Mimitou and Symington, 2010; Sun et al., 2012), la fixation de Ku au niveau de la barrière *RTS1* constitue un frein à une résection par Exo1 et l'intervention de MRN et Ctp1 est nécessaire pour initier la résection et amorcer le redémarrage de fourche par la RH. MRN et Ctp1 participent à l'éviction de Ku et à la formation des 110pb générées lors de la résection initiale (Figure 2 publication #2). Cependant, l'activité nucléase de Mre11 n'est impliquée ni dans la formation de ces 110pb ni dans le redémarrage des fourches bloquées (Figure S2 publication #2). Plusieurs hypothèses, non exclusives, sont possibles : (i) MRN/Ctp1 joueraient un rôle structural (Andres et al., 2015; Tittel-Elmer et al., 2012) ; (ii) une autre nucléase, dont le recrutement ou l'intervention dépend de MRN/Ctp1, serait impliquée ; (iii) cette nucléase pourrait jouer un rôle redondant avec Mre11, ce rôle étant révélé en absence de l'activité nucléase de Mre11. Des nucléases candidates peuvent être testées. Il s'agit des nucléases impliquées dans la maturation des fragments d'Okazaki (Rad2^{FEN1}, Dna2 et RNase H1). Par exemple, DNA2 est impliquée dans la résection et le redémarrage des fourches de réplication chez les mammifères (Thangavel et al., 2015). Chez *S. pombe*, Dna2 intervient dans la prise en charge des fourches de réplication réversées (Hu et al., 2012). Une autre nucléase peut être testée, il s'agit de l'endo/exonucléase Ast1, qui appartient à la famille des XPG. Chez *S. pombe*, l'absence de cette nucléase ne confère pas de phénotype sévère quant à la sensibilité des cellules aux agents génotoxiques. Toutefois, la délétion simultanée de *ast1* et de *mre11* aggrave la sensibilité de *mre11-d* au MMS (Kuntz and O'Connell, 2013). L'absence de Ku dans le fond *ast1-d mre11-d* supprime la sensibilité de ce mutant au MMS (Kuntz and O'Connell, 2013).

En constituant un frein à une résection directe par Exo1, la fixation de Ku, au niveau de la barrière *RTS1*, permet de coordonner une résection en deux étapes. En l'absence de Ku, la résection initiale médiée par MRN et Ctp1 devient dispensable. Dans cette situation, la résection des fourches de réplication repose essentiellement sur Exo1. En l'absence de Ku, l'ADNsb s'accumule de façon plus importante qu'en présence de Ku. Cela suggère que la fixation de Ku au niveau des fourches de réplication constitue une ligne de défense contre une dégradation trop extensive par Exo1.

Malgré une résection plus importante des fourches de réplication, l'absence de Ku compromet la dynamique de redémarrage des fourches de réplication par la RH. Le ralentissement du redémarrage des fourches est corrélé avec une diminution de RPA et Rad51 en amont du site de blocage de fourche. Cela suggère que Ku est impliquée dans le recrutement de RPA, d'autant plus que ces deux complexes interagissent aussi bien chez *S. pombe* (Figure 7 publication #2) que chez *S. cerevisiae* (Luciano et al., 2012). Il reste, toutefois, à identifier le mécanisme par lequel Ku optimise le recrutement de RPA. Ces résultats montrent que Ku participe à la régulation fine du redémarrage de fourche, et ce, en plus de coordonner la résection en deux étapes.

Le phénotype de *ku-d* en ce qui concerne la résection rappelle celui de *rad52-d*, à la différence que l'ADNsb est retrouvé sur une distance de 1,8kb dans *ku-d* versus >3kb dans *rad52-d*. Cela suggère que la protection des fourches de réplication par Rad52/Rad51 prime sur celle de Ku. Il est possible qu'en absence de Ku, la fixation de Rad51, même si elle est deux fois moins importante que dans les cellules sauvages, arrive à endiguer l'effet délétère d'une résection trop extensive (c'est pour cela qu'elle serait limitée à 1,8kb). On pourrait émettre l'hypothèse qu'en absence de Ku les fourche de réplication réversent grâce à Rad51 et que Exo1 ciblerait le brin tardif uniquement. Au contraire, en absence de Rad51, les fourches de réplication ne réverseraient pas et seraient directement attaquées par Exo1, sur les deux brins cette fois (Figure 50B). Le fait que *ku-d* montre un défaut de redémarrage et *a priori* une terminaison de réplication non altérée suggère que les fourches de réplication sont majoritairement sauvées par l'arrivée de la fourche convergente.

IV. La réversion de fourche, la clé de tous les mystères ?

D'abord décrite comme étant une structure pathologique, plusieurs études montrent maintenant que ce processus visant à remodeler les fourches de réplication participe au redémarrage des fourches de réplication (Berti et al., 2013; Bétous et al., 2012; Ciccia et al., 2009, 2012) en fournissant un point d'entrée à des nucléases (Teixeira-Silva et al., 2017; Thangavel et al., 2015).

Le remodelage des fourches de réplication implique leur réversion et leur dégradation. Lequel de ces deux phénomènes précède l'autre n'est pas complètement élucidé. Les travaux présentés ici montrent plusieurs évidences en faveur d'un modèle où les fourches de réplication réversent avant de subir une dégradation en deux étapes par MRN/Ctp1 et Exo1. D'abord le rôle inattendu de Ku aux fourches de réplication dysfonctionnelles est en faveur de la fixation de cette protéine sur le bras réversé de la fourche. Deuxièmement, la résection par Exo1 dépend de la capacité de MRN/Ctp1 à évincer Ku de la fourche somme toute réversée. Troisièmement, en absence de Rad52 la résection dépend exclusivement de Exo1 et ne nécessite pas la présence de Rad50. En effet, la résection n'est pas supprimée dans le double mutant *rad52-d rad50-d*. Cela suggère que la structure fixée par Ku n'est plus formée en absence de Rad52, d'où le fait que Rad50 soit dispensable pour initier la résection dans le mutant *rad52-d* (Figure S3C publication #1). Ces évidences sont consolidées par les résultats préliminaires obtenus concernant la réversion des fourches (Section III de la partie Résultats). Ainsi deux modes de résection sont possibles : un dépendant de MRN/Ctp1 lorsque les fourches réversent et un dépendant de Exo1 lorsque les fourches ne réversent pas ou ne sont pas fixées par Ku.

La réversion des fourches dépend de RecA chez *E. coli* et RAD51 chez les mammifères (Courcelle et al., 2003; Zellweger et al., 2015). Il est donc plausible que les facteurs de la RH, Rad52 (Figure 46) et Rad51 (à tester en parallèle de Rad51-3A), soient impliqués dans la promotion de la réversion de fourche. La formation de cette structure et sa stabilisation, *via* la formation d'un nucléofilament Rad51 stable, constituerait le moyen par lequel Rad52 et Rad51 protègent les fourches de réplication dysfonctionnelles contre la dégradation excessive par Exo1 (Figure 50). En absence de Rad52/Rad51, les fourches de réplication sont directement la cible d'attaques nucléasiques par Exo1 (Figure 50B). Cela contraste quelque peu avec le modèle proposé chez les mammifères. Bien que la protection des fourches de réplication par les facteurs de la RH soit conservée entre *S. pombe* et les métazoaires (Ait Saada et al., 2017; Hashimoto et al., 2010; Kolinjivadi et al., 2017; Schlacher et al., 2011, 2012; Zadorozhny et al., 2017), le rôle de RAD51 chez les métazoaires soulève quelques interrogations. Les études les plus récentes, portées notamment par les laboratoires de Lopez M, Vindigni A et Constanzo V, suggèrent que des fonctions de RAD51 indépendantes de BRCA2

participent à la formation du bras réversé. En absence de BRCA2, les fourches réversées grâce à RAD51 sont la cible d'une dégradation extensive par des nucléases (MRE11, EXO1, DNA2), et ce à cause d'une absence de protection du bras réversé par un filament RAD51 stable (la stabilité du filament dépend de BRCA2) (Mijic et al., 2017; Taglialatela et al., 2017; Zellweger et al., 2015). Ce rôle dual de RAD51 aux fourches de réplication a notamment été proposé suite à des observations faites avec le mutant RAD51-T131P (qui je le rappelle est capable de promouvoir la réversion de fourche mais qui est incapable de protéger les fourches de réplication) (Kolinjivadi et al., 2017; Mijic et al., 2017; Zadorozhny et al., 2017). De plus, l'inactivation de remodeleurs de fourches de réplication appartenant à la famille SNF2 (SMARCAL1, ZRANB3, HTLF) ou même RAD51 permet de restaurer la stabilité des fourches de réplication en absence de BRCA2 (Kolinjivadi et al., 2017; Mijic et al., 2017; Taglialatela et al., 2017). Cela est en accord avec le fait que la réversion de fourche fournit le moyen aux nucléases d'opérer librement sur une fourche réversée non protégée. Toutefois, cela contraste avec le fait que l'inactivation de RAD51 conduit à l'accumulation d'ADNsb au niveau des fourches de réplication en réponse à un stress réplcatif exogène (Hashimoto et al., 2010). Paradoxalement, Mijic et al., soutiennent qu'en absence de RAD51 (siRAD51) la dégradation des fourches de réplication n'est pas exacerbée (Mijic et al., 2017). Il est proposé que RAD51 tient un rôle indépendant de BRCA2 dans la promotion de la réversion de fourche qui constitue l'événement initiateur de la dégradation incontrôlée en absence de BRCA2.

Une question soulevée par rapport au rôle de RAD51, qui est indépendant de BRCA2, concerne le remplacement de RPA. Pour rappel, RPA montre plus d'affinité pour l'ADNsb que RAD51 en absence de médiateurs de la RH. Là encore plusieurs hypothèses sont possibles : (i) la fixation de quelques molécules RAD51 suffit à promouvoir la réversion de fourche, d'autant plus que la stabilité du filament RAD51 n'est pas requise (Kolinjivadi et al., 2017; Mijic et al., 2017) et (ii) la réversion est assistée par les activités enzymatiques de remodeleurs de fourche et ne nécessite donc pas un filament RAD51 complètement stable. Chez *S. pombe*, un rôle de Rad51 indépendant de Rad52 est peu probable, car la réversion des fourches de réplication au niveau de la barrière *RTS1* est absente dans le double mutant *rad52-d exo1-d*. Néanmoins, cela peut être confirmé de façon directe en utilisant le mutant Rad51-Y388H qui n'interagit pas avec Rad52 (Krejci et al., 2001; Lee et al., 2003). La prédiction

étant que Rad51-Y388H ne présentera pas de réversion de fourche et se comportera comme le mutant nul *rad51-d*. Un mutant Rad51 plus évident à tester est Rad51-T131P (qui promeut la réversion mais pas la protection). Cependant, ce mutant est utilisé en condition de dominance négative, *i.e* en présence d'une forme RAD51 sauvage. *In vitro*, RAD51-T131P, seule, forme un filament nucléoprotéique dont les propriétés structurales sont altérées par rapport à la forme RAD51 sauvage (Zadorozhny et al., 2017). Cependant, il est difficile de prédire ses capacités en terme de promotion de la réversion de fourche *in vivo* car chez *S. pombe*, qui est un organisme haploïde, les différents mutants sont exprimés à leur *locus* endogène.

Il est à souligner que toutes les études citées ici, y compris les travaux présentés, s'accordent sur une chose: Rad51/RAD51 est clairement impliquée dans la formation et la protection des fourches réversées. Dans les travaux présentés ici, le remodelage des fourches de réplication a été étudié dans un contexte où une fourche est bloquée à un *locus* défini. Ainsi, les phénotypes observés sont inhérents à leur blocage. Chez les métazoaires, l'étude du remodelage des fourches de réplication consiste à étudier des populations de fourches de réplication hétérogènes (*i.e* issues de différentes régions génomiques, et même épigénomiques). De même, la variabilité technique et biologique (l'utilisation de différentes lignées cellulaires) pourrait expliquer l'implication d'une nucléase plutôt qu'une autre, l'implication de plusieurs remodeleurs de fourches alors que localement et en fonction de la structure de la fourche un remodeleur plutôt qu'un autre est impliqué.

1.2. Limites des techniques utilisées pour étudier la réversion de fourche

La réversion de fourche peut être appréciée par microscopie électronique (Vindigni and Lopes, 2017). L'avantage de cette technique est que l'observation d'une fourche réversée est directe et non-ambigüe. L'inconvénient est qu'elle se base sur l'analyse de fourches hétérogènes dont les antécédents concernant un blocage de fourche antérieur à la réversion ne sont pas connus. Cela ne permet donc pas de distinguer les fourches bloquées par un obstacle. Une seconde méthode pour détecter les fourches réversées se base sur l'analyse des intermédiaires de réplication par 2DGE. En réponse à un stress réplicatif exogène, la réversion

de fourche est détectée lors de la présence d'un signal appelé signal de cône. Un signal de cône représente l'accumulation de structure à quatre branches (jonction de Holliday et fourches réversées). Ces signaux de cônes sont détectés indépendamment de la présence d'un signal correspondant à un blocage de fourche. Sans doute parce qu'un blocage de fourche aux *locus* ciblé est aléatoire et ne permet de pas sa détection.

Dans ce travail nous avons mis au point deux techniques pour analyser la réversion de fourche au niveau de la barrière *RTS1*. L'avantage de ce système est que le blocage est contrôlé et défini. Ainsi, il est plus facile d'interpréter les signaux émanant du site de blocage de fourche par 2DGE. La migration des intermédiaires de réplication en une seule dimension nous permet également de détecter sans ambiguïté la présence du bras réversé. Toutefois ces deux façons d'étudier la réversion de fourches se heurtent à des limites techniques du fait de l'utilisation d'enzymes de restriction. En effet, en fonction de la position des sites de restriction, les structures attendues peuvent être (i) perdues (réversion au-delà du site de restriction) lorsque analysées par 2DGE et (ii) non générées (réversion sur une courte distance ne dépassant pas la position du site de restriction).

Une autre limite, qui peut être attribuée à la technique permettant de révéler le bras réversé, est le fait qu'une fourche de réplication cassée générerait le même type de signal que le bras réversé. Cela signifie que cette technique ne peut être appliquée dans des systèmes où le blocage de fourche n'est pas associé à une cassure (c'est le cas avec *RTS1-RFB*). Il est à noter que l'absence du signal correspondant à la réversion de fourche dans le mutant *rad52-d* souligne le fait que les fourches bloquées au niveau de la barrière *RTS1* ne sont pas cassées. En effet, en absence de Rad52 et donc en absence de réparation de CDBs, on se serait attendu à une augmentation de l'intensité de ce signal s'il correspondait à la fourche cassée. Or, ce n'est clairement pas le cas.

Les limites de chaque technique peuvent être surmontées en les utilisant conjointement pour l'analyse de la réversion de fourche. L'utilisation d'une technique s'affranchissant de l'utilisation d'enzymes de restriction est également possible (voir perspectives expérimentales).

V. Non-disjonction des chromatides sœurs en mitose et instabilité génétique

Une fourche de réplication dysfonctionnelle peut être *a priori* sauvée par l'arrivée de la fourche convergente, si l'arrivée de cette dernière n'est pas altérée. Dans ce travail, nous montrons que ce type de sauvetage dépend de la fonction de protection des fourches par Rad51/Rad52. Les résultats présentés pointent du doigt le fait qu'une fourche de réplication non protégée peut être considérée comme un site fragile potentiellement générateur d'instabilité génétique et d'aneuploïdie.

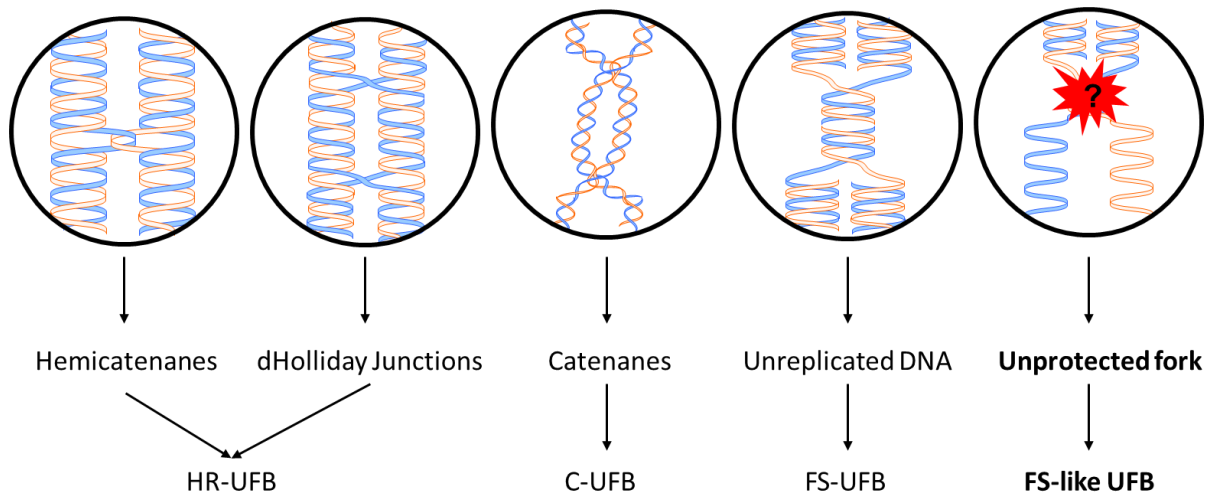


Figure 51 : Comment former des UFBs. Les HR-UFB (UFBs induit par la RH) peuvent être formés à cause d'une non-résolution des intermédiaires de recombinaison. Les UFB centromériques (C-UFB) sont induits suite à des enchevêtrements non covalents entre les chromatides sœurs. Les UFB émanant des CSFs (FS-UFB) sont souvent associés à des régions d'ADN partiellement répliquées. Enfin, nous proposons que les fourches de réplication non protégées sont le siège de terminaison pathologiques à l'origine de la non-disjonction des chromatides sœurs en mitose.

Une phase S inachevée est le meilleur moyen de garder une interconnexion entre les chromatides sœurs. Le lien physique entre chromatides sœurs peut être la conséquence de différents événements (Figure 51). Jusqu'à présent, la persistance de régions d'ADN non répliquées représente la cause la plus évidente pour la génération d'UFBs au niveau des CSFs chez les mammifères (Mankouri et al., 2013). Ici, nous montrons qu'une fourche de réplication non protégée est convertie en un pont anaphasique ressemblant aux FS-UFBs. Nous proposons une nouvelle source génératrice d'UFBs, nommés ici FS-like UFBs (Figure 51,

schéma le plus à droite). Cette catégorie de ponts est générée lorsqu'une fourche convergente tente une fusion avec une fourche de réplication arborant un large excès d'ADN simple brin, ce qui génère une terminaison pathologique de la réplication. En effet, nous montrons que la capacité des facteurs de la RH à protéger les fourches de réplication contre une dégradation excessive est le mécanisme par lequel la RH prévient la formation des défauts mitotiques induits par le stress réplicatif chez *S. pombe*. La question qui reste posée est : pourquoi l'excès d'ADNsb à la fourche empêche la terminaison de la réplication. Plusieurs hypothèses, énumérées ci-dessous, sont possibles :

1- Le modèle de terminaison de la réplication proposé par Dewar et al., implique le passage des CMGs d'une fourche convergente sur l'ADNdb du brin tardif de la fourche opposée (Figure 28) (Dewar et al., 2015). Il est possible que l'excès d'ADNsb à la fourche inhibe l'occurrence de ce processus et crée des défauts de terminaison.

2- L'ADNsb accumulé en excès peut être le siège de transactions moléculaires inopportunes telles que la formation de R-loop. Diverses études montrent que des hybrides ARN:ADN ou R-loop peuvent être formés *de novo* par l'ARN polymérase II au niveau des CDBs (Cohen et al., 2018; Li et al., 2016; Ohle et al., 2016). Chez *S. pombe*, Ohle et al., montrent que des hybrides ARN:ADN sont formés durant la résection des CDBs. Une hypothèse alléchante est qu'en absence de protection des fourches de réplication, l'accumulation d'ADNsb aux fourches favoriserait la formation de R-loop qui obstruerait la progression de la fourche opposée pour terminer la réplication. Toutefois, quelques observations sont en défaveur de cette hypothèse. D'abord la stabilisation des hybrides ARN:ADN altère le recrutement de RPA (Ohle et al., 2016). Or, le mutant *rad52-d* montre une accumulation importante de RPA (Figure 3B publication #1 et Annexe 1). Deuxièmement, la déstabilisation de ces hybrides (*via* la surexpression de la RNase H1) conduit à une dégradation excessive des brins et à un recrutement plus important de RPA au niveau des CDBs (Ohle et al., 2016). Cette situation rappelle ce qui se passe dans le mutant *rad52-d* au niveau du site de blocage de fourche. Tester le rôle potentiel des hybrides ARN:ADN au niveau de la barrière *RTS1* fait partie du projet de thèse d'une doctorante au laboratoire.

Il a été montré récemment que la relocalisation de la chromatine aux pores nucléaires prévient l'accumulation délétère de R-loop chez *S. cerevisiae* (Bermejo et al., 2011; García-Benítez et al., 2017). Un projet porté par un post-doctorant au laboratoire vise à étudier la relocalisation de la barrière *RTS1* à la périphérie nucléaire. Les résultats obtenus jusqu'à présent montrent que la *RTS1*-RFB est relocalisée à la périphérie nucléaire suite à l'induction du blocage. Il s'avère que le mutant *rad52-d* ne montre pas de relocalisation de la RFB à la périphérie. Une spéculation qui peut être faite est qu'en absence de *rad52-d*, des hybrides ARN:ADN se forment et que le défaut de relocalisation de la fourches dysfonctionnelle à la périphérie favorise la persistance de ces hybrides. Toutes ces observations suggèrent, même si c'est de façon spéculative, que la biogenèse d'hybrides ARN:ADN pourrait jouer un rôle au niveau des fourches de réplication bloquées suite à l'activation de la barrière *RTS1*.

Il est à noter que chez les mammifères, BRCA2 prévient l'accumulation des R-loop (Bhatia et al., 2014; Shivji et al., 2018). Cette accumulation semble toutefois se produire indépendamment de la phase S et être indépendante de RAD51 (Bhatia et al., 2014). L'accumulation de γ H2AX en absence de BRCA2 est dépendante de l'activité de RNaseH, ce qui suggère que les R-loop sont une des sources de dommages à l'ADN en absence de BRCA2 (Bhatia et al., 2014). Toutefois, les facteurs de la RH semblent agir en supprimant les R-loop formés et non en prévenant leur formation (García-Rubio et al., 2015; Schwab et al., 2015).

3- Plusieurs facteurs jouent un rôle structural au niveau des fourches de réplication. Par exemple, MRN indépendamment de sa fonction nucléase ainsi que les cohésines sont impliqués dans le maintien de la proximité des chromatides sœurs (Brambati et al., 2018; Tittel-Elmer et al., 2009, 2012). On pourrait imaginer que ces fonctions ne peuvent pas être tenues en présence d'un excès d'ADNsb. Des rôles structuraux de MRX au niveau des fourches bloquées au niveau du rDNA et en réponse à un traitement à l'hydroxyurée ont été identifiés chez *S. cerevisiae* (Sasaki and Kobayashi, 2017; Tittel-Elmer et al., 2009). Une étude récente décrypte le mécanisme par lequel les cohésines capturent les deux chromatides sœurs (Murayama et al., 2018). Cette étude propose une capture en deux temps : d'abord l'ADNdb du brin précoce est capturé puis c'est un ADNsb au niveau du brin tardif qui fait l'objet de la seconde capture. La synthèse du fragment d'Okazaki stabilise la cohésion des deux

chromatides sœurs. Il se trouve que l'établissement de la cohésion entre les chromatides sœurs est perturbé en présence d'un excès de RPA (Murayama et al., 2018). RPA inhibe notamment la seconde capture en séquestrant l'ADNsb. Dans le mutant *rad52-d*, nous proposons que les deux brins néosynthétisés subissent une dégradation extensive (Figure 50B). Il est plausible que l'accumulation de l'ADNsb soit une barrière au maintien de la cohésion des deux chromatides sœurs.

4- L'ADNsb en excès pourrait également adopter des conformations atypiques ou des structures secondaires empêchant l'accès aux topoisomérases. Il a été proposé que des concaténations persistantes durant la transition métaphase/anaphase sont résolues par la topoisomérase II afin de prévenir les non-disjonctions chromosomiques (Germann et al., 2014; Wang, 2002). Une accumulation d'ADNsb et un défaut de cohésion des chromatides sœurs pourraient perturber l'accès de la topoisomérase II afin de résoudre les problèmes de concaténation.

Chez les mammifères, la fréquence des ponts anaphasiques (UFBs et ponts chromatinien) est augmentée en absence de BRCA2 et RAD51 (Lai et al., 2017; Laulier et al., 2011; Wilhelm et al., 2014). Le mécanisme de protection des fourches de réplication est conservé entre *S. pombe* et les mammifères. Il n'est donc pas exclu que les cellules déficientes pour BRCA2/RAD51 souffrent de terminaison pathologique à cause de l'accumulation d'ADNsb. La caractérisation des UFBs inhérents à un déficit en BRCA2/RAD51 permettra de définir leur origine.

Bien qu'ils ressemblent tous à un fil tendu entre deux noyaux, la structure moléculaire des UFBs diffère en fonction de leur origine (Figure 51). Les travaux menés durant ma thèse montrent que les fourches non protégées sont une source génératrice d'UFBs à la fois composés d'ADNsb et db. En effet, les ponts induits en absence de Rad52 émanent du site de blocage de fourche où l'ADNsb s'accumule de façon exagérée et sont recouverts d'un côté par RPA (Figure 4C et F et S4 publication #1). Les UFBs décrits chez les mammifères (FS-UFB et HR-UFB) sont également positivement marqués par RPA. Ces UFBs sont considérés comme étant préliminairement composé d'ADNdb étiré. Ce n'est qu'au cours de leur résolution,

notamment *via* l'intervention d'hélicases telles BLM et PICH, que l'ADNsb est formé et recouvert par RPA (Chan et al., 2007, 2009, 2018; Naim and Rosselli, 2009). La nouvelle voie de formation des UFBs décrite ici suggère que l'origine de l'ADNsb sur les UFBs diffère en fonction de la structure d'ADN maintenant le lien entre les chromatides sœurs (ADN partiellement répliqué pour les FS-UFB et fourches non protégées pour les FS-like UFBs). Chez *S. cerevisiae*, les cellules déficientes pour la RH montrent une augmentation de la fréquence des UFBs en réponse au MMS (la protéine Dpb11^{TopBP1} est utilisée pour détecter ces ponts) (Germann et al., 2014). Il est possible que ces UFBs émanent des sites de blocage de fourches non protégées. Germann et al., proposent que Dpb11^{TopBP1} facilite la ségrégation des chromosomes *via* l'extension et la stabilisation des UFBs, ce qui faciliterait le recrutement de la topoisomérase II. Cela pourrait expliquer pourquoi les FS-like UFBs formés dans le mutant *rad52-d* ont tendance à persister (Figure 2 publication #1). Une prédiction qui pourrait être faite, est que la survie des cellules *rad52-d* en réponse au blocage de fourche dépend de l'homologue de TopBP1 chez *S. pombe*, Cut5/Rad4.

VI. Rad51/Rad52 : les gardiens de la stabilité des fourches et du génome

Comme déjà mentionné avant, l'absence de protection des fourches de réplication par Rad52/Rad51 se traduit par la formation de défauts mitotiques. Ces défauts incluent, en plus des ponts anaphasiques (discutés plus haut), des défauts de ségrégation du *locus* contenant le site de blocage de fourche (Figure 1B publication #1). Contrairement aux ponts anaphasiques, ces défauts de ségrégation sont diminués mais pas complètement supprimés en absence de la dégradation des brins naissants (*rad52-d exo1-d*) (Figure 5A publication #1). Cela suggère que les fourches de réplication restent, d'une certaine façon, instables lorsque le filament Rad51 n'est pas formé. En effet, le mutant Rad51-3A ne montre pas de défauts de ségrégation en réponse à l'induction de la barrière (Figure 6E publication #1). Ainsi, on peut proposer que le chargement de Rad51 est nécessaire pour stabiliser complètement la fourche de réplication, par exemple en promouvant la réversion de fourche. Pour rappel, la réversion de fourche n'est pas détectée dans le double mutant *rad52-d exo1-d*. La dépendance génétique de la réversion de fourches doit être testée dans le mutant nul *rad51-d* et dans le

mutant *rad51-3A*. L'hypothèse présentée ici sera confirmée : (i) si jamais la réversion de fourche est dépendante de Rad51 et (ii) si la réversion est toujours observée en présence du mutant Rad51-3A. Une autre hypothèse pouvant expliquer la persistance des certains défauts de ségrégation dans le mutant *rad52-d exo1-d* est le fait que Rad52 puisse être impliquée dans d'autres processus indépendants de Rad51 et même de la RH. Par exemple, il a été récemment montré chez *S. cerevisiae* que les cellules portant une délétion de *RAD52* montrent des défauts de ségrégation des chromosomes dus à une dérégulation du SAC (pour *Spindle Assembly Checkpoint*). Ces défauts ne sont pas observés dans les cellules déficientes pour Rad51 (*RAD51Δ*) (Lim and Huh, 2017). On peut imaginer que des défauts de ségrégation puissent être amplifiés en présence du blocage de fourche et d'un défaut du SAC.

L'instabilité des fourches de réplication en absence de protection par Rad52/Rad51 se traduit par une accumulation de mutations en amont du site de blocage de fourches (Figure 5B et C publication #1). Ces mutations sont dues à l'exposition de l'ADNsb à la fourche étant donné qu'elles sont supprimées en absence de Exo1. Cela signifie que même recouvert par RPA, l'ADNsb reste vulnérable et sujet aux mutations. Il est à noter que le simple mutant *exo1-d* présente un taux basal de mutations plus important que dans les cellules sauvages. Cela est en accord avec son rôle dans le MMR (Szankasi and Smith, 1995). Intuitivement, on se serait attendu à un effet additif en ce qui concerne le taux basal de mutations dans le double mutant *rad52-d exo1-d* par rapport au simple mutant *rad52-d*. Or, ce n'est pas le cas. Cela montre encore une fois que les cellules déficientes pour Rad52 souffrent d'une activité non contrôlée de Exo1.

Il a été montré chez *S. cerevisiae* que l'ADNsb généré au niveau des CDBs ou des fourches de réplication peut être ciblé par les cytosines déaminases APOBEC (pour *apolipoprotein B mRNA-editing enzyme catalytic polypeptide-like*) (Roberts et al., 2012). Ce phénomène pourrait donc être amplifié au niveau des fourches de réplication dysfonctionnelles non protégées. Aucune signature mutationnelle particulière n'a été observée (résultat non présenté). On peut toutefois imaginer que parmi les nombreux sites de pauses potentiels dans le génome, l'accumulation d'ADNsb en absence de Rad52/Rad51 potentialise la génération de mutations de façon regroupées (*clustered mutations*). Il se

trouve qu'une accumulation spontanée d'ADNsb en absence de Rad52 manifestée par la formation de multiples foyers RPA a été observée ([Annexe 2](#)). Il s'avère que certains de ces foyers sont l'œuvre de Exo1 étant donné que le double mutant *rad52-d exo1-d* présente une diminution du nombre de foyers surnuméraires. Un CHIP-Seq de RPA permettra d'identifier ces sites de pause dans le mutant *rad52-d* mais aussi de voir si ces sites corrélerent avec un taux de mutations plus élevé.

Parce qu'une seule CDB non réparée peut être létale en absence de Rad52 en méiose chez les levures ([Octobre et al., 2008](#); [Weiffenbach and Haber, 1981](#)), nous proposons ici qu'en mitose une seule fourche de réplication non protégée est une source de létalité. En effet, l'accumulation d'ADNsb et sa conversion en un pont anaphasique a pour conséquence ultime une baisse de la viabilité dans le mutant *rad52-d* (Figure 5D publication #1). Cela pourrait être dû à une accumulation de dommages non réparables suite à la rupture des ponts anaphasiques. Une partie des ponts observés dans le mutant *rad52-d* persiste jusqu'à la cytotodiérèse. Une étude montre qu'une cytotodiérèse se produisant avant la ségrégation complète des chromosomes peut induire une létalité due à la formation de dommages ([Baxter and Diffley, 2008](#)), ce qui pourrait expliquer la perte de viabilité observée dans le mutant *rad52-d*. De même, les ponts anaphasiques résolus avant la cytotodiérèse peuvent avoir un impact sur la viabilité des cellules si jamais ils sont mal résolus ou cassés. Ajouté à cela, plusieurs études suggèrent qu'un défaut de résolution des ponts anaphasiques peut conduire à la formation de micronoyaux ([Chan et al., 2009](#); [Hengeveld et al., 2015](#); [Naim and Rosselli, 2009](#); [Sabatinos et al., 2015](#)). De plus, les cellules déficientes pour BRCA2 sont connues pour accumuler des dommages dans les cellules en G1 ([Feng and Jasin, 2017](#); [Gelot et al., 2015](#)). Cela se traduit par une accumulation de foyers 53BP1.

Ainsi, les causes de mortalité des cellules déficientes pour la RH (Rad52 chez *S. pombe* et BRCA2 chez les mammifères) sont multiples. Nous montrons ici que ces causes peuvent être supprimées lorsque les fourches de réplication sont protégées.

VII. Perspectives expérimentales

Dans ce travail, nous avons mis en évidence, au niveau moléculaire et en terme de mécanisme, l'importance de la protection des fourches de réplication par Rad52/Rad51 dans la prévention des défauts mitotiques induits par un blocage de fourche. Cette fonction de protection est indépendante de la réparation et du redémarrage des fourches de réplication par la RH. Nous montrons ici l'implication de Exo1 dans la formation des défauts mitotiques en absence de Rad52/Rad51 chez *S. pombe*.

Le mécanisme décrit ici pourrait représenter un des mécanismes sous-tendant la formation des ponts anaphasiques observés dans les cellules déficientes pour BRCA2. Bien que MRE11 et EXO1 aient été impliquées dans la dégradation excessive des fourches de réplication en absence de BRCA2 (Lemaçon et al., 2017; Schlacher et al., 2011), la contribution de ces nucléases dans la formation des ponts anaphasiques n'a pas encore été testée.

Les résultats obtenus suggèrent fortement que Rad52/Rad51 promeuvent la réversion de fourche au niveau de la barrière *RTS1*. Sur le bras réversé, Ku se fixe afin de coordonner la résection en deux étapes de la fourche avant d'amorcer leur redémarrage. Le modèle décrit dans la [Figure 50A](#) pourra être mieux étayé en définissant la dépendance génétique de la réversion de fourche. Les candidats les plus évidents à tester sont : Rad51, Rad5^{HTLF}, Fbh1, Rad54, Fm1^{FANCM} et Rqh1^{BLM} (les homologues de ces protéines chez les mammifères sont décrits pour promouvoir la réversion de fourche *in vivo* et/ou *in vitro*). Si le modèle proposé est correct, on s'attendrait à ce que : (i) un mutant montrant un défaut de réversion de fourche présente le même phénotype qu'en absence de Ku, où les fourches de réplication s'affranchissent du besoin en Rad50 et Ctp1 pour initier la résection et redémarrer les fourches de réplication, (ii) la réversion de fourche ne soit pas dépendante de Rqh1 étant donné que le mutant *rqh1-d* ne présente ni de défaut de résection ni de défaut de redémarrage (Figure 1 publication #2) ; (iii) le recrutement de Ku au niveau de *RTS1*-RFB soit dépendant des protéines impliquées dans la réversion de fourche. Ce dernier point peut être tester par immuno-précipitation de Ku-HA associée à la barrière *RTS1* dans les différents fonds génétiques où la réversion de fourche n'a pas lieu.

Les techniques mises au point pour étudier la réversion de fourche sont assez robustes pour détecter la présence de la fourche réversée (2DGE) ou du bras réversé (gel en une dimension) mais présente des limites techniques quant à la quantification du phénomène. Une technique permettant une lecture plus quantifiable de la réversion de fourche sera mise au point. Cette technique, développée par (Kolinjivadi et al., 2017) repose sur l'immuno-précipitation de l'analogue de base BrdU incorporé au niveau des brins naissants. L'idée étant que, suite à la réversion de fourche, l'appariement des brins néosynthétisés permettra l'exposition d'un court fragment d'ADNsb BrdU positif. Le pontage de l'ADNdb permettra à l'anticorps anti-BrdU de ne cibler que les régions présentant une extrémité d'ADNsb retrouvé dans le contexte du bras réversé (Kolinjivadi et al., 2017). Il est à noter que le principe de cette technique permet de détecter également le bras cassé d'une fourche de réplication non réversé et sur lequel le brin parental a commencé à être dégradé. Cependant, le système utilisé, *RTS1*-RFB, offre l'avantage de ne pas présenter de cassure suite à l'induction de la RFB, ce qui rend l'utilisation de la technique décrite ci-dessus justifiable.

VIII. Conclusion

Le stress répliatif fait, en quelque sorte, partie intégrante de la vie des cellules étant donné que les obstacles à la progression des fourches de réplication sont naturels et inévitables. Toutefois, les cellules qui ne viennent pas à bout du stress voient leur probabilité de développer de l'instabilité génétique vertigineusement augmentée.

Une pléthore de protéines est impliquée dans la protection, le redémarrage et la réparation des fourches de réplication. L'absence d'un de ces facteurs peut avoir des conséquences néfastes quant à la stabilité du génome. Les travaux menés ici et les différentes études citées montrent que, souvent, l'absence d'une de ces protéines fait qu'une autre se comporte comme un parasite moléculaire. Ainsi, plusieurs facteurs intervenant dans la prise en charge des fourches de réplication sont potentiellement générateurs d'instabilité génomique en fonction du fond génétique dans lequel ils opèrent. L'exemple qui est devenu maintenant le plus évident concerne les nucléases (telles que Exo1) qui deviennent une arme fatale lorsque les fourches de réplication ne sont pas protégées (par Rad52/Rad51). Un autre

exemple illustré ici, concerne le rôle de Ku dans la prise en charge des fourches de réplication dysfonctionnelles. Ku coordonne la résection en deux étapes de la RH et optimise le redémarrage des fourches. Par contre, en l'absence de MRN et Ctp1, la fixation de Ku devient toxique pour les cellules. Cela affecte la viabilité des cellules dépourvues de Rad50 et Ctp1 (Teixeira-Silva et al., 2017). Même la fixation de Rad51, qui protège la fourche de réplication, peut créer des problèmes si Rad51 n'est pas évincée ou correctement régulée (Doe and Whitby, 2004; Dugrawala et al., 2017; Di Marco et al., 2017). Ainsi, la dérégulation d'un seul facteur impliqué dans le métabolisme des fourches de réplication peut avoir des conséquences très dommageables vis à vis de la stabilité du génome.

En réponse à un stress réplcatif, les cellules « normales » sont adaptées pour trouver un équilibre entre : (i) protéger pour fusionner avec la fourche convergente et (ii) dégrader de façon contrôlée pour redémarrer ; le tout chapoter par la réversion pour mieux coordonner ces deux processus.

L'étude de la protection des fourches de réplication reste une zone de recherche active. La découverte récente que le développement de résistances à des traitements anti-tumoraux par les cellules déficientes en BRCA2 implique la restauration de la protection des fourches de réplication (sans restaurer la capacité des cellules à promouvoir la RH dépendante de RAD51) (Ray Chaudhuri et al., 2016). Cela montre que la découverte des mécanismes détaillés contrôlant la protection des fourches de réplication est cruciale pour la compréhension des mécanismes de développement et de résistances tumorales et l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques.

Matériel et Méthodes

I. Souches et milieux.

Pour les cultures liquides, les cellules sont mises en culture dans YE (pour *Yeast Extract*, DIFCO) ou dans de l'EMM-G (pour *Edinburg Minimum Media L-Glutamate*, MP Biomedicals). Les milieux sont supplémentés, sauf exception, avec les bases et acides aminés suivants : adénine hydrochloride hemihydrate (TCI A0150), L-histidine monohydrochloride monohydrate (Sigma Aldrich H8125), L-leucine (Sigma Aldrich L8000), L-arginine monohydrochloride (Sigma Aldrich A5131), and uracile (Sigma Aldrich U0750). Les milieux sont également supplémentés avec du L-tryptophane (Sigma Aldrich T0254) lorsque les souches utilisées sont auxotrophes pour le tryptophane. Le pH de l'uracile et du tryptophane est ajusté à 12,5 et les solutions sont gardées à l'abri de la lumière à 4°C. Une solution stock à 1,25% de chacun des acide aminés/bases est préparée. Ces acides aminés/bases sont ajoutés individuellement aux milieux de culture pour avoir une concentration finale de 0,0125%.

Les milieux solides YE et EMM-G supplémentés en bases et acides aminés sont préparés avec 2% d'agar. Pour la sélection des phénotypes en fonction des résistances des souches d'intérêt à des antibiotiques, le milieu YE-agar est supplémenté avec 200mg/ml de l'antibiotique désiré : G418- (kanamycine, Kan, ANT-GN-5, Invivogen), nourseothricine (Nat, ClonNat, Werner BioAgents), and hygromycine (Hygro, ANT-HG-5, Invivogen).

1. Induction de la barrière *RTS1*

Les souches contenant la barrière *RTS1* (*RTS1*-RFB) et Rtf1 sous le contrôle du promoteur *nmt41* sont maintenues en YE complet (contenant naturellement de la thiamine). Pour les expériences où la RFB doit être induite, les cellules sont mises en culture dans de l'EMM-G supplémenté contenant 60µM de thiamine pour réprimer l'expression de Rtf1. Pour induire la RFB, les cellules sont lavées deux fois à l'eau et mises en culture dans un milieu EMM-G supplémenté contenant (*rtf1* réprimé, RFB OFF) ou non (*rtf1* exprimé, RFB ON) de la thiamine. Les expériences sont effectuées 24h (ou 48h) après l'induction de la RFB. La protéine Rtf1

étant à son maximum d'expression 16 heures après élimination de la thiamine, il est estimé que la barrière *RTS1* est active durant 2-3 générations.

2. Souches

Les génotypes des souches utilisées durant ces travaux sont indiqués dans les tableaux présentés dans la section Résultats (Tableau S1 dans publication #1 et Supplemental table 1 dans publication #2). Les souches sont construites en utilisant les méthodes classiques et moléculaires pour le croisement des souches et leur transformation (pour intégrer ou déléter un gène) (Murray et al., 2016).

3. Croisements de souches

Deux souches avec un type sexuel différent (h+ et h-/h-smt0) sont mélangées sur un milieu de sporulation (SPA). Après une incubation de 2 à 4 jours à 25°C, les tétrades sont séparées en utilisant un micromanipulateur (Singer), on parle de dissection. La dissection permet de suivre la ségrégation des marqueurs utilisés suite à l'analyse de tétrades. Alternativement, les spores peuvent être libérés en incubant les produits du croisement dans de la glusulase (NEE-154) à 100U/ml durant 3 à 5 jours. Les spores sont résistantes à la glusulase et peuvent être alors étalées sur le milieu approprié. Les colonies obtenues sont sous-clonées et celles présentant le génotype d'intérêt sont stockées à -80°C dans du YE-glycérol 50%.

II. Transformation

La transformation des cellules avec un ADN exogène permet de remplacer (créer un mutant nul) un gène ou de l'associer à un autre codant une étiquette reconnaissable par un anticorps ou par fluorescence. Pour cela, le fragment d'ADN correspondant le plus souvent à un produit PCR doit être flanqué de 100pb homologues aux régions flanquant le fragment à cibler dans le génome. Afin de générer des délétions de gènes par une cassette KanMX6, NatMX6, ou HphMX6, les PCR sont effectuées à partir des plasmides pFA6a-kanMX6, pFA6a-

natMX6, et pFA6a-hphMX6, respectivement (Bähler et al., 1998; Hentges et al., 2005). Les amorces utilisées correspondent, de 5' à 3', au 100pb d'homologie suivies de 20pb des amorces de Bähler. L'intégration d'un fragment d'ADN dans le génome de *S. pombe* suit trois étapes : (i) perméabilisation de la paroi et de la membrane cellulaire, (ii) incubation des cellules compétentes avec le fragment d'ADN, et (iii) sélection des transformants sur le milieu sélectif approprié.

2.10⁸ cellules sont nécessaires pour une transformation. Des cultures de 100ml dans du YE sont préparées. Un volume correspondant à 2.10⁸ cellules est prélevé et les cellules sont culotées puis lavées avec le même volume d'eau. Les culots cellulaires sont repris dans 1ml d'eau puis dans 1ml de LiAc-TE 1X (0,1M lithium acetate pH 7,5 et tris-EDTA 10mM Tris-HCl 1mM EDTA pH7,5). Après centrifugation les cellules sont suspendues dans 100µl de LiAc-TE 1X pour avoir 2.10⁹cellules/mL par tube de transformation. Les cellules sont incubées pendant 10 minutes avec 1µg d'ADN correspondant au fragment d'intérêt (purifié) et 10µl de DNA Carrier (herring sperm DNA, Invitrogen) à 10mg/ml. 260µL de PEG 40%/LiAc-TE sont ajoutés avant d'incuber les cellules à 30°C pendant au moins une heure (Pour augmenter l'efficacité de la transformation, augmenter le temps d'incubation à 2-3heures). 43 µL de DMSO sont ensuite ajoutés et un choc thermique, à 42°C pendant 5 minutes, est effectué. Une centrifugation douce est effectuée pour récupérer les cellules (2 000 rpm ; 5 min) sans trop les fragiliser. Les culots sont lavés dans 1 mL de YE complet puis les cellules sont resuspendues dans 600µl de YE-complet. Les cellules sont étalées sur un milieu non sélectif (YE-complet). Après 24-48h à 30°C, les tapis cellulaires recouvrant les boîtes YE-complet sont répliqués sur un milieu sélectif. Les colonies obtenues sont sous-clonées sur le milieu sélectif et les colonies isolées sont testées par PCR afin de vérifier l'intégration.

III. Gels d'ADN bidimensionnels, 2DGE

La technique des gels d'ADN bidimensionnels ou 2DGE a été initialement développée pour distinguer les fragments d'ADN linéaires des molécules non-linéaire (*X-shaped* ou structure à quatre branches) (Bell and Byers, 1983). Après quelques ajustements, cette technique s'est

avérée être une méthode très robuste pour étudier la réplication de l'ADN, sa réparation et la recombinaison et ce, aussi bien chez les procaryotes que chez les eucaryotes, à partir d'un ADN génomique ou de plasmides. Par exemple, les 2DGE sont très utilisés pour étudier l'initiation de la réplication et analyser la formation comme la résolution des blocages de fourches (Brewer and Fangman, 1988; Pohlhaus and Kreuzer, 2006). Cette technique fut notamment utilisée pour cartographier les origines de réplication chez les eucaryotes et surtout chez *S. cerevisiae* (van Brabant et al., 1998; Brewer and Fangman, 1991). La détection des fourches bloquées par 2DGE est évidente lorsque la nature du blocage cible un *locus* bien défini.

Lors de la première dimension, les molécules d'ADN sont volontairement séparées dans des conditions où (i) le gel d'agarose est faiblement concentré (0,35-0,4%) et (ii) la migration s'effectue à faible voltage (50V). Cela permet de séparer les molécules d'ADN selon leur masse. Durant la seconde dimension, la migration s'effectue (i) en utilisant un gel d'agarose plus concentré (0,9-1%) en présence de bromure d'éthidium (BET) et (ii) avec un fort voltage (200V). Les cuves d'électrophorèse utilisée lors de la seconde dimension permettent de circulariser le tampon de migration. La présence de BET influence fortement la mobilité des molécules d'ADN, d'une façon telle que la migration des fragments non-linéaires (*i.e* branchés) est fortement gouvernée par leur structure (Figure ci-dessous) (Brewer et al., 1992).

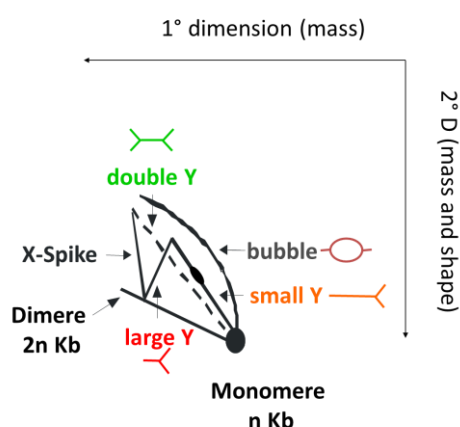


Figure 52 : Interprétation des signaux obtenus suite à l'analyse des intermédiaires de réplication par 2DGE. Pour revue, voir Schwartzman et al., 2012 qui présente une interprétation détaillée des signaux obtenus ainsi que des vidéos illustratives.

L'ADN génomique peut être extrait de différentes façons. Dans les travaux présentés dans ce manuscrit, les ADN génomiques sont inclus dans des plugs d'agarose pour maintenir le plus

possible l'intégrité des intermédiaires de réplication (voir plus bas la procédure). De plus, pour « figer » les intermédiaires de réplication les cellules sont traitées au TMP (triméthyl psoralène) avant de procéder à l'étape de sphéroplastisation. Le TMP s'intercale au niveau de l'ADNdb et forme un mono-adduit. Un pontage inter-brin est provoqué suite à une exposition aux UV-A (365nm). L'intercalation du TMP cible les bases A:T et diminue l'efficacité de digestion par les enzymes de restriction lors ce que le site de restriction contient ces bases. Il en résulte souvent des digestions partielles.

1. Préparation des échantillons d'ADN:

Environ 2.10^9 cellules en phase exponentielle de croissance sont lavées à l'eau et resuspendues dans 20 ml d'eau. Le TMP (resuspendu dans de l'éthanol) est ajouté à une concentration finale de 0,2mg/ml. Les cellules sont placées dans une boîte de pétri en verre, déposées sur de la glace, et exposées à une dose de 45kJ/m^2 d'UV-A (365nm, 90 secondes à un débit de $0,5\text{kJ/m}^2/\text{s}$). Ce traitement permet de ponter l'ADN et de figer les intermédiaires de réplication. Après centrifugation et resuspension des culots dans du tampon SP1 (1,2M sorbitol, 50mM citrate phosphate, 40mM EDTA, pH5,6), la paroi des cellules est digérée par la zymolyase (50 $\mu\text{g/ml}$ Zymolyase[®]100T, amsbio) et du « lysing enzyme » (62,5 $\mu\text{g/ml}$, sigma) à 37°C pendant 15 minutes. Après centrifugation, les sphéroplastés sont inclus dans des plugs d'agarose « low melting » à 0,5% (Incert Agarose, Lonza) à une densité de $1,5.10^8$ cellules/plug de 120 μl . Les plugs sont mis dans le tampon de digestion DB (1% lauryl-sarcosine, 1mg/ml protéinase K, 25mM EDTA pH 8) et incubé à 50°C sur la nuit. Après 4 lavages d'environ 1 heure chacun dans du TE 50X à 4°C et 1 lavage à 55°C avec le même tampon (50mM EDTA pH 8, 10mM Tris-HCl pH 7,5), les plugs sont conservés à 4°C.

2. Digestion de l'ADN par les enzymes de restriction :

Les plugs sont lavés 4 fois pendant 1 heure dans du TE 1X (1mM EDTA pH8, 10mM Tris-HCl pH 7,5), puis pendant 1 heure dans le tampon de restriction 2X (NEBbuffer 3, Biolabs), puis 1 heure dans le tampon de restriction 1X. Les plugs sont ensuite incubés dans le tampon de

restriction 1X en présence de l'enzyme *Asel* (60 unités d'enzyme/plug dans un volume de 100 µl/plug) pour la nuit à 37°C. Le lendemain, la même quantité d'enzyme *Asel* est ajoutée pour 3h à 37°C. L'agarose « *low melting* » est ensuite digéré par ajout de β-agarase (2 unités/plug) en présence de RNase A (20µg/plug). L'ADN est récupéré par centrifugation (surnageant, 14000rpm, 2 min à 4°C) et la concentration en sel est ajustée à 300mM de NaCl.

3. Enrichissement des intermédiaires de réplication

3.1. Sur des colonnes de BND-Cellulose

2g de BND-cellulose (pour, *Benzoylated Naphthoylated DEAE-Cellulose, Sigma, B6385*) sont dissous dans 15ml de tampon Eq (300mM NaCl, 10mM Tris-HCl, pH 7,5, 1mM EDTA) pendant au moins 4 heures, sous agitation. La solution est répartie de façon égale dans des colonnes de chromatographie Poly-Prep (Biorad), et lavée trois fois avec 1ml de tampon Eq. Les échantillons d'ADN sont déposés sur les colonnes de BND-cellulose. La majorité de l'ADN double-brin est éluée par ajout de 3ml de tampon DS (0,8M NaCl, 10mM Tris-HCl pH 7,5, 1mM EDTA) : l'ADN est récupéré en 3 fractions (0,5 ml; 2ml et 0.5ml). L'ADN contenant des régions simple brin, caractéristiques des intermédiaires de réplication, est élué par ajout de 3ml de tampon SS (1M NaCl, 10mM Tris-HCl pH 7,5, 1mM EDTA, 1,8% (w/v) caféine): L'ADN est récupéré en 4 fractions (0.5 ml, 2X 1 ml et 0.5 ml). Un aliquot de 20µl est prélevé à chaque fraction et déposé sur gel d'agarose afin d'identifier les fractions contenant l'ADN enrichi en simple brin. Celles-ci sont précipitées en présence de 0,2 mg/ml de glycogène, de 1,66M KAc et 1 volume d'isopropanol pendant 1 heure sur la glace. Après centrifugation et séchage des culots, l'ADN est re-suspendu dans 10 µL de tampon TEN (10mM NaCl, 10mM Tris-HCl pH 7,5, 0,1mM EDTA).

3.2. Sur des colonnes Qiagen Tip20

Les colonnes Qiagen Tip 20 (10223) sont équilibrées avec 1ml de tampon QBT (750 mM NaCl; 15–25°C, 50 mM MOPS pH 7,0 15% isopropanol (v/v), 0,15% TritonR X-100 (v/v)) puis

lavées avec 3x 1ml avec la solution WB1 (pour *washing buffer 1*, 1M NaCl 10mM Tris-HCl pH8). Les colonnes sont équilibrées avec 3x 1ml du tampon d'équilibration (300mM NaCl 10mM Tris-HCl pH8). Après avoir ajusté la concentration en sel des échantillons d'ADN est ajustée à 300mM NaCl 10mM Tris-HCl pH8, les échantillons sont déposés sur les colonnes. Après écoulement gravitaire, l'ADN retenu au niveau de la résine est lavé avec 3x 1ml de la solution WB2 (0,8M NaCl 10mM Tris-HCl pH8) (correspond aux fractions DS). Les ADN sont alors élués avec 4x 0,6ml de la solution d'éluion (1M NaCl 10mM Tris-HCl pH8 0,9% caféine) (correspond aux fraction SS). Pour chaque fraction récupérée, un aliquote de 20 μ l est récupéré pour déposer sur gel et voir les profils d'éluions. La précipitation de l'ADN s'effectue avec 0,2 mg/ml de glycogène, 1,66M KAc et 1 volume d'isopropanol. Après centrifugation et séchage des culots, l'ADN est re-suspendu dans 10 μ L de tampon TEN (10mM NaCl, 10mM Tris-HCl pH 7,5 0,1mM EDTA). Les différentes fractions contenant les ADN élués avec la solution d'éluion sont rassemblées et 4 μ l de tampon de charge 20X sont ajoutés.

4. Séparation des intermédiaires de réplication par gel d'ADN bidimensionnel (neutre/neutre)

Les échantillons sont séparés sur gel d'agarose 0,35% sans BEt (première dimension, séparation des molécules d'ADN selon leur masse) pendant 24 heures à 2,5V/cm. Après coloration au BET, les échantillons sont séparés sur gel d'agarose 0,9% (deuxième dimension, séparation des molécules d'ADN selon leur structure) en présence de BEt pendant 9 heures à 200V à 4°C. Les échantillons d'ADN résolus par ces deux électrophorèses successives sont ensuite transférés sur une membrane de nylon afin de réaliser un *Southern blot*. Les gels contenant des ADNs traités au TMP doivent d'abord être exposés aux UV-C afin de réverser le pontage au TMP et permettre le transfert des molécules d'ADN. Pour cela, les gels reçoivent une dose de 5,555 kJ/m² d'UV-C (254nm) (0,925 mw/cm² pendant 10 minutes). Le transfert est effectué comme suit : les gels d'agarose sont trempés dans un bain acide (HCl 0,25N, dépurination) pendant 15 minutes, puis dans un bain basique (0,5M NaOH, 1,5M NaCl, dénaturation) pendant 20 minutes et enfin dans un bain de 1M Tris, 1,5M NaCl, pH 7,4 (neutralisation) pendant 20 minutes. L'ADN est ensuite transféré sur une membrane de nylon

(GeneSreen Plus® Hybridization, Perkin Elmer, NEF988001PK) par capillarité en présence de SSC 10X.

5. Séparation des intermédiaires de réplication par gel d'ADN bidimensionnel en conditions dénaturantes (neutre/alcalin)

Ici, les ADNs génomiques ne sont pas traités au TMP. La migration selon la première dimension est la même que celle décrite ci-dessus. Il en va de même pour la préparation du gel de la seconde dimension à la différence que le gel est préparé dans de l'eau et non dans du TBE. Une encoche est formée pour y déposer le marqueur de poids moléculaire préparé dans un tampon de charge contenant 0,8mg/ml de vert de bromocrésol (plus stable que le bleu de bromophénol) et 24mg/ml de Ficoll. Les gels à 0,9% d'agarose sont incubés dans deux bains consécutifs de NaOH : les gels sont trempés dans la solution 1 (250mM NaOH 5mM EDTA pH8) pendant 30 minutes puis dans la solution 2 (50mM NaOH 1mM EDTA pH8) pendant 30 autres minutes. La migration s'effectue dans la solution 2 en présence de BEt à 4°C (70-80V pendant 15 à 20 heures). La migration est suivie en fonction de la migration du bleu de charge. Pour un fragment à 2kb, arrêter la migration lorsque le bleu est à 3cm du bas du gel.

6. Détection du bras réversé

Les ADNs génomiques, leur traitement et leur migration selon la première dimension sont identiques à ce qui a été mentionné précédemment. Après migration, les gels à 0,35% sont colorés au BEt et subissent une réversion de pontage aux UV-C avant le transfert. Les gels sont traités avec un bain de HCl à 0,25N pendant 15 minutes puis avec un bain de NaOH à 0,5N. Le transfert s'effectue avec une machine à vide dans du NaOH à 0,5N pendant 1h50 à 50mBar.

Différentes constructions ont été utilisées pour analyser des tailles de fragments différentes (Figure ci-dessous).

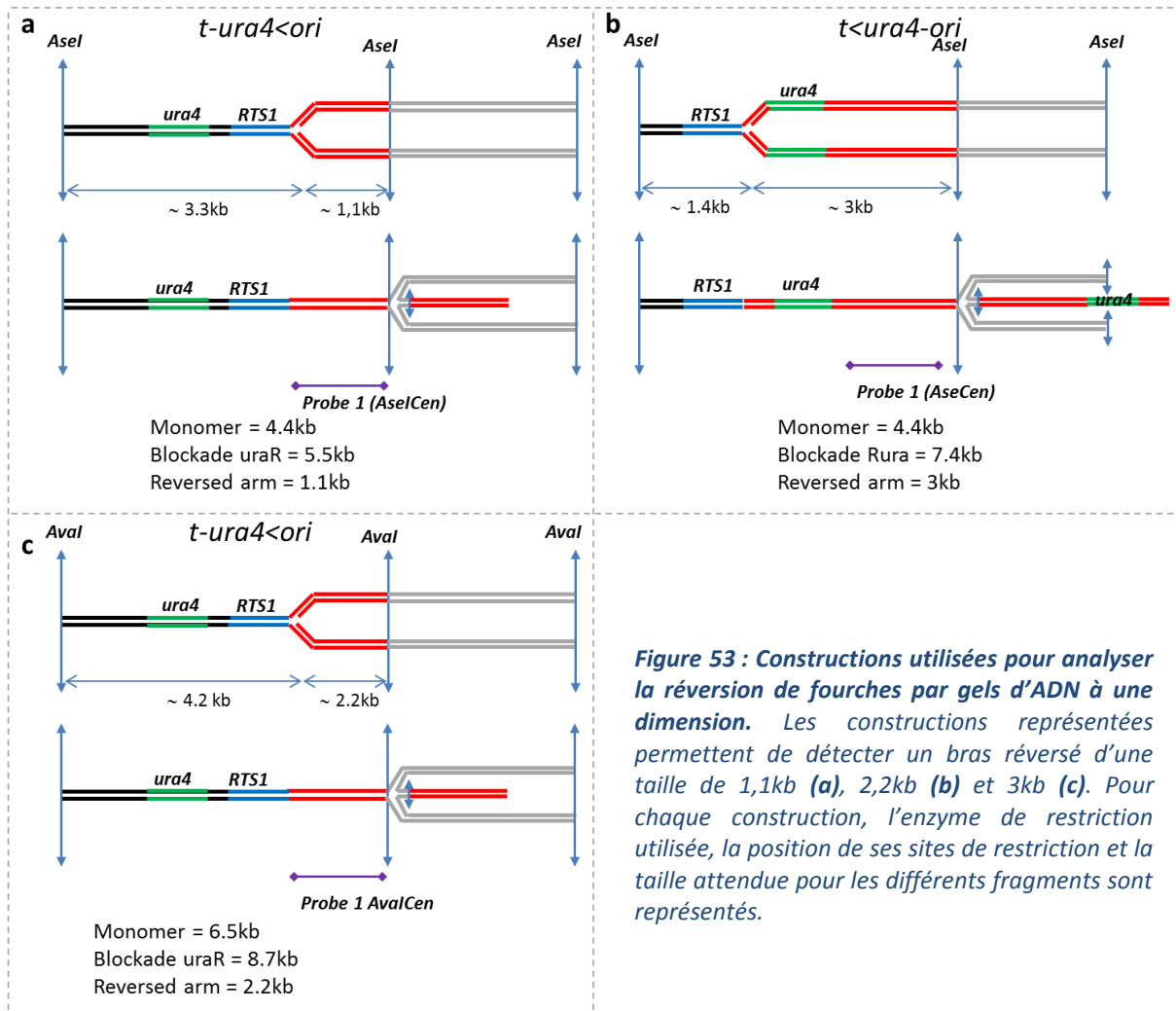


Figure 53 : Constructions utilisées pour analyser la réversion de fourches par gels d'ADN à une dimension. Les constructions représentées permettent de détecter un bras réversé d'une taille de 1,1kb (a), 2,2kb (b) et 3kb (c). Pour chaque construction, l'enzyme de restriction utilisée, la position de ses sites de restriction et la taille attendue pour les différents fragments sont représentés.

IV. Analyse de l'ADNsb par qPCR

Cette technique repose sur le fait que l'ADNsb est réfractaire à une digestion enzymatique. Des régions d'ADN génomique soumises à une digestion enzymatique (par une enzyme dont le site de restriction est présent sur la région ciblée). Après digestion, ces régions peuvent être amplifiées par qPCR que si elles n'ont pas été clivées car composées d'ADNsb. De ce fait, les couples d'amorces utilisés amplifient une courte région flanquant le site de restriction.

Environ 2.10^8 cellules en phase exponentielle de croissance sont re-suspendues dans 500µl de tampon d'extraction d'ADN génomique (2% Triton X100, 1% SDS, 100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA). Après l'ajout de 500 µl de Phenol:Chloroform:Isoamylalcohol (25:24:1, UltraPure™, invitrogen™) et d'environ un capuchon de tube eppendorf de billes de verre (425-600µm, Sigma®), les cellules sont broyées par vortex pendant 5 minutes (5 cycles : 1 minute de vortex + 1 minute dans la glace). Les lysats sont ensuite centrifugés (14000rpm 15min) et la phase aqueuse supérieure est récupérée. Les échantillons sont ensuite traités avec 0,5mg/mL de RNase A pour éliminer les ARN (incubation 1 heure à 37°C). La préparation d'ADN se poursuit par une extraction au Phenol:Chloroform:Isoamylalcohol et deux extractions au chloroforme (volume/volume). Environ 5µg d'ADN génomique sont digérés par l'enzyme de restriction *MseI* (tampon cutsmart 1x, 100U *MseI*, incubation à 37°C sur la nuit). La même quantité d'ADN génomique est incubée dans les mêmes conditions, mais sans l'enzyme. Après digestion sur la nuit, un aliquot est déposé sur gel d'agarose afin de vérifier la qualité de la digestion enzymatique. Environ 60ng d'ADN digéré et non digéré sont amplifiés par qPCR. Chaque réaction de qPCR est effectuée en duplicat. La réaction de qPCR est réalisée en utilisant le réactif iQ SYBR Green Supermix (Biorad), conformément aux recommandations du fabricant, et effectuée en utilisant un thermocycleur (C1000™ Thermal Cycler Biorad). Le programme utilisé est : 95°C 3 min, 39x (95°C 10s, 60°C 1min), 95°C 10s. Les amorces utilisées ainsi que leurs positions par rapport à la barrière *RTS1* figurent dans le Tableau SI dans Ait Saada et al., 2017. Le pourcentage d'ADN simple brin est déterminé par une formule prenant en compte le différentiel ADN digéré/non digéré (Zierhut and Diffley, 2008): % ADN simple brin = $100/((1+2\Delta Ct)/2)$, où ΔCt est la différence entre les cycles seuils ($Ct = \text{Threshold Cycle}$) de l'ADN

digéré et non digéré. Les valeurs de Ct sont corrigées par rapport à un amplicon d'un *locus* (*Il-150*) situé sur un autre chromosome ne contenant pas le site de restriction *MseI*. Un *locus* contrôle, *Il-50*, contenant le site de restriction de *MseI* est utilisé comme contrôle négatif.

V. Immuno-précipitation de la chromatine (ChIP)

Les expériences de ChIP présentées dans ce manuscrit concernent l'immuno-précipitation de RPA (*Ssb3-YFP*), Ku (*Ku70-HA*) et Fft3 (*Fft3-myc*). L'immuno-précipitation de RPA et Fft3 implique un double pontage aux DMA (pour *Dimethyl Adipimidate*) et formaldéhyde. Pour *Ku70-HA*, voir Teixeira et al., 2017 pour le protocole.

1. Pontage ADN-protéines/protéines-protéines:

Les cultures sont mises en culture en absence (condition RFB ON) et en présence de 60µM thiamine (condition RFB OFF). La barrière *RTS1* est induite pendant 24h. Les cultures sont inactivées avec 0,1% d'azide de sodium et 1×10^9 cellules en phase exponentielle de croissance sont lavées avec 10ml de PBS. Les cellules sont resuspendues 10ml de DMA (Thermo Scientific 20660) 10mM (préparé extemporanément dans du PBS 1x) puis 25µl de DMSO sont ajoutés. Après une incubation de 45 minutes à température ambiante sous agitation douce, les cellules sont culotées et lavées avec 10ml de PBS 1x, puis resuspendues dans 40 ml de PBS 1x. Le deuxième pontage est alors effectué en présence de 1% de formaldéhyde (Sigma F8775). Après 15 minutes d'incubation à température ambiante pendant 15 minutes sous agitation douce, le formaldéhyde est inactivé en ajoutant 2 ml de glycine à 2,5M (5 minutes d'incubation sont nécessaires). Les cellules sont alors culotées et lavées avec 10 ml de PBS 1x. Les culots subissent un passage dans l'azote liquide avant de procéder aux étapes suivantes.

2. Solubilisation de la chromatine et immuno-précipitation des protéines

Pour la suite de l'expérience trois solutions sont nécessaires :

- CHIP Lysis Buffer : 50mM HEPES pH7,4 ; 140mM NaCl ; 1% Triton 100X ; 0,1% Na Deoxycholate ; 1mM de PMSF et un cocktail d'inhibiteurs de protéases (Roche 04 693 159 001). Le PMSF et la tablette d'inhibiteur de protéases sont ajoutés extemporanément.
- CHIP Lysis Buffer High Salt : 50mM d'HEPES pH7,4 ; 500mM de NaCl ; 1% de Triton 100X ; 0,1% de Na Deoxycholate.
- CHIP elution Buffer: 50mM Tris-HCl pH 8 ; 1% SDS ; 10mM EDTA.

Les culots cellulaires sont resuspendus dans 1ml de PBS 1x puis transférés dans des tubes à ribolyse. Après centrifugation à 4°C, les culots sont resuspendus dans 400 µl de CHIP Lysis Buffer et une dose de billes de verre sont ajoutées (Sigma G8772, acid washed 0,5 µm). La lyse mécanique s'effectue à 6000 rpm suivant 3 cycles de 30 secondes avec 1 minute de pause après chaque cycle. Les lysats sont récupérés dans des tubes eppendorf puis centrifugés pendant 10 minutes à 15000g à 4°C. Chaque culot est repris dans 400µl de CHIP Lysis Buffer avant de procéder à la sonication afin de solubiliser la chromatine. Chaque échantillon subit dix cycles de 30 secondes de sonication interrompus à chaque fois par 30 secondes de pause. Les échantillons sont centrifugés pendant 5 minutes à 5000g (4°C) puis les surnageants sont répartis comme suit : 300µl auquel sera ajouté l'anticorps (fraction IP), 5µl auxquels seront ajoutés 100µl de CHIP Elution Buffer (fraction INPUT) et 20µl pour une analyse par *western blot*.

Pour immunoprécipiter Ssb3-YFP, l'anti-GFP (Thermo Scientific A11122) est utilisé au 150^{ième} et pour fft3-Myc, l'anti-Myc (Thermo Scientific 9E10) est utilisé au 300^{ième}. Les échantillons sont incubés avec l'anticorps à 4°C pendant une heure puis les billes magnétiques sont ajoutées (40µl pour GFP et 20µl pour Myc) et l'incubation se poursuit sur la nuit. Les échantillons sont lavés deux fois avec 1ml de chacune des solutions suivantes : CHIP Lysis Buffer (5 minutes), CHIP Lysis Buffer High Salt (10 minutes) et CHIP Wash Buffer (5 minutes). Après un dernier lavage au TE 1x pH8 (1 minute), les billes sont reprises dans 130µl de CHIP Elution Buffer puis transvaser dans un nouveau tube Eppendorf. Une réversion du pontage est effectuée en incubant les échantillons à 65°C pendant 2h10 sous agitation (300rpm). Une fraction de 20µl est récupérée pour une analyse par *western blot*. Après réversion du pontage, 100µl de la fraction IP sont récupérés. Les fractions INPUT et IP sont alors purifiées avec un

kit Qiagen (28704). Deux lavages au PE sont effectués et les ADNs sont élués avec 400µl de H₂O. Pour l'amplification des régions d'intérêt, voir IV. Analyse de l'ADNs par qPCR.

VI. Microscopie sur cellules vivantes

Environ 1 ml d'une culture en phase exponentielle de croissance est centrifugé à faible vitesse (10000 rpm pendant 10 sec) puis re-suspendu dans 200µl de EMM-Glutamate filtré. Environ 1µl est déposé sur une lame d'agarose préalablement préparée (agarose 1,4% dans EMM-Glutamate filtré). La microscopie a été réalisée à l'aide d'un microscope 3D (LEICA DMRXA) équipé de filtres GFP/YFP/Rhodamine/CFP et d'une caméra monochrome CoolSNAP (Roper Scientific). Les cellules vivantes ont été visualisées avec un objectif 100X à immersion en contraste interférentiel différentiel (DIC, pour *Differential Interference Contrast*). Une pile de 21 images (Z-stack) a été prise sur plusieurs champs avec les filtres appropriés. Chaque champ a été analysé plan par plan avec le logiciel ImageJ afin d'identifier les problèmes mitotiques, les ponts anaphasiques et les co-localisations entre GFP-Lacl et Ssb3-mCherry et pour le dénombrement des foyers RPA (Ssb3-mCherry, Ssb3-YFP). L'acquisition et l'analyse des images ont été effectuées au niveau de la plateforme de microscopie PICT-IBiSA à l'Institut Curie d'Orsay.

La vidéo-microscopie a été effectuée en microfluidique avec un dispositif comprenant une couche PDMS (poly-diméthylsiloxane) de 4-5µm d'épaisseur fixée à une lamelle. Les images sont acquises toutes les 5 minutes avec un microscope (Nikon Eclipse Ti-E) équipé d'un « perfect Focus System », un objectif à immersion PlanApo 100X/1,45-NA (ouverture numérique), un piezo Mad City Lab, d'une unité confocale Yokogawa CSUX1 et d'une caméra Photometrics HQ2 CCD. Pour les fluorescences m-Cherry et GFP, les cellules sont exposées durant 300 millisecondes à 12% d'intensité de laser (491nm) et 500 millisecondes à 17% d'intensité de laser (561nm), respectivement. Les vidéos sont reconstruites avec le logiciel METAMORPH et analysées avec ImageJ. La vidéo-microscopie a été effectuée dans le laboratoire d'Anna Paoletti à l'Institut Curie à Paris.

VII. Sensibilité aux agents génotoxiques

Le test sur goutte permet de tester la sensibilité des différents mutants à différents agents génotoxiques, connus pour perturber la réplication de l'ADN ou induire des dommages de l'ADN. De même, la fonctionnalité des protéines étiquetées peut être testée de la cette façon. Une protéine tagguée est sensée ne pas présenter de sensibilité aux drogues si elle est fonctionnelle.

Des doses croissantes de drogues sont incluses dans du milieu gélosé. Les drogues utilisées sont : la camptothécine (CPT, un inhibiteur de la topoisomérase 1 qui conduit à un stress répliatif et la formation de CDBs répliatives), l'hydroxyurée (HU, un inhibiteur de la ribonucléotide réductase, qui conduit à une déplétion du pool de nucléotide en phase S et à un ralentissement des fourches de réplication), le méthanesulfonate de méthyle (MMS, agent alkylant) et la bléomycine (induit des CDBs). Les souches peuvent être également exposées à des doses croissantes d'UV-C (254 nm, qui induisent des dommages de l'ADN). Pour chaque souche, une goutte de 10 µl de dilutions en série (au 10^{ième}, de 1.10⁷ à 1.10³ cellules/ml) est déposée sur une boîte contenant le milieu approprié.

Références

Aboussekhra, A., Chanet, R., Adjiri, A., and Fabre, F. (1992). Semidominant suppressors of Srs2 helicase mutations of *Saccharomyces cerevisiae* map in the RAD51 gene, whose sequence predicts a protein with similarities to procaryotic RecA proteins. *Mol. Cell. Biol.* *12*, 3224–3234.

Adkins, N.L., Niu, H., Sung, P., and Peterson, C.L. (2013). Nucleosome dynamics regulates DNA processing. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *20*, 836–842.

Ahn, J.S., Osman, F., and Whitby, M.C. (2005). Replication fork blockage by RTS1 at an ectopic site promotes recombination in fission yeast. *EMBO J.* *24*, 2011–2023.

Ahuja, A.K., Jodkowska, K., Teloni, F., Bizard, A.H., Zellweger, R., Herrador, R., Ortega, S., Hickson, I.D., Altmeyer, M., Mendez, J., et al. (2016). A short G1 phase imposes constitutive replication stress and fork remodelling in mouse embryonic stem cells. *Nat. Commun.* *7*, 10660.

Ait Saada, A., Teixeira-Silva, A., Iraqui, I., Costes, A., Hardy, J., Paoletti, G., Fréon, K., and Lambert, S.A.E. (2017). Unprotected Replication Forks Are Converted into Mitotic Sister Chromatid Bridges. *Mol. Cell* *66*, 398–410.e4.

Akamatsu, Y., Dziadkowiec, D., Ikeguchi, M., Shinagawa, H., and Iwasaki, H. (2003). Two different Swi5-containing protein complexes are involved in mating-type switching and recombination repair in fission yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *100*, 15770–15775.

Amangyeld, T., Shin, Y.-K., Lee, M., Kwon, B., and Seo, Y.-S. (2014). Human MUS81-EME2 can cleave a variety of DNA structures including intact Holliday junction and nicked duplex. *Nucleic Acids Res.* *42*, 5846–5862.

Amundsen, S.K., and Smith, G.R. (2003). Interchangeable parts of the *Escherichia coli* recombination machinery. *Cell* *112*, 741–744.

Anand, R., Ranjha, L., Cannavo, E., and Cejka, P. (2016). Phosphorylated CtIP Functions as a Co-factor of the MRE11-RAD50-NBS1 Endonuclease in DNA End Resection. *Mol. Cell* *64*, 940–950.

Andres, S.N., Appel, C.D., Westmoreland, J., Williams, J.S., Nguyen, Y., Robertson, P.D., Resnick, M.A., and Williams, R.S. (2015). Tetrameric Ctp1 coordinates DNA binding and bridging in DNA double strand break repair. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *22*, 158–166.

Anyong Xie, Amy Kwok, and R.S. (2010). Role of mammalian Mre11 in classical and alternative non-homologous end joining. *NIH Public Access* *16*, 814–818.

Arora, S., Deshpande, R.A., Budd, M., Campbell, J., Revere, A., Zhang, X., Schmidt, K.H., and Paull, T.T. (2017). Genetic separation of Sae2 nuclease activity from Mre11 nuclease functions in budding yeast. *Mol. Cell. Biol.* *37*, MCB.00156-17.

Ashley, A.K., Shrivastav, M., Nie, J., Amerin, C., Troksa, K., Glanzer, J.G., Liu, S., Opiyo, S.O., Dimitrova, D.D., Le, P., et al. (2014). DNA-PK phosphorylation of RPA32 Ser4/Ser8 regulates replication stress checkpoint activation, fork restart, homologous recombination and mitotic

catastrophe. *DNA Repair (Amst)*. *21*, 131–139.

Atkinson, J., and McGlynn, P. (2009). Replication fork reversal and the maintenance of genome stability. *Nucleic Acids Res.* *37*, 3475–3492.

Van Attikum, H., Fritsch, O., Hohn, B., and 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.

Aylon, Y., Liefshitz, B., and Kupiec, M. (2004). The CDK regulates repair of double-strand breaks by homologous recombination during the cell cycle. *EMBO J.* *23*, 4868–4875.

Bae, S., Choi, E., Park, J.S., Lee, S., Seo, Y., and Lee, K. (1998). nucleic acids , protein synthesis , and molecular genetics : Dna2 of *Saccharomyces cerevisiae* Possesses Endonuclease Activity That Is Able to Act on Double-stranded DNA in the Presence of Dna2 of *Saccharomyces cerevisiae* Possesses a Single-stranded DNA-sp. *273*, 26880–26890.

Bae, S.H., Bae, K.H., Kim, J.A., and Seo, Y.S. (2001). RPA governs endonuclease switching during processing of Okazaki fragments in eukaryotes. *Nature* *412*, 456–461.

Bähler, J., Wu, J.Q., Longtine, M.S., Shah, N.G., McKenzie, A., Steever, A.B., Wach, A., Philippsen, P., and Pringle, J.R. (1998). Heterologous modules for efficient and versatile PCR-based gene targeting in *Schizosaccharomyces pombe*. *Yeast* *14*, 943–951.

Bai, Y., and Symington, L.S. (1996). A Rad52 homolog is required for RAD51-independent mitotic recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev.* 2025–2037.

Bailis, J.M., Luche, D.D., Hunter, T., and Forsburg, S.L. (2008). Minichromosome maintenance proteins interact with checkpoint and recombination proteins to promote S-phase genome stability. *Mol. Cell. Biol.* *28*, 1724–1738.

Bakhoun, S.F., Ngo, B., Laughney, A.M., Cavallo, J.-A., Murphy, C.J., Ly, P., Shah, P., Sriram, R.K., Watkins, T.B.K., Taunk, N.K., et al. (2018). Chromosomal instability drives metastasis through a cytosolic DNA response. *Nature* *553*, 467–472.

Balakrishnan, L., and Bambara, R.A. (2013). Okazaki Fragment Metabolism. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* *5*, a010173–a010173.

Bärtsch, S., Kang, L.E., and Symington, L.S. (2000). RAD51 is required for the repair of plasmid double-stranded DNA gaps from either plasmid or chromosomal templates. *Mol. Cell. Biol.* *20*, 1194–1205.

Baumann, P., and West, S.C. (1998). Role of the human RAD51 protein in homologous recombination and double-stranded-break repair. *Trends Biochem. Sci.* *23*, 247–251.

Baumann, C., Körner, R., Hofmann, K., and Nigg, E.A. (2007). PICH, a Centromere-Associated SNF2 Family ATPase, Is Regulated by Plk1 and Required for the Spindle Checkpoint. *Cell* *128*, 101–114.

Baumann, P., Benson, F.E., and West, S.C. (1996). Human Rad51 protein promotes ATP-dependent homologous pairing and strand transfer reactions in vitro. *Cell* *87*, 757–766.

- Baxter, J., and Diffley, J.F.X. (2008). Topoisomerase II Inactivation Prevents the Completion of DNA Replication in Budding Yeast. *Mol. Cell* *30*, 790–802.
- Bell, L., and Byers, B. (1983). Separation of branched from linear DNA by two-dimensional gel electrophoresis. *Anal. Biochem.* *130*, 527–535.
- Benson, F.E., Stasiak, A., and West, S.C. (1994). Purification and characterization of the human Rad51 protein, an analogue of *E. coli* RecA. *EMBO J.* *13*, 5764–5771.
- Bergoglio, V., Boyer, A.-S., Walsh, E., Naim, V., Legube, G., Lee, M.Y.W.T., Rey, L., Rosselli, F., Cazaux, C., Eckert, K.A., et al. (2013). DNA synthesis by Pol η promotes fragile site stability by preventing under-replicated DNA in mitosis. *J. Cell Biol.* *201*, 395–408.
- Bermejo, R., Capra, T., Jossen, R., Colosio, A., Frattini, C., Carotenuto, W., Cocito, A., Doksani, Y., Klein, H., Gómez-González, B., et al. (2011). The Replication Checkpoint Protects Fork Stability by Releasing Transcribed Genes from Nuclear Pores. *Cell* *146*, 233–246.
- Berti, M., and Vindigni, A. (2016). Replication stress: getting back on track. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *23*, 103–109.
- Berti, M., Chaudhuri, A.R., Thangavel, S., Gomathinayagam, S., Kenig, S., Vujanovic, M., Odreman, F., Glatter, T., Graziano, S., Mendoza-Maldonado, R., et al. (2013). Human RECQ1 promotes restart of replication forks reversed by DNA topoisomerase I inhibition. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *20*, 347–354.
- Bester, A.C., Roniger, M., Oren, Y.S., Im, M.M., Sarni, D., Chaoat, M., Bensimon, A., Zamir, G., Shewach, D.S., and Kerem, B. (2011). Nucleotide Deficiency Promotes Genomic Instability in Early Stages of Cancer Development. *Cell* *145*, 435–446.
- Bétous, R., Mason, A.C., Rambo, R.P., Bansbach, C.E., Badu-Nkansah, A., Sirbu, B.M., Eichman, B.F., and Cortez, D. (2012). SMARCAL1 catalyzes fork regression and Holliday junction migration to maintain genome stability during DNA replication. *Genes Dev.* *26*, 151–162.
- Bhatia, V., Barroso, S.I., García-Rubio, M.L., Tumini, E., Herrera-Moyano, E., and Aguilera, A. (2014). BRCA2 prevents R-loop accumulation and associates with TREX-2 mRNA export factor PCID2. *Nature* *511*, 362–365.
- Bhowmick, R., Minocherhomji, S., and Hickson, I.D. (2016). RAD52 Facilitates Mitotic DNA Synthesis Following Replication Stress. *Mol. Cell* *64*, 1117–1126.
- Bi, B., Rybalchenko, N., Golub, E.I., and Radding, C.M. (2004). Human and yeast Rad52 proteins promote DNA strand exchange. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *101*, 9568–9572.
- Biebricher, A., Hirano, S., Enzlin, J.H., Wiechens, N., Streicher, W.W., Huttner, D., Wang, L.H.-C., Nigg, E.A., Owen-Hughes, T., Liu, Y., et al. (2013). PICH: a DNA translocase specially adapted for processing anaphase bridge DNA. *Mol. Cell* *51*, 691–701.
- Biehs, R., Steinlage, M., Barton, O., Shibata, A., Jeggo, P.A., Lo, M., Spies, J., and Shibata, A. (2017). Article DNA Double-Strand Break Resection Occurs during Non-homologous End Joining in G1 but Is Distinct from Resection during Homologous Recombination Article DNA

Double-Strand Break Resection Occurs during Non-homologous End Joining in G1 but Is Distinc. *65*, 671–684.

Bishop, D.K. (2012). Rad51, the lead in mitotic recombinational DNA repair, plays a supporting role in budding yeast meiosis. *Cell Cycle* *11*, 4105–4106.

Bishop, D.K., Park, D., Xu, L., and Kleckner, N. (1992). DMC1: a meiosis-specific yeast homolog of *E. coli* recA required for recombination, synaptonemal complex formation, and cell cycle progression. *Cell* *69*, 439–456.

Blackford, A.N., and Jackson, S.P. (2017). ATM, ATR, and DNA-PK: The Trinity at the Heart of the DNA Damage Response. *Mol. Cell* *66*, 801–817.

Blow, J.J., and Tanaka, T.U. (2005). The chromosome cycle: coordinating replication and segregation. Second in the cycles review series. *EMBO Rep.* *6*, 1028–1034.

Blow, J.J., Ge, X.Q., and Jackson, D.A. (2011). How dormant origins promote complete genome replication. *Trends Biochem. Sci.* *36*, 405–414.

Bochman, M.L., and Schwacha, A. (2008). The Mcm2-7 Complex Has In Vitro Helicase Activity. *Mol. Cell* *31*, 287–293.

Bosco, G., and Haber, J.E. (1998). Chromosome break-induced DNA replication leads to nonreciprocal translocations and telomere capture. *Genetics* *150*, 1037–1047.

Boulton, S.J., and Jackson, S.P. (1996). *Saccharomyces cerevisiae* Ku70 potentiates illegitimate DNA double-strand break repair and serves as a barrier to error-prone DNA repair pathways. *EMBO J.* *15*, 5093–5103.

Boulton, S.J., and Jackson, S.P. (1998). Components of the Ku-dependent non-homologous end-joining pathway are involved in telomeric length maintenance and telomeric silencing. *EMBO J.* *17*, 1819–1828.

van Brabant, A.J., Hunt, S.Y., Fangman, W.L., and Brewer, B.J. (1998). Identifying sites of replication initiation in yeast chromosomes: Looking for origins in all the right places. *Electrophoresis* *19*, 1239–1246.

Brambati, A., Zardoni, L., Achar, Y.J., Piccini, D., Galanti, L., Colosio, A., Foiani, M., and Liberi, G. (2018). Dormant origins and fork protection mechanisms rescue sister forks arrested by transcription. *Nucleic Acids Res.* *46*, 1227–1239.

Branzei, D., and Foiani, M. (2007). Template Switching: From Replication Fork Repair to Genome Rearrangements. *Cell* *131*, 1228–1230.

Branzei, D., Vanoli, F., and Foiani, M. (2008). SUMOylation regulates Rad18-mediated template switch. *Nature* *456*, 915–920.

Brewer, B.J., and Fangman, W.L. (1988). A replication fork barrier at the 3' end of yeast ribosomal RNA genes. *Cell* *55*, 637–643.

Brewer, B.J., and Fangman, W.L. (1991). Mapping replication origins in yeast chromosomes.

BioEssays 13, 317–322.

Brewer, B.J., Lockshon, D., and Fangman, W.L. (1992). The arrest of replication forks in the rDNA of yeast occurs independently of transcription. *Cell* 71, 267–276.

Brochier, C., and Langley, B. (2013). Chromatin Modifications Associated with DNA Double-strand Breaks Repair as Potential Targets for Neurological Diseases. *Neurotherapeutics* 10, 817–830.

Bugreev, D. V., Rossi, M.J., and Mazin, A. V. (2011). Cooperation of RAD51 and RAD54 in regression of a model replication fork. *Nucleic Acids Res.* 39, 2153–2164.

Buis, J., Wu, Y., Deng, Y., Leddon, J., Westfield, G., Sekiguchi, J.M., Chang, S., and Ferguson, D.O. (2008). Mre11 Nuclease Activity has Essential Roles in DNA Repair and Genomic Stability Distinct from ATM Activation. *Cell* 135, 85–96.

Burgers, P.M.J. (2009). Polymerase Dynamics at the Eukaryotic DNA Replication Fork. *J. Biol. Chem.* 284, 4041–4045.

Burkart, W., Jung, T., and Frasch, G. (1998). Damage pattern as a function of radiation quality and other factors. *C. R. Acad. Sci. III.* 322, 89–101.

Burma, S., Chen, B.P., Murphy, M., Kurimasa, A., and Chen, D.J. (2001). ATM Phosphorylates Histone H2AX in Response to DNA Double-strand Breaks. *J. Biol. Chem.* 276, 42462–42467.

Burrell, R.A., McClelland, S.E., Endesfelder, D., Groth, P., Weller, M.-C., Shaikh, N., Domingo, E., Kanu, N., Dewhurst, S.M., Gronroos, E., et al. (2013). Replication stress links structural and numerical cancer chromosomal instability. *Nature* 494, 492–496.

Cadoret, J.-C., Meisch, F., Hassan-Zadeh, V., Luyten, I., Guillet, C., Duret, L., Quesneville, H., and Prioleau, M.-N. (2008). Genome-wide studies highlight indirect links between human replication origins and gene regulation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 105, 15837–15842.

Cannavo, E., and Cejka, P. (2014). Sae2 promotes dsDNA endonuclease activity within Mre11-Rad50-Xrs2 to resect DNA breaks. *Nature* 514, 122–125.

Cannavo, E., Cejka, P., and Kowalczykowski, S.C. (2013). Relationship of DNA degradation by *Saccharomyces cerevisiae* Exonuclease 1 and its stimulation by RPA and Mre11-Rad50-Xrs2 to DNA end resection. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 110, E1661–E1668.

Carr, A.M., and Lambert, S. (2013). Replication stress-induced genome instability: the dark side of replication maintenance by homologous recombination. *J. Mol. Biol.* 425, 4733–4744.

Cejka, P., Cannavo, E., Polaczek, P., Masuda-Sasa, T., Pokharel, S., Campbell, J.L., and Kowalczykowski, S.C. (2010). DNA end resection by Dna2-Sgs1-RPA and its stimulation by Top3-Rmi1 and Mre11-Rad50-Xrs2. *Nature* 467, 112–116.

Chambers, A.L., and Downs, J.A. (2012). The RSC and INO80 chromatin-remodeling complexes in DNA double-strand break repair (Elsevier Inc.).

Chan, K.-L., North, P.S., and Hickson, I.D. (2007). BLM is required for faithful chromosome

segregation and its localization defines a class of ultrafine anaphase bridges. *EMBO J.* **26**, 3397–3409.

Chan, K.L., Palmai-Pallag, T., Ying, S., and Hickson, I.D. (2009). Replication stress induces sister-chromatid bridging at fragile site loci in mitosis. *Nat. Cell Biol.* **11**, 753–760.

Chan, Y.W., Fugger, K., and West, S.C. (2018). Unresolved recombination intermediates lead to ultra-fine anaphase bridges, chromosome breaks and aberrations. *Nat. Cell Biol.* **20**, 92–103.

Chanoux, R.A., Yin, B., Urtishak, K.A., Asare, A., Bassing, C.H., and Brown, E.J. (2009). ATR and H2AX Cooperate in Maintaining Genome Stability under Replication Stress. *J. Biol. Chem.* **284**, 5994–6003.

Chanut, P., Britton, S., Coates, J., Jackson, S.P., and Calsou, P. (2016). Coordinated nuclease activities counteract Ku at single-ended DNA double-strand breaks. *Nat. Commun.* **7**.

Chapman, J.R., and Jackson, S.P. (2008). Phospho-dependent interactions between NBS1 and MDC1 mediate chromatin retention of the MRN complex at sites of DNA damage. *EMBO Rep.* **9**, 795–801.

Chapman, J.R., Taylor, M.R.G., and Boulton, S.J. (2012). Playing the end game: DNA double-strand break repair pathway choice. *Mol. Cell* **47**, 497–510.

Charbin, A., Bouchoux, C., and Uhlmann, F. (2014). Condensin aids sister chromatid decatenation by topoisomerase II. *Nucleic Acids Res.* **42**, 340–348.

Chen, C., and Kolodner, R.D. (1999). Gross chromosomal rearrangements in *Saccharomyces cerevisiae* replication and recombination defective mutants. *Nat. Genet.* **23**, 81–85.

Chen, H., Lisby, M., and Symington, L.S. (2013). RPA coordinates DNA end resection and prevents formation of DNA hairpins. *Mol. Cell* **50**, 589–600.

Chen, J., Silver, D.P., Walpita, D., Cantor, S.B., Gazdar, A.F., Tomlinson, G., Couch, F.J., Weber, B.L., Ashley, T., Livingston, D.M., et al. (1998). Stable interaction between the products of the BRCA1 and BRCA2 tumor suppressor genes in mitotic and meiotic cells. *Mol. Cell* **2**, 317–328.

Chen, X., Cui, D., Papusha, A., Zhang, X., Chu, C.-D., Tang, J., Chen, K., Pan, X., and Ira, G. (2012). The Fun30 nucleosome remodeller promotes resection of DNA double-strand break ends. *Nature* **489**, 576–580.

Chi, P., Van Komen, S., Sehorn, M.G., Sigurdsson, S., and Sung, P. (2006). Roles of ATP binding and ATP hydrolysis in human Rad51 recombinase function. *DNA Repair (Amst.)* **5**, 381–391.

Chow, K.-H., and Courcelle, J. (2004). RecO acts with RecF and RecR to protect and maintain replication forks blocked by UV-induced DNA damage in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **279**, 3492–3496.

Ciccia, A., Bredemeyer, A.L., Sowa, M.E., Terret, M.-E., Jallepalli, P. V., Harper, J.W., and Elledge, S.J. (2009). The SIOD disorder protein SMARCAL1 is an RPA-interacting protein involved in replication fork restart. *Genes Dev.* **23**, 2415–2425.

- Ciccia, A., Nimonkar, A.V., Hu, Y., Hajdu, I., Achar, Y.J., Izhar, L., Petit, S.A., Adamson, B., Yoon, J.C., Kowalczykowski, S.C., et al. (2012). Polyubiquitinated PCNA Recruits the ZRANB3 Translocase to Maintain Genomic Integrity after Replication Stress. *Mol. Cell* 47, 396–409.
- Clark, A.J., and Margulies, A.D. (1965). ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF RECOMBINATION-DEFICIENT MUTANTS OF ESCHERICHIA COLI K12. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 53, 451–459.
- Clerici, M., Mantiero, D., Lucchini, G., and Longhese, M.P. (2005). The *Saccharomyces cerevisiae* Sae2 protein promotes resection and bridging of double strand break ends. *J. Biol. Chem.* 280, 38631–38638.
- Cloud, V., Chan, Y.-L., Grubb, J., Budke, B., and Bishop, D.K. (2012). Rad51 is an accessory factor for Dmc1-mediated joint molecule formation during meiosis. *Science* 337, 1222–1225.
- Cobb, J.A., Bjergbaek, L., Shimada, K., Frei, C., and Gasser, S.M. (2003). DNA polymerase stabilization at stalled replication forks requires Mec1 and the RecQ helicase Sgs1. *EMBO J.* 22, 4325–4336.
- Codlin, S., and Dalgaard, J.Z. (2003). Complex mechanism of site-specific DNA replication termination in fission yeast. *EMBO J.* 22, 3431–3440.
- Cohen, S., Puget, N., Lin, Y.-L., Clouaire, T., Aguirrebengoa, M., Rocher, V., Pasero, P., Canitrot, Y., and Legube, G. (2018). Senataxin resolves RNA:DNA hybrids forming at DNA double-strand breaks to prevent translocations. *Nat. Commun.* 9, 533.
- Colleaux, L., D'Auriol, L., Galibert, F., and Dujon, B. (1988). Recognition and cleavage site of the intron-encoded omega transposase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 85, 6022–6026.
- Colosio, A., Frattini, C., Pellicanò, G., Villa-Hernández, S., and Bermejo, R. (2016). Nucleolytic processing of aberrant replication intermediates by an Exo1-Dna2-Sae2 axis counteracts fork collapse-driven chromosome instability. *Nucleic Acids Res.* 44, 10676–10690.
- Corneo, B., Wendland, R.L., Deriano, L., Cui, X., Klein, I.A., Wong, S.-Y., Arnal, S., Holub, A.J., Weller, G.R., Pancake, B.A., et al. (2007). Rag mutations reveal robust alternative end joining. *Nature* 449, 483–486.
- Cortez, D. (2015). Preventing replication fork collapse to maintain genome integrity. *DNA Repair (Amst)*. 32, 149–157.
- Cortez, D., Guntuku, S., Qin, J., and Elledge, S.J. (2001). ATR and ATRIP: Partners in checkpoint signaling. *Science (80-)*. 294, 1713–1716.
- Costantino, L., Sotiriou, S.K., Rantala, J.K., Magin, S., Mladenov, E., Helleday, T., Haber, J.E., Iliakis, G., Kallioniemi, O.P., and Halazonetis, T.D. (2014). Break-Induced Replication Repair of Damaged Forks Induces Genomic Duplications in Human Cells. *Science (80-)*. 343, 88–91.
- Costanzo, V., Robertson, K., Bibikova, M., Kim, E., Grieco, D., Gottesman, M., Carroll, D., and Gautier, J. (2001). Mre11 protein complex prevents double-strand break accumulation during chromosomal DNA replication. *Mol. Cell* 8, 137–147.

Costelloe, T., Louge, R., Tomimatsu, N., Mukherjee, B., Martini, E., Khadaroo, B., Dubois, K., Wiegant, W.W., Thierry, A., Burma, S., et al. (2012). The yeast Fun30 and human SMARCAD1 chromatin remodellers promote DNA end resection. *Nature* 489, 581–584.

Costes, A., and Lambert, S. (2012). Homologous Recombination as a Replication Fork Escort: Fork-Protection and Recovery. *Biomolecules* 3, 39–71.

Cotta-Ramusino, C., Fachinetti, D., Lucca, C., Doksani, Y., Lopes, M., Sogo, J., and Foiani, M. (2005a). Exo1 Processes Stalled Replication Forks and Counteracts Fork Reversal in Checkpoint-Defective Cells. *Mol. Cell* 17, 153–159.

Cotta-Ramusino, C., Fachinetti, D., Lucca, C., Doksani, Y., Lopes, M., Sogo, J., and Foiani, M. (2005b). Exo1 Processes Stalled Replication Forks and Counteracts Fork Reversal in Checkpoint-Defective Cells. *Mol. Cell* 17, 153–159.

Couch, F.B., Bansbach, C.E., Driscoll, R., Luzwick, J.W., Glick, G.G., Bétous, R., Carroll, C.M., Jung, S.Y., Qin, J., Cimprich, K.A., et al. (2013). ATR phosphorylates SMARCAL1 to prevent replication fork collapse. *Genes Dev.* 27, 1610–1623.

Courcelle, J., and Hanawalt, P.C. (2001). Participation of recombination proteins in rescue of arrested replication forks in UV-irradiated *Escherichia coli* need not involve recombination. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98, 8196–8202.

Courcelle, J., Donaldson, J.R., Chow, K.-H., and Courcelle, C.T. (2003). DNA Damage-Induced Replication Fork Regression and Processing in *Escherichia coli*. *Science* (80-.). 299, 1064–1067.

Cox, M.M. (2003). The Bacterial RecA Protein as a Motor Protein. *Annu. Rev. Microbiol.* 57, 551–577.

Crasta, K., Ganem, N.J., Dagher, R., Lantermann, A.B., Ivanova, E. V, Pan, Y., Nezi, L., Protopopov, A., Chowdhury, D., and Pellman, D. (2012). DNA breaks and chromosome pulverization from errors in mitosis. *Nature* 482, 53–58.

D’Amours, D., and Jackson, S.P. (2002). The Mre11 complex: At the crossroads of DNA repair and checkpoint signalling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 3, 317–327.

Daboussi, F., Courbet, S., Benhamou, S., Kannouche, P., Zdzienicka, M.Z., Debatisse, M., and Lopez, B.S. (2008). A homologous recombination defect affects replication-fork progression in mammalian cells. *J. Cell Sci.* 121, 162–166.

Daley, J.M., and Sung, P. (2014). 53BP1, BRCA1, and the choice between recombination and end joining at DNA double-strand breaks. *Mol. Cell. Biol.* 34, 1380–1388.

Daley, J.M., Niu, H., Miller, A.S., and Sung, P. (2015). Biochemical mechanism of DSB end resection and its regulation. *DNA Repair (Amst).* 32, 66–74.

Dalgaard, J.Z., and Klar, A.J. (2000). *swi1* and *swi3* perform imprinting, pausing, and termination of DNA replication in *S. pombe*. *Cell* 102, 745–751.

Dalgaard, J.Z., and Klar, A.J. (2001). A DNA replication-arrest site RTS1 regulates imprinting by determining the direction of replication at *mat1* in *S. pombe*. *Genes Dev.* 15, 2060–2068.

Davies, O.R., Forment, J. V., Sun, M., Belotserkovskaya, R., Coates, J., Galanty, Y., Demir, M., Morton, C.R., Rzechorzek, N.J., Jackson, S.P., et al. (2015). CtIP tetramer assembly is required for DNA-end resection and repair. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *22*, 150–157.

Davis, A.P., and Symington, L.S. (2004). RAD51-dependent break-induced replication in yeast. *Mol. Cell Biol.* *24*, 2344–2351.

De Piccoli, G., Katou, Y., Itoh, T., Nakato, R., Shirahige, K., and Labib, K. (2012). Replisome Stability at Defective DNA Replication Forks Is Independent of S Phase Checkpoint Kinases. *Mol. Cell* *45*, 696–704.

Deem, A., Keszthelyi, A., Blackgrove, T., Vayl, A., Coffey, B., Mathur, R., Chabes, A., and Malkova, A. (2011). Break-induced replication is highly inaccurate. *PLoS Biol.* *9*.

Dehé, P.-M., Coulon, S., Scaglione, S., Shanahan, P., Takedachi, A., Wohlschlegel, J.A., Yates, J.R., Llorente, B., Russell, P., and Gaillard, P.-H.L. (2013). Regulation of Mus81–Eme1 Holliday junction resolvase in response to DNA damage. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *20*, 598–603.

Delacôte, F., and Lopez, B.S. (2008). Importance of the cell cycle phase for the choice of the appropriate DSB repair pathway, for genome stability maintenance: The trans-S double-strand break repair model. *Cell Cycle* *7*, 33–38.

Delgado, S., Gomez, M., Bird, a, and Antequera, F. (1998). Initiation of DNA replication at CpG islands in mammalian chromosomes. *Embo J.* *17*, 2426–2435.

Deng, S.K., Gibb, B., de Almeida, M.J., Greene, E.C., and Symington, L.S. (2014). RPA antagonizes microhomology-mediated repair of DNA double-strand breaks. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *21*, 405–412.

Depienne, C., Bouteiller, D., Méneret, A., Billot, S., Groppa, S., Klebe, S., Charbonnier-Beaupel, F., Corvol, J.C., Saraiva, J.P., Brueggemann, N., et al. (2012). RAD51 haploinsufficiency causes congenital mirror movements in humans. *Am. J. Hum. Genet.* *90*, 301–307.

Devbhandari, S., Jiang, J., Kumar, C., Whitehouse, I., and Remus, D. (2017). Chromatin Constrains the Initiation and Elongation of DNA Replication. *Mol. Cell* *65*, 131–141.

Dewar, J.M., and Walter, J.C. (2017). Mechanisms of DNA replication termination. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *18*, 507–516.

Dewar, J.M., Budzowska, M., and Walter, J.C. (2015). The mechanism of DNA replication termination in vertebrates. *Nature* *525*, 345–350.

Dewar, J.M., Low, E., Mann, M., Räsche, M., and Walter, J.C. (2017). CRL2^{Lrr1} promotes unloading of the vertebrate replisome from chromatin during replication termination. *Genes Dev.* *31*, 275–290.

Diffley, J.F. (1996). Once and only once upon a time: specifying and regulating origins of DNA replication in eukaryotic cells. *Genes Dev.* *10*, 2819–2830.

Dilley, R.L., Verma, P., Cho, N.W., Winters, H.D., Wondisford, A.R., and Greenberg, R.A. (2016). Break-induced telomere synthesis underlies alternative telomere maintenance. *Nature* *539*,

54–58.

Dion, V., Kalck, V., Horigome, C., Towbin, B.D., and Gasser, S.M. (2012). Increased mobility of double-strand breaks requires Mec1, Rad9 and the homologous recombination machinery. *Nat. Cell Biol.* *14*, 502–509.

Doe, C.L., and Whitby, M.C. (2004a). The involvement of Srs2 in post-replication repair and homologous recombination in fission yeast. *Nucleic Acids Res.* *32*, 1480–1491.

Doe, C.L., and Whitby, M.C. (2004b). The involvement of Srs2 in post-replication repair and homologous recombination in fission yeast. *Nucleic Acids Res.* *32*, 1480–1491.

Doe, C.L., Osman, F., Dixon, J., and Whitby, M.C. (2004). DNA repair by a Rad22-Mus81-dependent pathway that is independent of Rhp51. *Nucleic Acids Res.* *32*, 5570–5581.

Doksani, Y., Bermejo, R., Fiorani, S., Haber, J.E., and Foiani, M. (2009). Replicon Dynamics, Dormant Origin Firing, and Terminal Fork Integrity after Double-Strand Break Formation. *Cell* *137*, 247–258.

Dominguez-Sola, D., Ying, C.Y., Grandori, C., Ruggiero, L., Chen, B., Li, M., Galloway, D.A., Gu, W., Gautier, J., and Dalla-Favera, R. (2007). Non-transcriptional control of DNA replication by c-Myc. *Nature* *448*, 445–451.

Donnianni, R.A., and Symington, L.S. (2013). Break-induced replication occurs by conservative DNA synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *110*, 13475–13480.

Downs, J.A., Lowndes, N.F., and Jackson, S.P. (2000). A role for *Saccharomyces cerevisiae* histone H2A in DNA repair. *Nature* *408*, 1001–1004.

Dungrawala, H., Bhat, K.P., Le Meur, R., Chazin, W.J., Ding, X., Sharan, S.K., Wessel, S.R., Sathe, A.A., Zhao, R., and Cortez, D. (2017). RADX Promotes Genome Stability and Modulates Chemosensitivity by Regulating RAD51 at Replication Forks. *Mol. Cell* *67*, 374–386.e5.

Eapen, V. V., Sugawara, N., Tsabar, M., Wu, W.-H., and Haber, J.E. (2012). The *Saccharomyces cerevisiae* Chromatin Remodeler Fun30 Regulates DNA End Resection and Checkpoint Deactivation. *Mol. Cell. Biol.* *32*, 4727–4740.

Eaton, M.L., Galani, K., Kang, S., Bell, S.P., and Macalpine, D.M. (2010). Conserved nucleosome positioning defines replication origins service Conserved nucleosome positioning defines replication origins. *Genes Dev.* *24*, 748–753.

Edwards, R.J., Bentley, N.J., and Carr, a M. (1999). A Rad3-Rad26 complex responds to DNA damage independently of other checkpoint proteins. *Nat. Cell Biol.* *1*, 393–398.

Eid, W., Steger, M., El-Shemerly, M., Ferretti, L.P., Peña-Diaz, J., König, C., Valtorta, E., Sartori, A.A., and Ferrari, S. (2010). DNA end resection by CtIP and exonuclease 1 prevents genomic instability. *EMBO Rep.* *11*, 962–968.

Elango, R., Sheng, Z., Jackson, J., Decata, J., Ibrahim, Y., Pham, N.T., Liang, D.H., Sakofsky, C.J., Vindigni, A., Lobachev, K.S., et al. (2017). Break-induced replication promotes formation of lethal joint molecules dissolved by Srs2. *Nat. Commun.* *8*.

- Eydmann, T., Sommariva, E., Inagawa, T., Mian, S., Klar, A.J.S., and Dalgaard, J.Z. (2008). Rtf1-mediated eukaryotic site-specific replication termination. *Genetics* *180*, 27–39.
- Fabre, F. (1978). Induced intragenic recombination in yeast can occur during the G1 mitotic phase. *Nature* *272*, 795–798.
- Falck, J., Coates, J., and Jackson, S.P. (2005). Conserved modes of recruitment of ATM, ATR and DNA-PKcs to sites of DNA damage. *Nature* *434*, 605–611.
- Falck, J., Forment, J. V., Coates, J., Mistrik, M., Lukas, J., Bartek, J., and Jackson, S.P. (2012). CDK targeting of NBS1 promotes DNA-end resection, replication restart and homologous recombination. *EMBO Rep.* *13*, 561–568.
- Feng, W., and Jasin, M. (2017). BRCA2 suppresses replication stress-induced mitotic and G1 abnormalities through homologous recombination. *Nat. Commun.* *8*, 525.
- Feng, Z., Scott, S.P., Bussen, W., Sharma, G.G., Guo, G., Pandita, T.K., and Powell, S.N. (2011). Rad52 inactivation is synthetically lethal with BRCA2 deficiency. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *108*, 686–691.
- Ferguson, D.O., and Holloman, W.K. (1996). Recombinational repair of gaps in DNA is asymmetric in *Ustilago maydis* and can be explained by a migrating D-loop model. *Proc Natl Acad Sci U S A* *93*, 5419–5424.
- Fishman-Lobell, J., Rudin, N., and Haber, J.E. (1992). Two alternative pathways of double-strand break repair that are kinetically separable and independently modulated. *Mol. Cell. Biol.* *12*, 1292–1303.
- Fleck, O., and Nielsen, O. (2004). DNA repair. *J. Cell Sci.* *117*, 515–517.
- Follonier, C., Oehler, J., Herrador, R., and Lopes, M. (2013). Friedreich's ataxia-associated GAA repeats induce replication-fork reversal and unusual molecular junctions. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *20*, 486–494.
- Forment, J. V., Jackson, S.P., and Pellegrini, L. (2015). When two is not enough: A CtIP tetramer is required for DNA repair by homologous recombination. *Nucleus* *6*, 344–348.
- Formosa, T., and Alberts, B.M. (1986). DNA synthesis dependent on genetic recombination: Characterization of a reaction catalyzed by purified bacteriophage T4 proteins. *Cell* *47*, 793–806.
- Foster, S.S., Balestrini, A., and Petrini, J.H.J. (2011). Functional Interplay of the Mre11 Nuclease and Ku in the Response to Replication-Associated DNA Damage. *Mol. Cell. Biol.* *31*, 4379–4389.
- Fouché, N., Özgür, S., Roy, D., and Griffith, J.D. (2006). Replication fork regression in repetitive DNAs. *Nucleic Acids Res.* *34*, 6044–6050.
- Fragkos, M., Ganier, O., Coulombe, P., and Méchali, M. (2015). DNA replication origin activation in space and time. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *16*, 360–374.
- Froget, B., Blaisonneau, J., Lambert, S., and Baldacci, G. (2008). Cleavage of Stalled Forks by

Fission Yeast Mus81/Eme1 in Absence of DNA Replication Checkpoint. *Mol. Biol. Cell* **19**, 445–456.

Fu, H., Martin, M.M., Regairaz, M., Huang, L., You, Y., Lin, C.-M., Ryan, M., Kim, R., Shimura, T., Pommier, Y., et al. (2015). The DNA repair endonuclease Mus81 facilitates fast DNA replication in the absence of exogenous damage. *Nat. Commun.* **6**, 6746.

Fu, Y. V., Yardimci, H., Long, D.T., Ho, T.V., Guainazzi, A., Bermudez, V.P., Hurwitz, J., van Oijen, A., Schärer, O.D., and Walter, J.C. (2011). Selective bypass of a lagging strand roadblock by the eukaryotic replicative DNA helicase. *Cell* **146**, 931–941.

Fugger, K., Mistrik, M., Neelsen, K.J., Yao, Q., Zellweger, R., Kousholt, A.N., Haahr, P., Chu, W.K., Bartek, J., Lopes, M., et al. (2015). FBH1 Catalyzes Regression of Stalled Replication Forks. *Cell Rep.* **10**, 1749–1757.

Gadaleta, M., and Noguchi, E. (2017). Regulation of DNA Replication through Natural Impediments in the Eukaryotic Genome. *Genes (Basel)*. **8**, 98.

Gaillard, H., García-Muse, T., and Aguilera, A. (2015). Replication stress and cancer. *Nat. Rev. Cancer* **15**, 276–289.

Gallea, C., Popa, T., Hubsch, C., Valabregue, R., Brochard, V., Kundu, P., Schmitt, B., Bardinet, E., Bertasi, E., Flamand-Roze, C., et al. (2013). RAD51 deficiency disrupts the corticospinal lateralization of motor control. *Brain* **136**, 3333–3346.

Gallo-Fernández, M., Saugar, I., Ortiz-Bazán, M.Á., Vázquez, M.V., and Tercero, J.A. (2012). Cell cycle-dependent regulation of the nuclease activity of Mus81-Eme1/Mms4. *Nucleic Acids Res.* **40**, 8325–8335.

Game, J.C., and Mortimer, R.K. (1974). A genetic study of x-ray sensitive mutants in yeast. *Mutat. Res.* **24**, 281–292.

Gangloff, S., Soustelle, C., and Fabre, F. (2000). Homologous recombination is responsible for cell death in the absence of the Sgs1 and Srs2 helicases. *Nat. Genet.* **25**, 192–194.

García-Benítez, F., Gaillard, H., and Aguilera, A. (2017). Physical proximity of chromatin to nuclear pores prevents harmful R loop accumulation contributing to maintain genome stability. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **114**, 10942–10947.

García-Rubio, M.L., Pérez-Calero, C., Barroso, S.I., Tumini, E., Herrera-Moyano, E., Rosado, I. V., and Aguilera, A. (2015). The Fanconi Anemia Pathway Protects Genome Integrity from R-loops. *PLoS Genet.* **11**, e1005674.

Garcia, V., Phelps, S.E.L., Gray, S., and Neale, M.J. (2012). UKPMC Funders Group. **479**, 241–244.

Gari, K., Décaillet, C., Stasiak, A.Z., Stasiak, A., and Constantinou, A. (2008). The Fanconi Anemia Protein FANCM Can Promote Branch Migration of Holliday Junctions and Replication Forks. *Mol. Cell* **29**, 141–148.

- Ge, X.Q., Jackson, D.A., and Blow, J.J. (2007). Dormant origins licensed by excess Mcm2 7 are required for human cells to survive replicative stress. *Genes Dev.* *21*, 3331–3341.
- Gelot, C., Magdalou, I., and Lopez, B.S. (2015). Replication stress in mammalian cells and its consequences for mitosis. *Genes (Basel)*. *6*, 267–298.
- Germann, S.M., Schramke, V., Pedersen, R.T., Gallina, I., Eckert-Boulet, N., Oestergaard, V.H., and Lisby, M. (2014). TopBP1/Dpb11 binds DNA anaphase bridges to prevent genome instability. *J. Cell Biol.* *204*, 45–59.
- Glover, T.W., Berger, C., Coyle, J., and Echo, B. (1984). DNA polymerase alpha inhibition by aphidicolin induces gaps and breaks at common fragile sites in human chromosomes. *Hum. Genet.* *67*, 136–142.
- Goedecke, W., Pfeiffer, P., and Vielmetter, W. (1994). Nonhomologous DNA end joining in *Schizosaccharomyces pombe* efficiently eliminates DNA double-strand-breaks from haploid sequences. *Nucleic Acids Res.* *22*, 2094–2101.
- González-Prieto, R., Muñoz-Cabello, A.M., Cabello-Lobato, M.J., and Prado, F. (2013). Rad51 replication fork recruitment is required for DNA damage tolerance. *EMBO J.* *32*, 1307–1321.
- Gorgoulis, V.G., Vassiliou, L.-V.F., Karakaidos, P., Zacharatos, P., Kotsinas, A., Liloglou, T., Venere, M., Ditullio, R.A., Kastriakis, N.G., Levy, B., et al. (2005). Activation of the DNA damage checkpoint and genomic instability in human precancerous lesions. *Nature* *434*, 907–913.
- Grabarz, A., Barascu, A., Guirouilh-Barbat, J., and Lopez, B.S. (2012). Initiation of DNA double strand break repair: signaling and single-stranded resection dictate the choice between homologous recombination, non-homologous end-joining and alternative end-joining. *Am J Cancer Res* *2*, 249–268.
- Grabarz, A., Guirouilh-Barbat, J., Barascu, A., Pennarun, G., Genet, D., Rass, E., Germann, S.M., Bertrand, P., Hickson, I.D., and 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 Rep.* *5*, 21–28.
- Gravel, S., Chapman, J.R., Magill, C., and Jackson, S.P. (2008). DNA helicases Sgs1 and BLM promote DNA double-strand break resection. *Genes Dev.* *22*, 2767–2772.
- Grenon, M., Gilbert, C., and Lowndes, N.F. (2001). Checkpoint activation in response to double-strand breaks requires the Mre11/Rad50/Xrs2 complex. *Nat. Cell Biol.* *3*, 844–847.
- Guirouilh-Barbat, J., Huck, S., Bertrand, P., Pirzio, L., Desmaze, C., Sabatier, L., and Lopez, B.S. (2004). Impact of the KU80 pathway on NHEJ-induced genome rearrangements in mammalian cells. *Mol. Cell* *14*, 611–623.
- Guirouilh-Barbat, J., Rass, E., Plo, I., Bertrand, P., and Lopez, B.S. (2007). Defects in XRCC4 and KU80 differentially affect the joining of distal nonhomologous ends. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *104*, 20902–20907.

- Haahr, P., Hoffmann, S., Tollenaere, M.A.X., Ho, T., Toledo, L.I., Mann, M., Bekker-Jensen, S., Räschle, M., and Mailand, N. (2016). Activation of the ATR kinase by the RPA-binding protein ETAA1. *Nat. Cell Biol.* *18*, 1196–1207.
- Hanada, K., Budzowska, M., Davies, S.L., van Drunen, E., Onizawa, H., Beverloo, H.B., Maas, A., Essers, J., Hickson, I.D., and Kanaar, R. (2007). The structure-specific endonuclease Mus81 contributes to replication restart by generating double-strand DNA breaks. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *14*, 1096–1104.
- Hardy, J., Churikov, D., Géli, V., and Simon, M.-N. (2014). Sgs1 and Sae2 promote telomere replication by limiting accumulation of ssDNA. *Nat. Commun.* *5*, 5004.
- Hartsuiker, E., Vaessen, E., Carr, A.M., and Kohli, J. (2001). Fission yeast Rad50 stimulates sister chromatid recombination and links cohesion with repair. *EMBO J.* *20*, 6660–6671.
- Hartsuiker, E., Mizuno, K., Molnar, M., Kohli, J., Ohta, K., and Carr, A.M. (2009). Ctp1CtIP and Rad32Mre11 Nuclease Activity Are Required for Rec12Spo11 Removal, but Rec12Spo11 Removal Is Dispensable for Other MRN-Dependent Meiotic Functions. *Mol. Cell. Biol.* *29*, 1671–1681.
- Haruta, N., Kurokawa, Y., Murayama, Y., Akamatsu, Y., Unzai, S., Tsutsui, Y., and Iwasaki, H. (2006). The Swi5-Sfr1 complex stimulates Rhp51/Rad51 - and Dmc1-mediated DNA strand exchange in vitro. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *13*, 823–830.
- Hashimoto, Y., Ray Chaudhuri, A., Lopes, M., and Costanzo, V. (2010). Rad51 protects nascent DNA from Mre11-dependent degradation and promotes continuous DNA synthesis. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *17*, 1305–1311.
- Hashimoto, Y., Puddu, F., and Costanzo, V. (2011). RAD51- and MRE11-dependent reassembly of uncoupled CMG helicase complex at collapsed replication forks. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *19*, 17–24.
- Hastings, P.J., Ira, G., and Lupski, J.R. (2009). A microhomology-mediated break-induced replication model for the origin of human copy number variation. *PLoS Genet.* *5*, e1000327.
- Heddle, J.A., Cimino, M.C., Hayashi, M., Romagna, F., Shelby, M.D., Tucker, J.D., Vanparys, P., and MacGregor, J.T. (1991). Micronuclei as an index of cytogenetic damage: past, present, and future. *Environ. Mol. Mutagen.* *18*, 277–291.
- Heichinger, C., Penkett, C.J., Bähler, J., and Nurse, P. (2006). Genome-wide characterization of fission yeast DNA replication origins. *EMBO J.* *25*, 5171–5179.
- Helleday, T., Eshtad, S., and Nik-Zainal, S. (2014). Mechanisms underlying mutational signatures in human cancers. *Nat. Rev. Genet.* *15*, 585–598.
- Heller, R.C., and Marians, K.J. (2006a). Replication fork reactivation downstream of a blocked nascent leading strand. *Nature* *439*, 557–562.
- Heller, R.C., and Marians, K.J. (2006b). Replisome assembly and the direct restart of stalled replication forks. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *7*, 932–943.

Hengeveld, R.C.C., de Boer, H.R., Schoonen, P.M., de Vries, E.G.E., Lens, S.M.A., and van Vugt, M.A.T.M. (2015). Rif1 Is Required for Resolution of Ultrafine DNA Bridges in Anaphase to Ensure Genomic Stability. *Dev. Cell* 34, 466–474.

Hentges, P., Van Driessche, B., Tafforeau, L., Vandenhaute, J., and Carr, A.M. (2005). Three novel antibiotic marker cassettes for gene disruption and marker switching in *Schizosaccharomyces pombe*. *Yeast* 22, 1013–1019.

Hicks, W.M., Kim, M., and Haber, J.E. (2010). Increased mutagenesis and unique mutation signature associated with mitotic gene conversion. *Science* 329, 82–85.

Higgins, N.P., Kato, K., and Strauss, B. (1976). A model for replication repair in mammalian cells. *J. Mol. Biol.* 101, 417–425.

Higgs, M.R., and Stewart, G.S. (2016). Protection or resection: BOD1L as a novel replication fork protection factor. *Nucleus* 7, 34–40.

Higgs, M.R., Reynolds, J.J., Winczura, A., Blackford, A.N., Borel, V., Miller, E.S., Zlatanou, A., Nieminuszczy, J., Ryan, E.L., Davies, N.J., et al. (2015). BOD1L Is Required to Suppress Deleterious Resection of Stressed Replication Forks. *Mol. Cell* 59, 462–477.

Hoffman, C.S., Wood, V., and Fantes, P.A. (2015). An Ancient Yeast for Young Geneticists: A Primer on the *Schizosaccharomyces pombe* Model System. *Genetics* 201, 403–423.

Holliday, R. (1964). A mechanism for gene conversion in fungi. *Genet. Res.* 5, 282–304.

Hu, J., Sun, L., Shen, F., Chen, Y., Hua, Y., Liu, Y., Zhang, M., Hu, Y., Wang, Q., Xu, W., et al. (2012). The Intra-S Phase Checkpoint Targets Dna2 to Prevent Stalled Replication Forks from Reversing. *Cell* 149, 1221–1232.

Huang, Y., Fenech, M., and Shi, Q. (2011). Micronucleus formation detected by live-cell imaging. *Mutagenesis* 26, 133–138.

Huertas, P., and Jackson, S.P. (2009). Human CtIP Mediates Cell Cycle Control of DNA End Resection and Double Strand Break Repair. *J. Biol. Chem.* 284, 9558–9565.

Huertas, P., Cortés-Ledesma, F., Sartori, A.A., Aguilera, A., and Jackson, S.P. (2008). CDK targets Sae2 to control DNA-end resection and homologous recombination. *Nature* 455, 689–692.

Iannascoli, C., Palermo, V., Murfunì, I., Franchitto, A., and Pichierri, P. (2015). The WRN exonuclease domain protects nascent strands from pathological MRE11/EXO1-dependent degradation. *Nucleic Acids Res.* 43, gkv836.

Ibarra, A., Schwob, E., and Méndez, J. (2008). Excess MCM proteins protect human cells from replicative stress by licensing backup origins of replication. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 105, 8956–8961.

Ira, G., and Haber, J.E. (2002). Characterization of RAD51 -Independent Break-Induced Replication That Acts Preferentially with Short Homologous Sequences Characterization of RAD51 -Independent Break-Induced Replication That Acts Preferentially with Short

Homologous Sequences. 22, 6384–6392.

Ira, G., Pellicoli, A., Balijja, A., Wang, X., Fiorani, S., Carotenuto, W., Liberi, G., Bressan, D., Wan, L., Hollingsworth, N.M., et al. (2004). DNA end resection, homologous recombination and DNA damage checkpoint activation require CDK1. *Nature* 431, 1011–1017.

Iraqi, I., Chekkal, Y., Jmari, N., Pietrobon, V., Fréon, K., Costes, A., and Lambert, S.A.E. (2012). Recovery of arrested replication forks by homologous recombination is error-prone. *PLoS Genet.* 8, e1002976.

Ishimi, Y. (1997). A DNA helicase activity is associated with an MCM4, -6, and -7 protein complex. *J. Biol. Chem.* 272, 24508–24513.

Ismail, I.H., Gagné, J.P., Genois, M.M., Strickfaden, H., McDonald, D., Xu, Z., Poirier, G.G., Masson, J.Y., and Hendzel, M.J. (2015). The RNF138 E3 ligase displaces Ku to promote DNA end resection and regulate DNA repair pathway choice. *Nat. Cell Biol.* 17, 1446–1457.

Ivanov, E.L., and Haber, J.E. (1995). RAD1 and RAD10, but not other excision repair genes, are required for double-strand break-induced recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 15, 2245–2251.

Ivanov, E.L., Sugawara, N., Fishman-Lobell, J., and Haber, J.E. (1996). Genetic requirements for the single-strand annealing pathway of double-strand break repair in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 142, 693–704.

Iyer, D., and Rhind, N. (2017). The Intra-S Checkpoint Responses to DNA Damage. *Genes (Basel)*. 8, 74.

De Jager, M., Van Noort, J., Van Gent, D.C., Dekker, C., Kanaar, R., and Wyman, C. (2001). Human Rad50/Mre11 is a flexible complex that can tether DNA ends. *Mol. Cell* 8, 1129–1135.

Jain, S., Sugawara, N., Lydeard, J., Vaze, M., Gac, N.T. Le, and Haber, J.E. (2009). A recombination execution checkpoint regulates the choice of homologous recombination pathway during DNA double-strand break repair. *Genes Dev.* 23, 291–303.

Jazayeri, A., Balestrini, A., Garner, E., Haber, J.E., and Costanzo, V. (2008). Mre11-Rad50-Nbs1-dependent processing of DNA breaks generates oligonucleotides that stimulate ATM activity. *EMBO J.* 27, 1953–1962.

Jdey, W., Thierry, S., Popova, T., Stern, M.-H., and Dutreix, M. (2017). Micronuclei Frequency in Tumors Is a Predictive Biomarker for Genetic Instability and Sensitivity to the DNA Repair Inhibitor AsiDNA. *Cancer Res.* 77, 4207–4216.

Jensen, K.L., and Russell, P. (2016). Ctp1-dependent clipping and resection of DNA double-strand breaks by Mre11 endonuclease complex are not genetically separable. *Nucleic Acids Res.* 44, 8241–8249.

Jensen, R.B., Carreira, A., and Kowalczykowski, S.C. (2010). Purified human BRCA2 stimulates RAD51-mediated recombination. *Nature* 467, 678–683.

Jiricny, J. (2006). The multifaceted mismatch-repair system. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 7, 335–

346.

Jones, R.M., Mortusewicz, O., Afzal, I., Lorvellec, M., García, P., Helleday, T., and Petermann, E. (2013). Increased replication initiation and conflicts with transcription underlie Cyclin E-induced replication stress. *Oncogene* 32, 3744–3753.

Kagawa, W., Kurumizaka, H., Ikawa, S., Yokoyama, S., and Shibata, T. (2001). Homologous Pairing Promoted by the Human, Rad52 Protein. *J. Biol. Chem.* 276, 35201–35208.

Karanam, K., Kafri, R., Loewer, A., and Lahav, G. (2012). Quantitative Live Cell Imaging Reveals a Gradual Shift between DNA Repair Mechanisms and a Maximal Use of HR in Mid S Phase. *Mol. Cell* 47, 320–329.

Karanja, K.K., Lee, E.H., Hendrickson, E.A., and Campbell, J.L. (2014). Preventing over-resection by DNA2 helicase/nuclease suppresses repair defects in Fanconi anemia cells. *Cell Cycle* 13, 1540–1550.

Kawabata, T., Luebben, S.W., Yamaguchi, S., Ilves, I., Matise, I., Buske, T., Botchan, M.R., and Shima, N. (2011). Stalled fork rescue via dormant replication origins in unchallenged S phase promotes proper chromosome segregation and tumor suppression. *Mol. Cell* 41, 543–553.

Kaykov, A., and Nurse, P. (2015). The spatial and temporal organization of origin firing during the S-phase of fission yeast. *Genome Res.* 25, 391–401.

Kesti, T., Flick, K., Keränen, S., Syväoja, J.E., and Wittenberg, C. (1999). DNA polymerase epsilon catalytic domains are dispensable for DNA replication, DNA repair, and cell viability. *Mol. Cell* 3, 679–685.

Kile, A.C., Chavez, D.A., Bacal, J., Eldirany, S., Korzhnev, D.M., Bezsonova, I., Eichman, B.F., and Cimprich, K.A. (2015). HLTf's Ancient HIRAN Domain Binds 3' DNA Ends to Drive Replication Fork Reversal. *Mol. Cell* 58, 1090–1100.

Kim, J.S., Krasieva, T.B., LaMorte, V., Malcolm, A., Taylor, R., and Yokomori, K. (2002). Specific recruitment of human cohesin to laser-induced DNA damage. *J. Biol. Chem.* 277, 45149–45153.

Kim, T.M., Son, M.Y., Dodds, S., Hu, L., and Hasty, P. (2014). Deletion of BRCA2 exon 27 causes defects in response to both stalled and collapsed replication forks. *Mutat. Res. Mol. Mech. Mutagen.* 766–767, 66–72.

Kim, W.J., Lee, H., Park, E.J., Park, J.K., and Park, S.D. (2001). Gain- and loss-of-function of Rhp51, a Rad51 homolog in fission yeast, reveals dissimilarities in chromosome integrity. *Nucleic Acids Res.* 29, 1724–1732.

Knutsen, J.H.J., Rein, I.D., Rothe, C., Stokke, T., Grallert, B., and Boye, E. (2011). Cell-cycle analysis of fission yeast cells by flow cytometry. *PLoS One* 6, e17175.

Kolinjivadi, A.M., Sannino, V., De Antoni, A., Zadorozhny, K., Kilkenny, M., Técher, H., Baldi, G., Shen, R., Ciccia, A., Pellegrini, L., et al. (2017a). Smarcal1-Mediated Fork Reversal Triggers Mre11-Dependent Degradation of Nascent DNA in the Absence of Brca2 and Stable Rad51

Nucleofilaments. *Mol. Cell* 67, 867–881.e7.

Kolinjivadi, A.M., Sannino, V., de Antoni, A., Técher, H., Baldi, G., and Costanzo, V. (2017b). Moonlighting at replication forks – a new life for homologous recombination proteins BRCA1, BRCA2 and RAD51. *FEBS Lett.* 591, 1083–1100.

Kowalczykowski, S.C., and Eggleston, A.K., Homologous pairing and DNA strand-exchange proteins. *Annu Rev Biochem.* 991–1043.

Krawczyk, P.M., Borovski, T., Stap, J., Cijssouw, T., Cate, R. t., Medema, J.P., Kanaar, R., Franken, N.A.P., and Aten, J.A. (2012). Chromatin mobility is increased at sites of DNA double-strand breaks. *J. Cell Sci.* 125, 2127–2133.

Krejci, L., Damborsky, J., Thomsen, B., Duno, M., and Bendixen, C. (2001). Molecular Dissection of Interactions between Rad51 and Members of the Recombination-Repair Group. *Mol. Cell. Biol.* 21, 966–976.

Krejci, L., Song, B., Bussen, W., Rothstein, R., Mortensen, U.H., and Sung, P. (2002). Interaction with Rad51 is indispensable for recombination mediator function of Rad52. *J. Biol. Chem.* 277, 40132–40141.

Krejci, L., Altmannova, V., Spirek, M., and Zhao, X. (2012). Homologous recombination and its regulation. *Nucleic Acids Res.* 40, 5795–5818.

Krogh, B.O., Llorente, B., Lam, A., and Symington, L.S. (2005). Mutations in Mre11 Phosphoesterase Motif I That Impair *Saccharomyces cerevisiae* Mre11-Rad50-Xrs2 Complex Stability in Addition to Nuclease Activity. *Genetics* 171, 1561–1570.

Krokan, H.E., Standal, R., and Slupphaug, G. (1997). DNA glycosylases in the base excision repair of DNA. *Biochem. J.* 325 (Pt 1), 1–16.

Kumagai, A., Lee, J., Yoo, H.Y., and Dunphy, W.G. (2006). TopBP1 activates the ATR-ATRIP complex. *Cell* 124, 943–955.

Kuntz, K., and O’Connell, M.J. (2013). Initiation of DNA damage responses through XPG-related nucleases. *EMBO J.* 32, 290–302.

Labib, K. (2010). How do Cdc7 and cyclin-dependent kinases trigger the initiation of chromosome replication in eukaryotic cells? *Genes Dev.* 24, 1208–1219.

Lahkim Bennani-Belhaj, K., Rouzeau, S., Buhagiar-Labarchede, G., Chabosseau, P., Onclercq-Delic, R., Bayart, E., Cordelieres, F., Couturier, J., and Amor-Gueret, M. (2010). The Bloom Syndrome Protein Limits the Lethality Associated with RAD51 Deficiency. *Mol. Cancer Res.* 8, 385–394.

Lai, X., Broderick, R., Bergoglio, V., Zimmer, J., Badie, S., Niedzwiedz, W., Hoffmann, J.-S., and Tarsounas, M. (2017). MUS81 nuclease activity is essential for replication stress tolerance and chromosome segregation in BRCA2-deficient cells. *Nat. Commun.* 8, 15983.

Lambert, S., and Carr, A.M. (2005). Checkpoint responses to replication fork barriers. *Biochimie* 87, 591–602.

- Lambert, S., and Carr, A.M. (2013a). Impediments to replication fork movement: stabilisation, reactivation and genome instability. *Chromosoma* 122, 33–45.
- Lambert, S., and Carr, A.M. (2013b). Replication stress and genome rearrangements: lessons from yeast models. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 23, 132–139.
- Lambert, S., and Lopez, B.S. (2000). Characterization of mammalian RAD51 double strand break repair using non-lethal dominant-negative forms. *EMBO J.* 19, 3090–3099.
- Lambert, S., Watson, A., Sheedy, D.M., Martin, B., and Carr, A.M. (2005). Gross chromosomal rearrangements and elevated recombination at an inducible site-specific replication fork barrier. *Cell* 121, 689–702.
- Lambert, S., Mizuno, K., Blaisonneau, J., Martineau, S., Chanet, R., Fréon, K., Murray, J.M., Carr, A.M., and Baldacci, G. (2010). Homologous recombination restarts blocked replication forks at the expense of genome rearrangements by template exchange. *Mol. Cell* 39, 346–359.
- Langerak, P., Mejia-Ramirez, E., Limbo, O., and Russell, P. (2011). Release of Ku and MRN from DNA ends by Mre11 nuclease activity and Ctp1 is required for homologous recombination repair of double-strand breaks. *PLoS Genet.* 7, e1002271.
- Laulier, C., Cheng, A., and Stark, J.M. (2011a). The relative efficiency of homology-directed repair has distinct effects on proper anaphase chromosome separation. *Nucleic Acids Res.* 39, 5935–5944.
- Laulier, C., Cheng, A., and Stark, J.M. (2011b). The relative efficiency of homology-directed repair has distinct effects on proper anaphase chromosome separation. *Nucleic Acids Res.* 39, 5935–5944.
- Lazzerini-Denchi, E., and Sfeir, A. (2016). Stop pulling my strings — what telomeres taught us about the DNA damage response. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 17, 364–378.
- Lee-Theilen, M., Matthews, A.J., Kelly, D., Zheng, S., and Chaudhuri, J. (2011). CtIP promotes microhomology-mediated alternative end joining during class-switch recombination. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 18, 75–79.
- Lee, J., and Paull, T.T. (2004). Direct Activation of the ATM Protein Kinase by the Mre11 / Rad50 / Nbs1 Complex. *304*, 93–96.
- Lee, J., Kumagai, A., and Dunphy, W.G. (2001). Positive Regulation of Wee1 by Chk1 and 14-3-3 Proteins. *Mol. Biol. Cell* 12, 551–563.
- Lee, J., Shik Choi, E., David Seo, H., Kang, K., Gilmore, J.M., Florens, L., Washburn, M.P., Choe, J., Workman, J.L., and Lee, D. (2017). Chromatin remodeller Fun30Fft3 induces nucleosome disassembly to facilitate RNA polymerase II elongation. *Nat. Commun.* 8, 14527.
- Lee, S.E., Pellicioli, A., Vaze, M.B., Sugawara, N., Malkova, A., Foiani, M., and Haber, J.E. (2003). Yeast Rad52 and Rad51 recombination proteins define a second pathway of DNA damage assessment in response to a single double-strand break. *Mol. Cell. Biol.* 23, 8913–8923.

Lemaçon, D., Jackson, J., Quinet, A., Brickner, J.R., Li, S., Yazinski, S., You, Z., Ira, G., Zou, L., Mosammamarast, N., et al. (2017a). MRE11 and EXO1 nucleases degrade reversed forks and elicit MUS81-dependent fork rescue in BRCA2-deficient cells. *Nat. Commun.* **8**.

Lemaçon, D., Jackson, J., Quinet, A., Brickner, J.R., Li, S., Yazinski, S., You, Z., Ira, G., Zou, L., Mosammamarast, N., et al. (2017b). MRE11 and EXO1 nucleases degrade reversed forks and elicit MUS81-dependent fork rescue in BRCA2-deficient cells. *Nat. Commun.* **8**, 860.

Lengronne, A., and Pasero, P. (2014). Closing the MCM cycle at replication termination sites. *EMBO Rep.* **15**, 1226–1227.

Lengsfeld, B.M., Rattray, A.J., Bhaskara, V., Ghirlando, R., and Paull, T.T. (2007). Sae2 is an endonuclease that processes hairpin DNA cooperatively with the Mre11/Rad50/Xrs2 complex. *Mol. Cell* **28**, 638–651.

Letessier, A., Millot, G.A., Koundrioukoff, S., Lachagès, A.-M., Vogt, N., Hansen, R.S., Malfoy, B., Brison, O., and Debatisse, M. (2011). Cell-type-specific replication initiation programs set fragility of the FRA3B fragile site. *Nature* **470**, 120–123.

Li, X., and Heyer, W.D. (2009). RAD54 controls access to the invading 3'-OH end after RAD51-mediated DNA strand invasion in homologous recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res.* **37**, 638–646.

Li, L., Germain, D.R., Poon, H.-Y., Hildebrandt, M.R., Monckton, E.A., McDonald, D., Hendzel, M.J., and Godbout, R. (2016). DEAD Box 1 Facilitates Removal of RNA and Homologous Recombination at DNA Double-Strand Breaks. *Mol. Cell. Biol.* **36**, 2794–2810.

Li, Y., Wang, J., Zhou, G., Lajeunesse, M., Le, N., Stawicki, B.N., Corcino, Y.L., Berkner, K.L., and Runge, K.W. (2017). Nonhomologous end-joining with minimal sequence loss is promoted by the Mre11-Rad50-Nbs1-Ctp1 Complex in *Schizosaccharomyces pombe*. *Genetics* **206**, 481–496.

Lieber, M.R. (2010). The Mechanism of Double-Strand DNA Break Repair by the Nonhomologous DNA End-Joining Pathway. *Annu. Rev. Biochem.* **79**, 181–211.

Lim, D.S., and Hasty, P. (1996). A mutation in mouse rad51 results in an early embryonic lethal that is suppressed by a mutation in p53. *Mol. Cell. Biol.* **16**, 7133–7143.

Lim, G., and Huh, W.-K. (2017). Rad52 phosphorylation by Ipl1 and Mps1 contributes to Mps1 kinetochore localization and spindle assembly checkpoint regulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **114**, E9261–E9270.

Limbo, O., Chahwan, C., Yamada, Y., de Bruin, R.A.M., Wittenberg, C., and Russell, P. (2007). Ctp1 Is a Cell-Cycle-Regulated Protein that Functions with Mre11 Complex to Control Double-Strand Break Repair by Homologous Recombination. *Mol. Cell* **28**, 134–146.

Lin, F.L., Sperle, K., and Sternberg, N. (1984). Model for homologous recombination during transfer of DNA into mouse L cells: role for DNA ends in the recombination process. *Mol. Cell. Biol.* **4**, 1020–1034.

- Lin, F.L., Sperle, K., and Sternberg, N. (1990). Intermolecular recombination between DNAs introduced into mouse L cells is mediated by a nonconservative pathway that leads to crossover products. *Mol. Cell. Biol.* *10*, 103–112.
- Lisby, M., Rothstein, R., and Mortensen, U.H. (2001). Rad52 forms DNA repair and recombination centers during S phase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *98*, 8276–8282.
- Liu, J., Renault, L., Veaute, X., Fabre, F., Stahlberg, H., and Heyer, W.-D. (2011). Rad51 paralogues Rad55-Rad57 balance the antirecombinase Srs2 in Rad51 filament formation. *Nature* *479*, 245–248.
- Liu, Y., Nielsen, C.F., Yao, Q., and Hickson, I.D. (2014). The origins and processing of ultra fine anaphase DNA bridges. *Curr. Opin. Genet. Dev.* *26*, 1–5.
- Llorente, B., and Symington, L.S. (2004). The Mre11 Nuclease Is Not Required for 5' to 3' Resection at Multiple HO-Induced Double-Strand Breaks. *Mol. Cell. Biol.* *24*, 9682–9694.
- Lloyd, J., Chapman, J.R., Clapperton, J.A., Haire, L.F., Hartsuiker, E., Li, J., Carr, A.M., Jackson, S.P., and Smerdon, S.J. (2009). A Supramodular FHA/BRCT-Repeat Architecture Mediates Nbs1 Adaptor Function in Response to DNA Damage. *Cell* *139*, 100–111.
- Lomonosov, M., Anand, S., Sangrithi, M., Davies, R., and Venkitaraman, A.R. (2003). Stabilization of stalled DNA replication forks by the BRCA2 breast cancer susceptibility protein. *Genes Dev.* *17*, 3017–3022.
- Long, D.T., Raschle, M., Joukov, V., and Walter, J.C. (2011). Mechanism of RAD51-Dependent DNA Interstrand Cross-Link Repair. *Science* (80-.). *333*, 84–87.
- Lopes, M., Cotta-Ramusino, C., Pellicoli, A., Liberi, G., Plevani, P., Muzi-Falconi, M., Newlon, C.S., and Foiani, M. (2001). The DNA replication checkpoint response stabilizes stalled replication forks. *Nature* *412*, 557–561.
- Lopes, M., Foiani, M., and Sogo, J.M. (2006). Multiple Mechanisms Control Chromosome Integrity after Replication Fork Uncoupling and Restart at Irreparable UV Lesions. *Mol. Cell* *21*, 15–27.
- Lorenz, A., Mehats, A., Osman, F., and Whitby, M.C. (2014). Rad51/Dmc1 paralogs and mediators oppose DNA helicases to limit hybrid DNA formation and promote crossovers during meiotic recombination. *Nucleic Acids Res.* *42*, 13723–13735.
- Lubelsky, Y., Sasaki, T., Kuipers, M.A., Lucas, I., Le Beau, M.M., Carignon, S., Debatisse, M., Prinz, J.A., Dennis, J.H., and Gilbert, D.M. (2011). Pre-replication complex proteins assemble at regions of low nucleosome occupancy within the Chinese hamster dihydrofolate reductase initiation zone. *Nucleic Acids Res.* *39*, 3141–3155.
- Luciano, P., Coulon, S., Faure, V., Corda, Y., Bos, J., Brill, S.J., Gilson, E., Simon, M.-N., and Géli, V. (2012). RPA facilitates telomerase activity at chromosome ends in budding and fission yeasts. *EMBO J.* *31*, 2034–2046.
- Lukas, C., Melander, F., Stucki, M., Falck, J., Bekker-Jensen, S., Goldberg, M., Lerenthal, Y.,

Jackson, S.P., Bartek, J., and Lukas, J. (2004). Mdc1 couples DNA double-strand break recognition by Nbs1 with its H2AX-dependent chromatin retention. *EMBO J.* *23*, 2674–2683.

Lutzmann, M., and Méchali, M. (2008). MCM9 binds Cdt1 and is required for the assembly of prereplication complexes. *Mol. Cell* *31*, 190–200.

Lutzmann, M., Maiorano, D., and Méchali, M. (2006). A Cdt1–geminin complex licenses chromatin for DNA replication and prevents rereplication during S phase in *Xenopus*. *EMBO J.* *25*, 5764–5774.

Lydeard, J.R., Jain, S., Yamaguchi, M., and Haber, J.E. (2007). Break-induced replication and telomerase-independent telomere maintenance require Pol32. *Nature* *448*, 820–823.

Lydeard, J.R., Lipkin-Moore, Z., Jain, S., Eapen, V. V., and Haber, J.E. (2010a). Sgs1 and Exo1 redundantly inhibit break-induced replication and de Novo telomere addition at broken chromosome ends. *PLoS Genet.* *6*, 25.

Lydeard, J.R., Lipkin-Moore, Z., Sheu, Y.J., Stillman, B., Burgers, P.M., and Haber, J.E. (2010b). Break-induced replication requires all essential DNA replication factors except those specific for pre-RC assembly. *Genes Dev.* *24*, 1133–1144.

Ma, J.-L., Kim, E.M., Haber, J.E., and Lee, S.E. (2003). Yeast Mre11 and Rad1 Proteins Define a Ku-Independent Mechanism To Repair Double-Strand Breaks Lacking Overlapping End Sequences. *Mol. Cell. Biol.* *23*, 8820–8828.

Ma, L., Milman, N., Nambiar, M., and Smith, G.R. (2015). Two separable functions of Ctp1 in the early steps of meiotic DNA double-strand break repair. *Nucleic Acids Res.* *43*, 7349–7359.

Maculins, T., Nkosi, P.J., Nishikawa, H., and Labib, K. (2015). Tethering of SCFDia2 to the Replisome Promotes Efficient Ubiquitylation and Disassembly of the CMG Helicase. *Curr. Biol.* *25*, 2254–2259.

Maine, G.T., Sinha, P., and Tye, B.K. (1984). Mutants of *S. cerevisiae* defective in the maintenance of minichromosomes. *Genetics* *106*, 365–385.

Makharashvili, N., Tubbs, A.T., Yang, S.H., Wang, H., Barton, O., Zhou, Y., Deshpande, R. a., Lee, J.H., Lobrich, M., Sleckman, B.P., et al. (2014). Catalytic and Noncatalytic Roles of the CtIP Endonuclease in Double-Strand Break End Resection. *Mol. Cell* *54*, 1022–1033.

Malkova, A., Ivanov, E.L., and Haber, J.E. (1996). Double-strand break repair in the absence of RAD51 in yeast: a possible role for break-induced DNA replication. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *93*, 7131–7136.

Malkova, A., Naylor, M.L., Yamaguchi, M., Ira, G., and Haber, J.E. (2005). Replication Differs in Kinetics and Checkpoint Responses from RAD51 -Mediated Gene Conversion RAD51 -Dependent Break-Induced Replication Differs in Kinetics and Checkpoint Responses from RAD51 -Mediated Gene Conversion. *Mol. Cell. Biol.* *25*, 933–944.

Mankouri, H.W., Ashton, T.M., and Hickson, I.D. (2011). Holliday junction-containing DNA structures persist in cells lacking Sgs1 or Top3 following exposure to DNA damage. *Proc. Natl.*

Acad. Sci. 108, 4944–4949.

Mankouri, H.W., Huttner, D., and Hickson, I.D. (2013). How unfinished business from S-phase affects mitosis and beyond. *EMBO J.* 32, 2661–2671.

Manolis, K.G., Nimmo, E.R., Hartsuiker, E., Carr, A.M., Jeggo, P.A., and Allshire, R.C. (2001). Novel functional requirements for non-homologous DNA end joining in *Schizosaccharomyces pombe*. *EMBO J.* 20, 210–221.

Mao, Z., Bozzella, M., Seluanov, A., and Gorbunova, V. (2008). DNA repair by nonhomologous end joining and homologous recombination during cell cycle in human cells. *Cell Cycle* 7, 2902–2906.

Di Marco, S., Hasanova, Z., Kanagaraj, R., Chappidi, N., Altmannova, V., Menon, S., Sedlackova, H., Langhoff, J., Surendranath, K., Hühn, D., et al. (2017). RECQ5 Helicase Cooperates with MUS81 Endonuclease in Processing Stalled Replication Forks at Common Fragile Sites during Mitosis. *Mol. Cell* 66, 658–671.e8.

Maric, M., Maculins, T., De Piccoli, G., and Labib, K. (2014). Cdc48 and a ubiquitin ligase drive disassembly of the CMG helicase at the end of DNA replication. *Science* 346, 1253596.

Mariezcurrena, A., and Uhlmann, F. (2017). Observation of DNA intertwinings along authentic budding yeast chromosomes. *Genes Dev.* 31, 2151–2161.

Marrero, V.A., and Symington, L.S. (2010). Extensive DNA end processing by Exo1 and Sgs1 inhibits break-induced replication. *PLoS Genet.* 6, 1–11.

Maryon, E., and Carroll, D. (1991). Involvement of single-stranded tails in homologous recombination of DNA injected into *Xenopus laevis* oocyte nuclei. *Mol. Cell. Biol.* 11, 3268–3277.

Masson, J.Y., Tarsounas, M.C., Stasiak, A.Z., Stasiak, A., Shah, R., McIlwraith, M.J., Benson, F.E., and West, S.C. (2001). Identification and purification of two distinct complexes containing the five RAD51 paralogs. *Genes Dev.* 15, 3296–3307.

Mathiasen, D.P., and Lisby, M. (2014). Cell cycle regulation of homologous recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Rev.* 38, 172–184.

Matos, J., Blanco, M.G., Maslen, S., Skehel, J.M., and West, S.C. (2011). Regulatory Control of the Resolution of DNA Recombination Intermediates during Meiosis and Mitosis. *Cell* 147, 158–172.

Mayle, R., Campbell, I.M., Beck, C.R., Yu, Y., Wilson, M., Shaw, C.A., Bjergbaek, L., Lupski, J.R., and Ira, G. (2015). DNA REPAIR. Mus81 and converging forks limit the mutagenicity of replication fork breakage. *Science* 349, 742–747.

Mazin, A. V., Alexeev, A.A., and Kowalczykowski, S.C. (2003). A novel function of Rad54 protein: Stabilization of the Rad51 nucleoprotein filament. *J. Biol. Chem.* 278, 14029–14036.

McVey, M., and Lee, S.E. (2008). MMEJ repair of double-strand breaks (director's cut): deleted sequences and alternative endings. *Trends Genet.* 24, 529–538.

- Mehta, A., and Haber, J.E. (2014). Sources of DNA Double-Strand Breaks and Models of Rec. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* *6*, 1–19.
- Menetski, J.P., Bear, D.G., and Kowalczykowski, S.C. (1990). Stable DNA heteroduplex formation catalyzed by the *Escherichia coli* RecA protein in the absence of ATP hydrolysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* *87*, 21–25.
- Meselson, M.S., and Radding, C.M. (1975). A general model for genetic recombination. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *72*, 358–361.
- Michel, B., Boubakri, H., Baharoglu, Z., Lemasson, M., and Lestini, R. (2007). Recombination proteins and rescue of arrested replication forks. *DNA Repair (Amst).* *6*, 967–980.
- Michl, J., Zimmer, J., Buffa, F.M., McDermott, U., and Tarsounas, M. (2016). FANCD2 limits replication stress and genome instability in cells lacking BRCA2. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *23*, 755–757.
- Mijic, S., Zellweger, R., Chappidi, N., Berti, M., Jacobs, K., Mutreja, K., Ursich, S., Ray Chaudhuri, A., Nussenzweig, A., Janscak, P., et al. (2017). Replication fork reversal triggers fork degradation in BRCA2-defective cells. *Nat. Commun.* *8*, 1–11.
- Milne, G.T., and Weaver, D.T. (1993). Dominant negative alleles of RAD52 reveal a DNA repair/recombination complex including Rad51 and Rad52. *Genes Dev.* *7*, 1755–1765.
- Mimitou, E.P., and Symington, L.S. (2008). Sae2, Exo1 and Sgs1 collaborate in DNA double-strand break processing. *Nature* *455*, 770–774.
- Mimitou, E.P., and Symington, L.S. (2009). Nucleases and helicases take center stage in homologous recombination. *Trends Biochem. Sci.* *34*, 264–272.
- Mimitou, E.P., and Symington, L.S. (2010). Ku prevents Exo1 and Sgs1-dependent resection of DNA ends in the absence of a functional MRX complex or Sae2. *EMBO J.* *29*, 3358–3369.
- Min, J., Wright, W.E., and Shay, J.W. (2017). Alternative Lengthening of Telomeres Mediated by Mitotic DNA Synthesis Engages Break-Induced Replication Processes. *Mol. Cell. Biol.* *37*.
- Miné-Hattab, J., and Rothstein, R. (2012). Increased chromosome mobility facilitates homology search during recombination. *Nat. Cell Biol.* *14*, 510–517.
- Minocherhomji, S., Ying, S., Bjerregaard, V.A., Bursomanno, S., Aleliunaite, A., Wu, W., Mankouri, H.W., Shen, H., Liu, Y., and Hickson, I.D. (2015). Replication stress activates DNA repair synthesis in mitosis. *Nature* *528*, 286–290.
- Miyabe, I., Kunkel, T.A., and Carr, A.M. (2011). The Major Roles of DNA Polymerases Epsilon and Delta at the Eukaryotic Replication Fork Are Evolutionarily Conserved. *PLoS Genet.* *7*, e1002407.
- Miyabe, I., Mizuno, K., Keszthelyi, A., Daigaku, Y., Skouteri, M., Mohebi, S., Kunkel, T.A., Murray, J.M., and Carr, A.M. (2015). Polymerase δ replicates both strands after homologous recombination-dependent fork restart. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *22*, 932–938.

- Mizuno, K., Lambert, S., Baldacci, G., Murray, J.M., and Carr, A.M. (2009). Nearby inverted repeats fuse to generate acentric and dicentric palindromic chromosomes by a replication template exchange mechanism. *Genes Dev.* *23*, 2876–2886.
- Mizuno, K., Miyabe, I., Schalbetter, S.A., Carr, A.M., and Murray, J.M. (2013). Recombination-restarted replication makes inverted chromosome fusions at inverted repeats. *Nature* *493*, 246–249.
- Mohebi, S., Mizuno, K., Watson, A., Carr, A.M., and Murray, J.M. (2015). Checkpoints are blind to replication restart and recombination intermediates that result in gross chromosomal rearrangements. *Nat. Commun.* *6*, 6357.
- Moore, J.K., and Haber, J.E. (1996). Cell cycle and genetic requirements of two pathways of nonhomologous end-joining repair of double-strand breaks in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* *16*, 2164–2173.
- Moreau, S., Ferguson, J.R., and Symington, L.S. (1999). The nuclease activity of Mre11 is required for meiosis but not for mating type switching, end joining, or telomere maintenance. *Mol. Cell. Biol.* *19*, 556–566.
- Moreno, S., Klar, A., and Nurse, P. (1991). Molecular genetic analysis of fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Methods Enzymol.* *194*, 795–823.
- Moreno, S.P., Bailey, R., Campion, N., Herron, S., and Gambus, A. (2014). Polyubiquitylation drives replisome disassembly at the termination of DNA replication. *Science* *346*, 477–481.
- Morgan, E.A., Shah, N., and Symington, L.S. (2002). The requirement for ATP hydrolysis by *Saccharomyces cerevisiae* Rad51 is bypassed by mating-type heterozygosity or RAD54 in high copy. *Mol. Cell. Biol.* *22*, 6336–6343.
- Moriel-Carretero, M., and Aguilera, A. (2010). A postincision-deficient TFIIH causes replication fork breakage and uncovers alternative Rad51- or Pol32-mediated restart mechanisms. *Mol. Cell* *37*, 690–701.
- Morita, T., Yoshimura, Y., Yamamoto, A., Murata, K., Mori, M., Yamamoto, H., and Matsushiro, A. (1993). A mouse homolog of the *Escherichia coli* recA and *Saccharomyces cerevisiae* RAD51 genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *90*, 6577–6580.
- Moyer, S.E., Lewis, P.W., and Botchan, M.R. (2006). Isolation of the Cdc45/Mcm2-7/GINS (CMG) complex, a candidate for the eukaryotic DNA replication fork helicase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *103*, 10236–10241.
- Murayama, Y., Samora, C.P., Kurokawa, Y., Iwasaki, H., and Uhlmann, F. (2018). Establishment of DNA-DNA Interactions by the Cohesin Ring. *Cell* *172*, 465–477.e15.
- Murfuni, I., Nicolai, S., Baldari, S., Crescenzi, M., Bignami, M., Franchitto, A., and Pichierri, P. (2013). The WRN and MUS81 proteins limit cell death and genome instability following oncogene activation. *Oncogene* *32*, 610–620.
- Murina, O., von Aesch, C., Karakus, U., Ferretti, L.P., Bolck, H.A., Hänggi, K., and Sartori, A.A.

(2014). FANCD2 and CtIP Cooperate to Repair DNA Interstrand Crosslinks. *Cell Rep.* 7, 1030–1038.

Muris, D.F.R., Vreeken, K., Carr, A.M., Brogton, B.C., Lehmann, A.R., Lohman, P.H.M., and Pastink, A. (1993). Cloning the RAD51 homologue of *Schizosaccharomyces pombe*. *Nucleic Acids Res.* 21, 4586–4591.

Murray, J.M., Watson, A.T., and Carr, A.M. (2016a). Molecular Genetic Tools and Techniques in Fission Yeast. *Cold Spring Harb. Protoc.* 2016, pdb.top087601.

Murray, J.M., Watson, A.T., and Carr, A.M. (2016b). Molecular Genetic Tools and Techniques in Fission Yeast.

Myler, L.R., Gallardo, I.F., Zhou, Y., Gong, F., Yang, S.-H., Wold, M.S., Miller, K.M., Paull, T.T., and Finkelstein, I.J. (2016). Single-molecule imaging reveals the mechanism of Exo1 regulation by single-stranded DNA binding proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 113, E1170–E1179.

Naim, V., and Rosselli, F. (2009). The FANC pathway and BLM collaborate during mitosis to prevent micro-nucleation and chromosome abnormalities. *Nat. Cell Biol.* 11, 761–768.

Naim, V., Wilhelm, T., Debatisse, M., and Rosselli, F. (2013). ERCC1 and MUS81-EME1 promote sister chromatid separation by processing late replication intermediates at common fragile sites during mitosis. *Nat. Cell Biol.* 15, 1008–1015.

Nakada, D., Hirano, Y., and Sugimoto, K. (2004). Requirement of the Mre11 Complex and Exonuclease 1 for Activation of the Mec1 Signaling Pathway. *Mol. Cell. Biol.* 24, 10016–10025.

Nakamura, T.M., Du, L.-L., Redon, C., and Russell, P. (2004). Histone H2A Phosphorylation Controls Crb2 Recruitment at DNA Breaks, Maintains Checkpoint Arrest, and Influences DNA Repair in Fission Yeast. *Mol. Cell. Biol.* 24, 6215–6230.

Nassif, N., Penney, J., Pal, S., Engels, W.R., and Gloor, G.B. (1994). Efficient copying of nonhomologous sequences from ectopic sites via P-element-induced gap repair. *Mol. Cell. Biol.* 14, 1613–1625.

Navadgi-Patil, V.M., and Burgers, P.M. (2008). Yeast DNA replication protein Dpb11 activates the Mec1/ATR checkpoint kinase. *J. Biol. Chem.* 283, 35853–35859.

Neelsen, K.J., and Lopes, M. (2015). Replication fork reversal in eukaryotes: From dead end to dynamic response. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 16, 207–220.

Neelsen, K.J., Zanini, I.M.Y., Herrador, R., and Lopes, M. (2013). Oncogenes induce genotoxic stress by mitotic processing of unusual replication intermediates. *J. Cell Biol.* 200, 699–708.

Negrini, S., Gorgoulis, V.G., and Halazonetis, T.D. (2010). Genomic instability — an evolving hallmark of cancer. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 11, 220–228.

New, J.H., and Kowalczykowski, S.C. (2002). Rad52 protein has a second stimulatory role in DNA strand exchange that complements replication protein-A function. *J. Biol. Chem.* 277, 26171–26176.

- New, J.H., Sugiyama, T., Zaitseva, E., and Kowalczykowski, S.C. (1998). Rad52 protein stimulates DNA strand exchange by Rad51 and replication protein A. *Nature* 391, 407–410.
- Nguyen, J.H.G., Viterbo, D., Anand, R.P., Verra, L., Sloan, L., Richard, G.-F., and Freudenreich, C.H. (2017). Differential requirement of Srs2 helicase and Rad51 displacement activities in replication of hairpin-forming CAG/CTG repeats. *Nucleic Acids Res.* 45, 4519–4531.
- Nguyen, M.O., Jalan, M., Morrow, C.A., Osman, F., and Whitby, M.C. (2015). Recombination occurs within minutes of replication blockage by RTS1 producing restarted forks that are prone to collapse. *Elife* 4, e04539.
- Nick McElhinny, S.A., Watts, B.E., Kumar, D., Watt, D.L., Lundstrom, E.-B., Burgers, P.M.J., Johansson, E., Chabes, A., and Kunkel, T.A. (2010). Abundant ribonucleotide incorporation into DNA by yeast replicative polymerases. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 107, 4949–4954.
- Nickoloff, J.A., Chen, E.Y., and Heffron, F. (1986). A 24-base-pair DNA sequence from the MAT locus stimulates intergenic recombination in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 83, 7831–7835.
- Nicolás, a L., and Young, C.S. (1994). Characterization of DNA end joining in a mammalian cell nuclear extract: junction formation is accompanied by nucleotide loss, which is limited and uniform but not site specific. *Mol. Cell. Biol.* 14, 170–180.
- Nicolette, M.L., Lee, K., Guo, Z., Rani, M., Chow, J.M., Lee, S.E., and Paull, T.T. (2010). Mre11–Rad50–Xrs2 and Sae2 promote 5' strand resection of DNA double-strand breaks. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 17, 1478–1485.
- Nimonkar, A. V., Ozsoy, A.Z., Genschel, J., Modrich, P., and Kowalczykowski, S.C. (2008). Human exonuclease 1 and BLM helicase interact to resect DNA and initiate DNA repair. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 105, 16906–16911.
- Nimonkar, A. V., Genschel, J., Kinoshita, E., Polaczek, P., Campbell, J.L., Wyman, C., Modrich, P., and Kowalczykowski, S.C. (2011). BLM-DNA2-RPA-MRN and EXO1-BLM-RPA-MRN constitute two DNA end resection machineries for human DNA break repair. *Genes Dev.* 25, 350–362.
- Niu, H., Chung, W., Zhu, Z., Kwon, Y., Zhao, W., Chi, P., Prakash, R., Seong, C., Liu, D., Lu, L., et al. (2011). Mechanism of the ATP-dependent DNA End Resection Machinery from *S. cerevisiae*. *Nature* 467, 108–111.
- Nospikel, T. (2009). DNA Repair in Mammalian Cells. *Cell. Mol. Life Sci.* 66, 994–1009.
- Nugent, C.I., Bosco, G., Ross, L.O., Evans, S.K., Salinger, A.P., Moore, J.K., Haber, J.E., and Lundblad, V. (1998). Telomere maintenance is dependent on activities required for end repair of double-strand breaks. *Curr. Biol.* 8, 657–662.
- Nurse, P.M. (2001). CYCLIN DEPENDENT KINASES AND CELL CYCLE CONTROL.
- Octobre, G., Lorenz, A., Loidl, J., and Kohli, J. (2008). The Rad52 homologs Rad22 and Rti1 of *Schizosaccharomyces pombe* are not essential for meiotic interhomolog recombination, but are required for meiotic intrachromosomal recombination and mating-type-related DNA

repair. *Genetics* 178, 2399–2412.

Oestergaard, V.H., and Lisby, M. (2017). Transcription-replication conflicts at chromosomal fragile sites—consequences in M phase and beyond. *Chromosoma* 126, 213–222.

Ogawa, T., Yu, X., Shinohara, A., and Egelman, E.H. (1993). Similarity of the yeast RAD51 filament to the bacterial RecA filament. *Science* 259, 1896–1899.

Ohashi, E., Takeishi, Y., Ueda, S., and Tsurimoto, T. (2014). Interaction between Rad9-Hus1-Rad1 and TopBP1 activates ATR-ATRIP and promotes TopBP1 recruitment to sites of UV-damage. *DNA Repair (Amst)*. 21, 1–11.

Ohle, C., Tesorero, R., Schermann, G., Dobrev, N., Sinning, I., and Fischer, T. (2016). Transient RNA-DNA Hybrids Are Required for Efficient Double-Strand Break Repair. *Cell* 167, 1001–1013.e7.

Olivier, M., Charbonnel, C., Amiard, S., White, C.I., and Gallego, M.E. (2018). RAD51 and RTEL1 compensate telomere loss in the absence of telomerase. *Nucleic Acids Res.* 46, 2432–2445.

Orthwein, A., Noordermeer, S.M., Wilson, M.D., Landry, S., Enchev, R.I., Sherker, A., Munro, M., Pinder, J., Salsman, J., Dellaire, G., et al. (2015). A mechanism for the suppression of homologous recombination in G1 cells. *Nature* 528, 422–426.

Osborn, A.J., Elledge, S.J., and Zou, L. (2002). Checking on the fork: the DNA-replication stress-response pathway. *Trends Cell Biol.* 12, 509–516.

Osman, F., Dixon, J., Barr, A.R., and Whitby, M.C. (2005). The F-Box DNA helicase Fbh1 prevents Rhp51-dependent recombination without mediator proteins. *Mol. Cell. Biol.* 25, 8084–8096.

Ottaviani, D., LeCain, M., and Sheer, D. (2014). The role of microhomology in genomic structural variation. *Trends Genet.* 30, 85–94.

Pannunzio, N.R., Manthey, G.M., and Bailis, A.M. (2008). RAD59 is required for efficient repair of simultaneous double-strand breaks resulting in translocations in *Saccharomyces cerevisiae*. *DNA Repair (Amst)*. 7, 788–800.

Pardo, B., and Aguilera, A. (2012). Complex Chromosomal Rearrangements Mediated by Break-Induced Replication Involve Structure-Selective Endonucleases. *PLoS Genet.* 8.

Pasero, P., and Vindigni, A. (2017). Nucleases Acting at Stalled Forks: How to Reboot the Replication Program with a Few Shortcuts. *Annu. Rev. Genet.* 51, 477–499.

Patel, P.K., Arcangioli, B., Baker, S.P., Bensimon, A., and Rhind, N. (2005). DNA Replication Origins Fire Stochastically in Fission Yeast. *Mol. Biol. Cell* 17, 308–316.

Paull, T.T., and Gellert, M. (1998). The 3' to 5' exonuclease activity of Mre11 facilitates repair of DNA double-strand breaks. *Mol. Cell* 1, 969–979.

Paull, T.T., and Lee, J.-H. (2014). Rad17, the clamp loader that loads more than clamps. *EMBO J.* 33, 783–785.

- Paull, T.T., Rogakou, E.P., Yamazaki, V., Kirchgessner, C.U., Gellert, M., and Bonner, W.M. (2000). A critical role for histone H2AX in recruitment of repair factors to nuclear foci after DNA damage. *Curr. Biol.* *10*, 886–895.
- Pedersen, R.T., Kruse, T., Nilsson, J., Oestergaard, V.H., and Lisby, M. (2015). TopBP1 is required at mitosis to reduce transmission of DNA damage to G1 daughter cells. *J. Cell Biol.* *210*, 565–582.
- Peña-Díaz, J., and Jiricny, J. (2012). Mammalian mismatch repair: error-free or error-prone? *Trends Biochem. Sci.* *37*, 206–214.
- Pepe, A., and West, S.C. (2014). MUS81-EME2 Promotes Replication Fork Restart. *Cell Rep.* *7*, 1048–1055.
- Petermann, E., Orta, M.L., Issaeva, N., Schultz, N., and Helleday, T. (2010). Hydroxyurea-stalled replication forks become progressively inactivated and require two different RAD51-mediated pathways for restart and repair. *Mol. Cell* *37*, 492–502.
- Pierce, A.J., Johnson, R.D., Thompson, L.H., and Jasin, M. (1999). XRCC3 promotes homology-directed repair of DNA damage in mammalian cells. *Genes Dev.* *13*, 2633–2638.
- Pohlhaus, J.R., and Kreuzer, K.N. (2006). Formation and processing of stalled replication forks—utility of two-dimensional agarose gels. *Methods Enzymol.* *409*, 477–493.
- Poli, J., Tsaponina, O., Crabbé, L., Keszthelyi, A., Pantescio, V., Chabes, A., Lengronne, A., and Pasero, P. (2012). dNTP pools determine fork progression and origin usage under replication stress. *EMBO J.* *31*, 883–894.
- Postow, L., Ullsperger, C., Keller, R.W., Bustamante, C., Vologodskii, A. V., and Cozzarelli, N.R. (2001). Positive Torsional Strain Causes the Formation of a Four-way Junction at Replication Forks. *J. Biol. Chem.* *276*, 2790–2796.
- Potenski, C.J., and Klein, H.L. (2014). How the misincorporation of ribonucleotides into genomic DNA can be both harmful and helpful to cells. *Nucleic Acids Res.* *42*, 10226–10234.
- Prado, F. (2014). Genetic instability is prevented by Mrc1-dependent spatio-temporal separation of replicative and repair activities of homologous recombination: Homologous recombination tolerates replicative stress by Mrc1-regulated replication and repair activities opera. *BioEssays* *36*, 451–462.
- Prelich, G., and Stillman, B. (1988). Coordinated leading and lagging strand synthesis during SV40 DNA replication in vitro requires PCNA. *Cell* *53*, 117–126.
- Prinz, S., Amon, A., and Klein, F. (1997). Isolation of COM1, a new gene required to complete meiotic double-strand break-induced recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* *146*, 781–795.
- Prudden, J., Evans, J.S., Hussey, S.P., Deans, B., O'Neill, P., Thacker, J., and Humphrey, T. (2003). Pathway utilization in response to a site-specific DNA double-strand break in fission yeast. *EMBO J.* *22*, 1419–1430.

- Puizina, J. (2004). Mre11 Deficiency in Arabidopsis Is Associated with Chromosomal Instability in Somatic Cells and Spo11-Dependent Genome Fragmentation during Meiosis. *Plant Cell Online* 16, 1968–1978.
- Purandare, S.M., and Patel, P.I. (1997). Recombination hot spots and human disease. *Genome Res.* 7, 773–786.
- Rass, E., Grabarz, A., Plo, I., Gautier, J., Bertrand, P., and Lopez, B.S. (2009). Role of Mre11 in chromosomal nonhomologous end joining in mammalian cells. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 16, 819–824.
- Rattray, A.J., McGill, C.B., Shafer, B.K., and Strathern, J.N. (2001). Fidelity of mitotic double-strand-break repair in *Saccharomyces cerevisiae*: a role for SAE2/COM1. *Genetics* 158, 109–122.
- Ray Chaudhuri, A., Hashimoto, Y., Herrador, R., Neelsen, K.J., Fachinetti, D., Bermejo, R., Cocito, A., Costanzo, V., and Lopes, M. (2012). Topoisomerase I poisoning results in PARP-mediated replication fork reversal. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 19, 417–423.
- Ray Chaudhuri, A., Callen, E., Ding, X., Gogola, E., Duarte, A.A., Lee, J.-E., Wong, N., Lafarga, V., Calvo, J.A., Panzarino, N.J., et al. (2016). Replication fork stability confers chemoresistance in BRCA-deficient cells. *Nature* 535, 382–387.
- Reginato, G., Cannavo, E., and Cejka, P. (2018). Physiological protein blocks direct the Mre11–Rad50–Xrs2 and Sae2 nuclease complex to initiate DNA end resection. *Genes Dev.* 1–6.
- Renkawitz, J., Lademann, C.A., Kalocsay, M., and Jentsch, S. (2013). Monitoring Homology Search during DNA Double-Strand Break Repair In Vivo. *Mol. Cell* 50, 261–272.
- Resnick, M.A. (1975). The repair of double-strand breaks in chromosomal DNA of yeast. *Basic Life Sci.* 5B, 549–556.
- Roberts, S.A., Sterling, J., Thompson, C., Harris, S., Mav, D., Shah, R., Klimczak, L.J., Kryukov, G. V, Malc, E., Mieczkowski, P.A., et al. (2012). Clustered mutations in yeast and in human cancers can arise from damaged long single-strand DNA regions. *Mol. Cell* 46, 424–435.
- Rodrigue, A., Coulombe, Y., Jacquet, K., Gagné, J.-P., Roques, C., Gobeil, S., Poirier, G., and Masson, J.-Y. (2013). The RAD51 paralogs ensure cellular protection against mitotic defects and aneuploidy. *J. Cell Sci.* 126, 348–359.
- Rogakou, E.P., Pilch, D.R., Orr, A.H., Ivanova, V.S., and Bonner, W.M. (1998). Double-stranded Breaks Induce Histone H2AX phosphorylation on Serine 139. *J. Biol. Chem.* 273, 5858–5868.
- Rogakou, E.P., Boon, C., Redon, C., and Bonner, W.M. (1999). Megabase chromatin domains involved in DNA double-strand breaks in vivo. *J. Cell Biol.* 146, 905–916.
- Rondinelli, B., Gogola, E., Yücel, H., Duarte, A.A., van de Ven, M., van der Sluijs, R., Konstantinopoulos, P.A., Jonkers, J., Ceccaldi, R., Rottenberg, S., et al. (2017). EZH2 promotes degradation of stalled replication forks by recruiting MUS81 through histone H3 trimethylation. *Nat. Cell Biol.* 19, 1371–1378.

Roth, D.B., and Wilson, J.H. (1985). Relative rates of homologous and nonhomologous recombination in transfected DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *82*, 3355–3359.

Roumelioti, F., Sotiriou, S.K., Katsini, V., Chiourea, M., Halazonetis, T.D., and Gagos, S. (2016). Alternative lengthening of human telomeres is a conservative DNA replication process with features of break-induced replication. *EMBO Rep.* *17*, 1731–1737.

Rouzeau, S., Cordelières, F.P., Buhagiar-Labarchède, G., Hurbain, I., Onclercq-Delic, R., Gemble, S., Magnaghi-Jaulin, L., Jaulin, C., and Amor-Guéret, M. (2012). Bloom's Syndrome and PICH Helicases Cooperate with Topoisomerase II α in Centromere Disjunction before Anaphase. *PLoS One* *7*, e33905.

Rudd, S.G., Bianchi, J., and Doherty, A.J. (2014). PrimPol—A new polymerase on the block. *Mol. Cell. Oncol.* *1*, e960754.

Runge, K.W., and Li, Y. (2017). A curious new role for MRN in *Schizosaccharomyces pombe* non-homologous end-joining. *Curr. Genet.* *0*, 1–6.

Sabatinos, S.A., and Forsburg, S.L. (2010). Molecular Genetics of *Schizosaccharomyces pombe*. In *Methods in Enzymology*, pp. 759–795.

Sabatinos, S.A., Ranatunga, N.S., Yuan, J.-P., Green, M.D., and Forsburg, S.L. (2015). Replication stress in early S phase generates apparent micronuclei and chromosome rearrangement in fission yeast. *Mol. Biol. Cell* *26*, 3439–3450.

Saini, N., Ramakrishnan, S., Elango, R., Ayyar, S., Zhang, Y., Deem, A., Ira, G., Haber, J.E., Lobachev, K.S., and Malkova, A. (2013). Migrating bubble during break-induced replication drives conservative DNA synthesis. *Nature* *502*, 389–392.

Sale, J.E. (2012). Competition, collaboration and coordination - determining how cells bypass DNA damage. *J. Cell Sci.* *125*, 1633–1643.

San Filippo, J., Sung, P., and Klein, H. (2008). Mechanism of Eukaryotic Homologous Recombination. *Annu. Rev. Biochem.* *77*, 229–257.

Sánchez, A., and Russell, P. (2015). Ku Stabilizes Replication Forks in the Absence of Brc1. *PLoS One* *10*, e0126598.

Sartori, A.A., Lukas, C., Coates, J., Mistrik, M., Fu, S., Bartek, J., Baer, R., Lukas, J., and Jackson, S.P. (2007). Human CtIP promotes DNA end resection. *Nature* *450*, 509–514.

Sasaki, M., and Kobayashi, T. (2017). Ctf4 Prevents Genome Rearrangements by Suppressing DNA Double-Strand Break Formation and Its End Resection at Arrested Replication Forks. *Mol. Cell* *66*, 533–545.e5.

Saugar, I., Vázquez, M.V., Gallo-Fernández, M., Ortiz-Bazán, M.Á., Segurado, M., Calzada, A., and Tercero, J.A. (2013). Temporal regulation of the Mus81-Mms4 endonuclease ensures cell survival under conditions of DNA damage. *Nucleic Acids Res.* *41*, 8943–8958.

Sauvageau, S., Stasiak, A.Z., Banville, I., Ploquin, M., Stasiak, A., and Masson, J.-Y. (2005). Fission yeast rad51 and dmc1, two efficient DNA recombinases forming helical nucleoprotein

filaments. *Mol. Cell. Biol.* 25, 4377–4387.

Schlacher, K., Christ, N., Siaud, N., Egashira, A., Wu, H., and Jasin, M. (2011). Double-strand break repair-independent role for BRCA2 in blocking stalled replication fork degradation by MRE11. *Cell* 145, 529–542.

Schlacher, K., Wu, H., and Jasin, M. (2012). A distinct replication fork protection pathway connects Fanconi anemia tumor suppressors to RAD51-BRCA1/2. *Cancer Cell* 22, 106–116.

Schwartzman, J.B., Martínez-Robles, M.-L., López, V., Hernández, P., and Krimer, D.B. (2012). 2D gels and their third-dimension potential. *Methods* 57, 170–178.

Schwab, R.A., Nieminuszczy, J., Shah, F., Langton, J., Lopez Martinez, D., Liang, C.-C., Cohn, M.A., Gibbons, R.J., Deans, A.J., and Niedzwiedz, W. (2015). The Fanconi Anemia Pathway Maintains Genome Stability by Coordinating Replication and Transcription. *Mol. Cell* 60, 351–361.

Scully, R., Chen, J., Plug, A., Xiao, Y., Weaver, D., Feunteun, J., Ashley, T., and Livingston, D.M. (1997). Association of BRCA1 with Rad51 in mitotic and meiotic cells. *Cell* 88, 265–275.

Segurado, M., and Diffley, J.F.X. (2008). Separate roles for the DNA damage checkpoint protein kinases in stabilizing DNA replication forks. *Genes Dev.* 22, 1816–1827.

Segurado, M., Luis, A. De, and Antequera, F. (2003). scientific report. 4.

Seol, J.-H., Shim, E.Y., and Lee, S.E. (2017). Microhomology-mediated end joining: Good, bad and ugly. *Mutat. Res. Mol. Mech. Mutagen.*

de Septenville, A.L., Duigou, S., Boubakri, H., and Michel, B. (2012). Replication fork reversal after replication-transcription collision. *PLoS Genet.* 8.

Sfeir, A., and Symington, L.S. (2015). Microhomology-Mediated End Joining: A Back-up Survival Mechanism or Dedicated Pathway? *Trends Biochem. Sci.* 40, 701–714.

Sfeir, A., Kosiyatrakul, S.T., Hockemeyer, D., MacRae, S.L., Karlseder, J., Schildkraut, C.L., and de Lange, T. (2009). Mammalian telomeres resemble fragile sites and require TRF1 for efficient replication. *Cell* 138, 90–103.

Shen, Z., Cloud, K.G., Chen, D.J., and Park, M.S. (1996). Specific interactions between the human RAD51 and RAD52 proteins. *J. Biol. Chem.* 271, 148–152.

Shibata, A., and Jeggo, P.A. (2014). DNA Double-strand Break Repair in a Cellular Context. *Clin. Oncol.* 26, 243–249.

Shibata, A., Conrad, S., Birraux, J., Geuting, V., Barton, O., Ismail, A., Kakarougkas, A., Meek, K., Taucher-Scholz, G., Löbrich, M., et al. (2011). Factors determining DNA double-strand break repair pathway choice in G2 phase. *EMBO J.* 30, 1079–1092.

Shim, E.Y., Ma, J., Oum, J., Yanez, Y., and Lee, S.E. (2005). The Yeast Chromatin Remodeler RSC Complex Facilitates End Joining Repair of DNA Double-Strand Breaks The Yeast Chromatin Remodeler RSC Complex Facilitates End Joining Repair of DNA Double-Strand Breaks. *Mol.*

Cell. Biol. 25, 3934–3944.

Shim, E.Y., Chung, W.H., Nicolette, M.L., Zhang, Y., Davis, M., Zhu, Z., Paull, T.T., Ira, G., and Lee, S.E. (2010). *Saccharomyces cerevisiae* Mre11/Rad50/Xrs2 and Ku proteins regulate association of Exo1 and Dna2 with DNA breaks. *EMBO J.* 29, 3370–3380.

Shinohara, A., and Ogawa, T. (1998). Stimulation by Rad52 of yeast Rad51-mediated recombination. *Nature* 391, 404–407.

Shinohara, A., Ogawa, H., and Ogawa, T. (1992). Rad51 protein involved in repair and recombination in *S. cerevisiae* is a RecA-like protein. *Cell* 69, 457–470.

Shinohara, A., Ogawa, H., Matsuda, Y., Ushio, N., Ikeo, K., and Ogawa, T. (1993). Cloning of human, mouse and fission yeast recombination genes homologous to RAD51 and recA. *Nat. Genet.* 4, 239–243.

Shivji, M.K.K., Renaudin, X., Williams, Ç.H., and Venkitaraman, A.R. (2018). BRCA2 Regulates Transcription Elongation by RNA Polymerase II to Prevent R-Loop Accumulation. *Cell Rep.* 22, 1031–1039.

Shroff, R., Arbel-Eden, A., Pilch, D., Ira, G., Bonner, W.M., Petrini, J.H., Haber, J.E., and Lichten, M. (2004). Distribution and dynamics of chromatin modification induced by a defined DNA double-strand break. *Curr. Biol.* 14, 1703–1711.

Shukla, A., Navadgi, V.M., Mallikarjuna, K., and Rao, B.J. (2005). Interaction of hRad51 and hRad52 with MCM complex: A cross-talk between recombination and replication proteins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 329, 1240–1245.

Sidorova, J. (2017). A game of substrates: replication fork remodeling and its roles in genome stability and chemo-resistance. *Cell Stress* 1, 115–133.

Sigurdsson, S., Komen, S. Van, Bussen, W., Schild, D., Albala, J.S., and Sung, P. (2001). Mediator function of the human Rad51B – Rad51C complex in Rad51 / RPA-catalyzed DNA strand exchange. *Genes Dev.* 15, 3308–3318.

Sinha, M., and Peterson, C.L. (2009). Chromatin dynamics during repair of chromosomal DNA double-strand breaks. *DNA Repair (Amst).* 1, 371–385.

Sirbu, B.M., Couch, F.B., Feigerle, J.T., Bhaskara, S., Hiebert, S.W., and Cortez, D. (2011). Analysis of protein dynamics at active, stalled, and collapsed replication forks. *Genes Dev.* 25, 1320–1327.

Smith, C.E., Llorente, B., and Symington, L.S. (2007). Template switching during break-induced replication. *Nature* 447, 102–105.

Smith, J., Mun Tho, L., Xu, N., and A. Gillespie, D. (2010). The ATM-Chk2 and ATR-Chk1 pathways in DNA damage signaling and cancer (Elsevier Inc.).

Sobinoff, A.P., Allen, J.A., Neumann, A.A., Yang, S.F., Walsh, M.E., Henson, J.D., Reddel, R.R., and Pickett, H.A. (2017). BLM and SLX4 play opposing roles in recombination-dependent replication at human telomeres. *EMBO J.* 36, 2907–2919.

- Sofueva, S., Osman, F., Lorenz, A., Steinacher, R., Castagnetti, S., Ledesma, J., and Whitby, M.C. (2011). Ultrafine anaphase bridges, broken DNA and illegitimate recombination induced by a replication fork barrier. *Nucleic Acids Res.* *39*, 6568–6584.
- Sogo, J.M., Lopes, M., and Foiani, M. (2002). Fork Reversal and ssDNA Accumulation at Stalled Replication Forks Owing to Checkpoint Defects. *Science* (80-.). *297*, 599–602.
- Solinger, J.A., Kiianitsa, K., and Heyer, W.D. (2002). Rad54, a Swi2/Snf2-like recombinational repair protein, disassembles Rad51:dsDNA filaments. *Mol. Cell* *10*, 1175–1188.
- Sonoda, E., Sasaki, M.S., Buerstedde, J.M., Bezzubova, O., Shinohara, A., Ogawa, H., Takata, M., Yamaguchi-Iwai, Y., and Takeda, S. (1998). Rad51-deficient vertebrate cells accumulate chromosomal breaks prior to cell death. *EMBO J.* *17*, 598–608.
- Sotiriou, S.K., Kamileri, I., Lugli, N., Evangelou, K., Da-Ré, C., Huber, F., Padayachy, L., Tardy, S., Nicati, N.L., Barriot, S., et al. (2016). Mammalian RAD52 Functions in Break-Induced Replication Repair of Collapsed DNA Replication Forks. *Mol. Cell* *64*, 1127–1134.
- Spycher, C., Miller, E.S., Townsend, K., Pavic, L., Morrice, N.A., Janscak, P., Stewart, G.S., and Stucki, M. (2008). Constitutive phosphorylation of MDC1 physically links the MRE11-RAD50-NBS1 complex to damaged chromatin. *J. Cell Biol.* *181*, 227–240.
- Steglich, B., Strålfors, A., Khorosjutina, O., Persson, J., Smialowska, A., Javerzat, J.P., and Ekwall, K. (2015). The Fun30 Chromatin Remodeler Fft3 Controls Nuclear Organization and Chromatin Structure of Insulators and Subtelomeres in Fission Yeast. *PLoS Genet.* *11*.
- Strålfors, A., Walfridsson, J., Bhuiyan, H., and Ekwall, K. (2011). The FUN30 chromatin remodeler, Fft3, protects centromeric and subtelomeric domains from euchromatin formation. *PLoS Genet.* *7*, 1–11.
- Strathern, J.N., Shafer, B.K., and McGill, C.B. (1995). DNA synthesis errors associated with double-strand-break repair. *Genetics* *140*, 965–972.
- Stucki, M., Clapperton, J.A., Mohammad, D., Yaffe, M.B., Smerdon, S.J., and Jackson, S.P. (2005). MDC1 directly binds phosphorylated histone H2AX to regulate cellular responses to DNA double-strand breaks. *Cell* *123*, 1213–1226.
- Sturzenegger, A., Burdova, K., Kanagaraj, R., Levikova, M., Pinto, C., Cejka, P., and Janscak, P. (2014). DNA2 cooperates with the WRN and BLM RecQ helicases to mediate long-range DNA end resection in human cells. *J. Biol. Chem.* *289*, 27314–27326.
- Sugawara, N., and Haber, J.E. (1992). Characterization of double-strand break-induced recombination: homology requirements and single-stranded DNA formation. *Mol. Cell. Biol.* *12*, 563–575.
- Sugawara, N., Paques, F., Colaiacovo, M., and Haber, J.E. (1997). Role of *Saccharomyces cerevisiae* Msh2 and Msh3 repair proteins in double-strand break-induced recombination. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *94*, 9214–9219.
- Sugawara, N., Ira, G., and Haber, J.E. (2000). DNA length dependence of the single-strand

annealing pathway and the role of *Saccharomyces cerevisiae* RAD59 in double-strand break repair. *Mol. Cell. Biol.* *20*, 5300–5309.

Sugawara, N., Wang, X., and Haber, J.E. (2003). In vivo roles of Rad52, Rad54, and Rad55 proteins in Rad51-mediated recombination. *Mol. Cell* *12*, 209–219.

Sugiyama, T., and Kowalczykowski, S.C. (2002). Rad52 protein associates with replication protein A (RPA)-single-stranded DNA to accelerate Rad51-mediated displacement of RPA and presynaptic complex formation. *J. Biol. Chem.* *277*, 31663–31672.

Sugiyama, T., New, J.H., and Kowalczykowski, S.C. (1998). DNA annealing by Rad52 Protein is stimulated by specific interaction with the complex of replication protein A and single-stranded DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *95*, 6049–6054.

Sugiyama, T., Kantake, N., Wu, Y., and Kowalczykowski, S.C. (2006). Rad52-mediated DNA annealing after Rad51-mediated DNA strand exchange promotes second ssDNA capture. *EMBO J.* *25*, 5539–5548.

Sun, J., Lee, K.-J., Davis, A.J., and Chen, D.J. (2012). Human Ku70/80 Protein Blocks Exonuclease 1-mediated DNA Resection in the Presence of Human Mre11 or Mre11/Rad50 Protein Complex. *J. Biol. Chem.* *287*, 4936–4945.

Sung, P. (1997). Yeast Rad55 and Rad57 proteins form a heterodimer that functions with replication protein A to promote DNA strand exchange by Rad51 recombinase. *Genes Dev.* *11*, 1111–1121.

Sung, P., and Klein, H. (2006). Mechanism of homologous recombination: Mediators and helicases take on regulatory functions. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *7*, 739–750.

Sung, P., and Robberson, D.L. (1995). DNA strand exchange mediated by a RAD51-ssDNA nucleoprotein filament with polarity opposite to that of RecA. *Cell* *82*, 453–461.

Sung, P., and Stratton, S.A. (1996). Yeast RAD51 recombinase mediates polar DNA strand exchange in the absence of ATP hydrolysis. *J. Biol. Chem.* *271*, 27983–27986.

Symington, L.S. (2014). End Resection at Double-Strand Breaks: Mechanism and Regulation. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* *6*, a016436–a016436.

Szankasi, P., and Smith, G.R. (1995). A role for exonuclease I from *S. pombe* in mutation avoidance and mismatch correction. *Science* *267*, 1166–1169.

Szostak, J.W., Orr-Weaver, T.L., Rothstein, R.J., and Stahl, F.W. (1983). The double-strand break model for recombination. *Cell* *33*, 25–35.

Tagliatalata, A., Alvarez, S., Leuzzi, G., Sannino, V., Ranjha, L., Huang, J.W., Madubata, C., Anand, R., Levy, B., Rabadan, R., et al. (2017). Restoration of Replication Fork Stability in BRCA1- and BRCA2-Deficient Cells by Inactivation of SNF2-Family Fork Remodelers. *Mol. Cell* *68*, 414–430.e8.

Takata, M., Sasaki, M.S., Sonoda, E., Morrison, C., Hashimoto, M., Utsumi, H., Yamaguchi-Iwai, Y., Shinohara, A., Takeda, S., Baba, T., et al. (1998). Homologous recombination and non-

homologous end-joining pathways of DNA double-strand break repair have overlapping roles in the maintenance of chromosomal integrity in vertebrate cells. *EMBO J.* *17*, 5497–5508.

Takeda, S., Nakamura, K., Taniguchi, Y., and Paull, T.T. (2007). Ctp1/CtIP and the MRN Complex Collaborate in the Initial Steps of Homologous Recombination. *Mol. Cell* *28*, 351–352.

Le Tallec, B., Dutrillaux, B., Lachages, A.-M., Millot, G.A., Brison, O., and Debatisse, M. (2011). Molecular profiling of common fragile sites in human fibroblasts. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *18*, 1421–1423.

Taneja, N., Zofall, M., Balachandran, V., Thillainadesan, G., Sugiyama, T., Wheeler, D., Zhou, M., and Grewal, S.I.S. (2017). SNF2 Family Protein Fft3 Suppresses Nucleosome Turnover to Promote Epigenetic Inheritance and Proper Replication. *Mol. Cell* *66*, 50–62.e6.

Tarsounas, M., Davies, D., and West, S.C. (2003). BRCA2-dependent and independent formation of RAD51 nuclear foci. *Oncogene* *22*, 1115–1123.

Taylor, J.H. (1960). Asynchronous Duplication of Chromosomes in Cultured Cells of Chinese Hamster. *J. Cell Biol.* *7*, 455–463.

Técher, H., Koundrioukoff, S., Nicolas, A., and Debatisse, M. (2017). The impact of replication stress on replication dynamics and DNA damage in vertebrate cells. *Nat. Rev. Genet.* *18*, 535–550.

Teixeira-Silva, A., Ait Saada, A., Hardy, J., Iraqui, I., Nocente, M.C., Fréon, K., and Lambert, S.A.E. (2017). The end-joining factor Ku acts in the end-resection of double strand break-free arrested replication forks. *Nat. Commun.* *8*, 1982.

Thangavel, S., Berti, M., Levikova, M., Pinto, C., Gomathinayagam, S., Vujanovic, M., Zellweger, R., Moore, H., Lee, E.H., Hendrickson, E.A., et al. (2015). DNA2 drives processing and restart of reversed replication forks in human cells. *J. Cell Biol.* *208*, 545–562.

Thorslund, T., and West, S.C. (2007). BRCA2: A universal recombinase regulator. *Oncogene* *26*, 7720–7730.

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

Tittel-Elmer, M., Lengronne, A., Davidson, M.B., Bacal, J., François, P., Hohl, M., Petrini, J.H.J., Pasero, P., and Cobb, J.A. (2012). Cohesin Association to Replication Sites Depends on Rad50 and Promotes Fork Restart. *Mol. Cell* *48*, 98–108.

Tiwari, A., Addis Jones, O., and Chan, K.-L. (2018). 53BP1 can limit sister-chromatid rupture and rearrangements driven by a distinct ultrafine DNA bridging-breakage process. *Nat. Commun.* *9*, 677.

Tomimatsu, N., Mukherjee, B., Catherine Hardebeck, M., Ilcheva, M., Vanessa Camacho, C., Louise Harris, J., Porteus, M., Llorente, B., Khanna, K.K., and Burma, S. (2014). Phosphorylation of EXO1 by CDKs 1 and 2 regulates DNA end resection and repair pathway choice. *Nat.*

Commun. 5, 3561.

Tran, P.T., Erdeniz, N., Symington, L.S., and Liskay, R.M. (2004). EXO1-A multi-tasking eukaryotic nuclease. *DNA Repair (Amst)*. 3, 1549–1559.

Truong, L.N., and Wu, X. (2011). Prevention of DNA re-replication in eukaryotic cells. *J. Mol. Cell Biol.* 3, 13–22.

Truong, L.N., Li, Y., Shi, L.Z., Hwang, P.Y.-H., He, J., Wang, H., Razavian, N., Berns, M.W., and Wu, X. (2013). Microhomology-mediated End Joining and Homologous Recombination share the initial end resection step to repair DNA double-strand breaks in mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, 7720–7725.

Tsai, S.P., Su, G.C., Lin, S.W., Chung, C.I., Xue, X., Dunlop, M.H., Akamatsu, Y., Jasin, M., Sung, P., and Chi, P. (2012). Rad51 presynaptic filament stabilization function of the mouse Swi5-Sfr1 heterodimeric complex. *Nucleic Acids Res.* 40, 6558–6569.

Tsang, E., Miyabe, I., Iraqui, I., Zheng, J., Lambert, S.A.E., and Carr, A.M. (2014). The extent of error-prone replication-restart by homologous recombination is controlled by Exo1 and checkpoint proteins. *J. Cell Sci.*

Tsukuda, T., Fleming, A.B., Nickoloff, J.A., and Osley, M.A. (2005). Chromatin remodelling at a DNA double-strand break site in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature* 438, 379–383.

Ünal, E., Arbel-Eden, A., Sattler, U., Shroff, R., Lichten, M., Haber, J.E., and Koshland, D. (2004). DNA damage response pathway uses histone modification to assemble a double-strand break-specific cohesin domain. *Mol. Cell* 16, 991–1002.

Uziel, T., Lerenthal, Y., Moyal, L., Andegeko, Y., Mittelman, L., and Shiloh, Y. (2003). Requirement of the MRN complex for ATP activation by DNA damage. *EMBO J.* 22.

Vallerga, M.B., Mansilla, S.F., Federico, M.B., Bertolin, A.P., and Gottifredi, V. (2015). Rad51 recombinase prevents Mre11 nuclease-dependent degradation and excessive PrimPol-mediated elongation of nascent DNA after UV irradiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 112, E6624-33.

Vanoli, F., Fumasoni, M., Szakal, B., Maloisel, L., and Branzei, D. (2010). Replication and Recombination Factors Contributing to Recombination-Dependent Bypass of DNA Lesions by Template Switch. *PLoS Genet.* 6, e1001205.

Vashee, S., Cvetic, C., Lu, W., Simancek, P., Kelly, T.J., and Walter, J.C. (2003). Sequence-independent DNA binding and replication initiation by the human origin recognition complex. 1894–1908.

Vengrova, S., and Dalgaard, J.Z. (2004). RNase-sensitive DNA modification(s) initiates *S. pombe* mating-type switching. *Genes Dev.* 18, 794–804.

Vilenchik, M.M., and Knudson, A.G. (2003). Endogenous DNA double-strand breaks: Production, fidelity of repair, and induction of cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 100, 12871–12876.

Villa, M., Bonetti, D., Carraro, M., and Longhese, M.P. (2018). Rad9/53BP1 protects stalled

replication forks from degradation in Mec1/ATR-defective cells. *EMBO Rep.* 19, 351–367.

Vindigni, A., and Lopes, M. (2017). Combining electron microscopy with single molecule DNA fiber approaches to study DNA replication dynamics. *Biophys. Chem.* 225, 3–9.

Di Virgilio, M., and Gautier, J. (2005). Repair of double-strand breaks by nonhomologous end joining in the absence of Mre11. *J. Cell Biol.* 171, 765–771.

Vujanovic, M., Krietsch, J., Raso, M.C., Terraneo, N., Zellweger, R., Schmid, J.A., Taglialatela, A., Huang, J.W., Holland, C.L., Zwicky, K., et al. (2017). Replication Fork Slowing and Reversal upon DNA Damage Require PCNA Polyubiquitination and ZRANB3 DNA Translocase Activity. *Mol. Cell* 67, 882–890.e5.

Wang, J.C. (2002). Cellular roles of DNA topoisomerases: a molecular perspective. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 3, 430–440.

Wang, A.T., Kim, T., Wagner, J.E., Conti, B.A., Lach, F.P., Huang, A.L., Molina, H., Sanborn, E.M., Zierhut, H., Cornes, B.K., et al. (2015). A Dominant Mutation in Human RAD51 Reveals Its Function in DNA Interstrand Crosslink Repair Independent of Homologous Recombination. *Mol. Cell* 59, 478–490.

Wang, H., Li, Y., Truong, L.N., Shi, L.Z., Hwang, P.H., He, J., Do, J., Cho, M.J., Li, H., Negrete, A., et al. (2014a). CtIP maintains stability at common fragile sites and inverted repeats by end resection-independent endonuclease activity. *Mol. Cell* 54, 1012–1021.

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

Ward, J.F. (1988). DNA damage produced by ionizing radiation in mammalian cells: identities, mechanisms of formation, and reparability. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 35, 95–125.

Ward, I.M., and Chen, J. (2001). Histone H2AX Is Phosphorylated in an ATR-dependent Manner in Response to Replicational Stress. *J. Biol. Chem.* 276, 47759–47762.

Ward, I.M., Minn, K., Jorda, K.G., and Chen, J. (2003). Accumulation of checkpoint protein 53BP1 at DNA breaks involves its binding to phosphorylated histone H2AX. *J. Biol. Chem.* 278, 19579–19582.

Weiffenbach, B., and Haber, J.E. (1981). Homothallic mating type switching generates lethal chromosome breaks in rad52 strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 1, 522–534.

Weinstock, D.M., Brunet, E., and Jasin, M. (2011). *NIH Public Access.* 9, 978–981.

Wilhelm, T., Magdalou, I., Barascu, A., Técher, H., Debatisse, M., and Lopez, B.S. (2014a). Spontaneous slow replication fork progression elicits mitosis alterations in homologous recombination-deficient mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 111, 763–768.

Wilhelm, T., Magdalou, I., Barascu, A., Techer, H., Debatisse, M., and Lopez, B.S. (2014b). Spontaneous slow replication fork progression elicits mitosis alterations in homologous recombination-deficient mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 111, 763–768.

- Williams, R.S., Moncalian, G., Williams, J.S., Yamada, Y., Limbo, O., Shin, D.S., Grocock, L.M., Cahill, D., Hitomi, C., Guenther, G., et al. (2008). Mre11 Dimers Coordinate DNA End Bridging and Nuclease Processing in Double-Strand-Break Repair. *Cell* *135*, 97–109.
- Williams, R.S., Dodson, G.E., Limbo, O., Yamada, Y., Williams, J.S., Guenther, G., Classen, S., Glover, J.N.M., Iwasaki, H., Russell, P., et al. (2009). Nbs1 Flexibly Tethers Ctp1 and Mre11-Rad50 to Coordinate DNA Double-Strand Break Processing and Repair. *Cell* *139*, 87–99.
- Wilson, M.A., Kwon, Y., Xu, Y., Chung, W.-H., Chi, P., Niu, H., Mayle, R., Chen, X., Malkova, A., Sung, P., et al. (2013). Pif1 helicase and Pol δ promote recombination-coupled DNA synthesis via bubble migration. *Nature* *502*, 393–396.
- Windgassen, T.A., Wessel, S.R., Bhattacharyya, B., and Keck, J.L. (2018). Mechanisms of bacterial DNA replication restart. *Nucleic Acids Res.* *46*, 504–519.
- Wixon, J. (2002). Featured organism: *Schizosaccharomyces pombe*, the fission yeast. *Comp. Funct. Genomics* *3*, 194–204.
- Wolner, B., and Peterson, C.L. (2005). ATP-dependent and ATP-independent roles for the Rad54 chromatin remodeling enzyme during recombinational repair of a DNA double strand break. *J. Biol. Chem.* *280*, 10855–10860.
- Wood, V., Gwilliam, R., Rajandream, M.-A., Lyne, M., Lyne, R., Stewart, A., Sgouros, J., Peat, N., Hayles, J., Baker, S., et al. (2002). Erratum: The genome sequence of *Schizosaccharomyces pombe*. *Nature* *415*, 871–880.
- Woodward, A.M., Göhler, T., Luciani, M.G., Oehlmann, M., Ge, X., Gartner, A., Jackson, D.A., and Blow, J.J. (2006). Excess Mcm2–7 license dormant origins of replication that can be used under conditions of replicative stress. *J. Cell Biol.* *173*, 673–683.
- Wu, D., Topper, L.M., and Wilson, T.E. (2008a). Recruitment and dissociation of nonhomologous end joining proteins at a DNA double-strand break in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* *178*, 1237–1249.
- Wu, L., Luo, K., Lou, Z., and Chen, J. (2008b). MDC1 regulates intra-S-phase checkpoint by targeting NBS1 to DNA double-strand breaks. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *105*, 11200–11205.
- Wu, M., Lu, W., Santos, R.E., Frattini, M.G., and Kelly, T.J. (2014). Geminin inhibits a late step in the formation of human pre-replicative complexes. *J. Biol. Chem.* *289*, 30810–30821.
- Wu, Y., Kantake, N., Sugiyama, T., and Kowalczykowski, S.C. (2008c). Rad51 protein controls Rad52-mediated DNA annealing. *J. Biol. Chem.* *283*, 14883–14892.
- Wu, Y., Lee, S.-H., Williamson, E.A., Reinert, B.L., Cho, J.H., Xia, F., Jaiswal, A.S., Srinivasan, G., Patel, B., Brantley, A., et al. (2015). EEPD1 Rescues Stressed Replication Forks and Maintains Genome Stability by Promoting End Resection and Homologous Recombination Repair. *PLoS Genet.* *11*, e1005675.
- Xie, A., Kwok, A., and Scully, R. (2009). Role of mammalian Mre11 in classical and alternative nonhomologous end joining. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *16*, 814–818.

Xu, B., Sun, Z., Liu, Z., Guo, H., Liu, Q., Jiang, H., Zou, Y., Gong, Y., Tischfield, J.A., and Shao, C. (2011). Replication Stress Induces Micronuclei Comprising of Aggregated DNA Double-Strand Breaks. *PLoS One* 6, e18618.

Xu, W., Aparicio, J.G., Aparicio, O.M., and Tavaré, S. (2006). Genome-wide mapping of ORC and Mcm2p binding sites on tiling arrays and identification of essential ARS consensus sequences in *S. cerevisiae*. *BMC Genomics* 7, 1–16.

Xu, Y., Ayrapetov, M.K., Xu, C., Gursoy-yuzugullu, O., Hu, Y., and Price, B.D. (2013). NIH Public Access. 48, 723–733.

Xu, Y., Ning, S., Wei, Z., Xu, R., Xu, X., Xing, M., Guo, R., and Xu, D. (2017). 53BP1 and BRCA1 control pathway choice for stalled replication restart. *Elife* 6.

Yan, S., and Michael, W.M. (2009). TopBP1 and DNA polymerase α -mediated recruitment of the 9-1-1 complex to stalled replication forks: Implications for a replication restart-based mechanism for ATR checkpoint activation. *Cell Cycle* 8, 2877–2884.

Yan, C.T., Boboila, C., Souza, E.K., Franco, S., Hickernell, T.R., Murphy, M., Gumaste, S., Geyer, M., Zarrin, A.A., Manis, J.P., et al. (2007). IgH class switching and translocations use a robust non-classical end-joining pathway. *Nature* 449, 478–482.

Yang, S.H., Zhou, R., Campbell, J., Chen, J., Ha, T., and Paull, T.T. (2013). The SOSS1 single-stranded DNA binding complex promotes DNA end resection in concert with Exo1. *EMBO J.* 32, 126–139.

Yazdi, P.T., Wang, Y., Zhao, S., Patel, N., Lee, E.Y.H.P., and Qin, J. (2002). SMC1 is a downstream effector in the ATM/NBS1 branch of the human S-phase checkpoint. *Genes Dev.* 16, 571–582.

Yeeles, J.T.P., and Marians, K.J. (2011). The Escherichia coli Replisome Is Inherently DNA Damage Tolerant. *Science* (80-.). 334, 235–238.

Yeeles, J.T.P., Poli, J., Marians, K.J., and Pasero, P. (2013). Rescuing Stalled or Damaged Replication Forks. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 5, a012815–a012815.

Yeeles, J.T.P., Janska, A., Early, A., and Diffley, J.F.X. (2017). How the Eukaryotic Replisome Achieves Rapid and Efficient DNA Replication. *Mol. Cell* 65, 105–116.

Ying, S., Minocherhomji, S., Chan, K.L., Palmari-Pallag, T., Chu, W.K., Wass, T., Mankouri, H.W., Liu, Y., and Hickson, I.D. (2013). MUS81 promotes common fragile site expression. *Nat. Cell Biol.* 15, 1001–1007.

Yu, X., and Baer, R. (2000). Nuclear localization and cell cycle-specific expression of CtIP, a protein that associates with the BRCA1 tumor suppressor. *J. Biol. Chem.* 275, 18541–18549.

Zadorozhny, K., Sannino, V., Beláň, O., Mlčoušková, J., Špírek, M., Costanzo, V., and Krejčí, L. (2017a). Fanconi-Anemia-Associated Mutations Destabilize RAD51 Filaments and Impair Replication Fork Protection. *Cell Rep.* 21, 333–340.

Zadorozhny, K., Sannino, V., Beláň, O., Mlčoušková, J., Špírek, M., Costanzo, V., and Krejčí, L. (2017b). Fanconi-Anemia-Associated Mutations Destabilize RAD51 Filaments and Impair

Replication Fork Protection. *Cell Rep.* 21, 333–340.

Zellweger, R., Dalcher, D., Mutreja, K., Berti, M., Schmid, J.A., Herrador, R., Vindigni, A., and Lopes, M. (2015). Rad51-mediated replication fork reversal is a global response to genotoxic treatments in human cells. *J. Cell Biol.* 208, 563–579.

Zhang, X., and Paull, T.T. (2005). The Mre11/Rad50/Xrs2 complex and non-homologous end-joining of incompatible ends in *S. cerevisiae*. *DNA Repair (Amst)*. 4, 1281–1294.

Zhang, Y., and Jasin, M. (2011). An essential role for CtIP in chromosomal translocation formation through an alternative end-joining pathway. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 18, 80–84.

Zhang, C.-Z., Spektor, A., Cornils, H., Francis, J.M., Jackson, E.K., Liu, S., Meyerson, M., and Pellman, D. (2015). Chromothripsis from DNA damage in micronuclei. *Nature* 522, 179–184.

Zhao, B., Zhang, D., Li, C., Yuan, Z., Yu, F., Zhong, S., Jiang, G., Yang, Y.G., Le, X.C., Weinfeld, M., et al. (2017). ATPase activity tightly regulates RecA nucleofilaments to promote homologous recombination. *Cell Discov.* 3, 1–15.

Zhao, W., Vaithiyalingam, S., San Filippo, J., Maranon, D.G., Jimenez-Sainz, J., Fontenay, G. V, Kwon, Y., Leung, S.G., Lu, L., Jensen, R.B., et al. (2015). Promotion of BRCA2-Dependent Homologous Recombination by DSS1 via RPA Targeting and DNA Mimicry. *Mol. Cell* 59, 176–187.

Zhou, B.S., and Elledge, S.J. (2000). Checkpoints in perspective. *Nature* 408, 433–439.

Zhu, X.D., Küster, B., Mann, M., Petrini, J.H.J., and De Lange, T. (2000). Cell-cycle-regulated association of RAD50/MRE11/NBS1 with TRF2 and human telomeres. *Nat. Genet.* 25, 347–352.

Zhu, Z., Chung, W.-H., Shim, E.Y., Lee, S.E., and Ira, G. (2008). Sgs1 helicase and two nucleases Dna2 and Exo1 resect DNA double-strand break ends. *Cell* 134, 981–994.

Zierhut, C., and Diffley, J.F.X. (2008). Break dosage, cell cycle stage and DNA replication influence DNA double strand break response. *EMBO J.* 27, 1875–1885.

Zou, L., and Elledge, S.J. (2003). Sensing DNA damage through ATRIP recognition of RPA-ssDNA complexes. *Science* 300, 1542–1548.

Zou, L., and Stillman, B. (1998). Formation of a preinitiation complex by S-phase cyclin CDK-dependent loading of Cdc45p onto chromatin. *Science* 280, 593–596.

Zou, L., and Stillman, B. (2000). Assembly of a complex containing Cdc45p, replication protein A, and Mcm2p at replication origins controlled by S-phase cyclin-dependent kinases and Cdc7p-Dbf4p kinase. *Mol. Cell. Biol.* 20, 3086–3096.

Annexe

Annexe 1

L'expression du mutant Rad51-3A confère une légère résistance au CPT comparativement au mutant nul *rad51-d*. la figure représente un test sur gouttes où la sensibilité d'une souche sauvage (*rad51+*) est comparée à deux clones du mutant *rad51-3A* et un mutant nul (*rad51-d*).

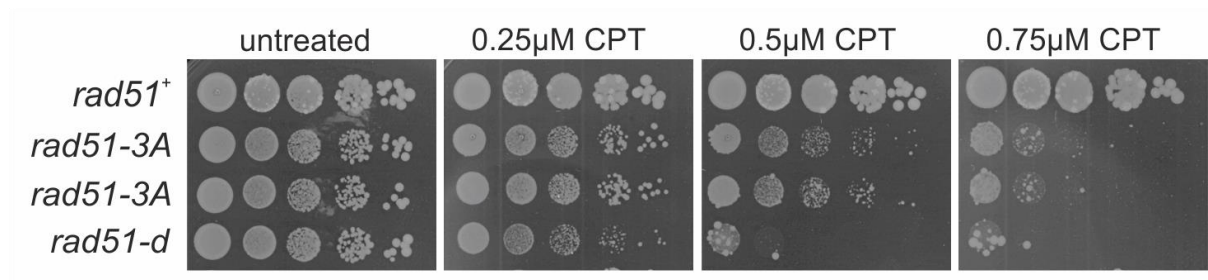


Figure : Sensibilité du mutant Rad51-3A à la camptothécine (CPT).

Annexe 2

De façon spontanée les cellules *rad52-d* montrent un nombre important de foyers RPA comparativement aux cellules *wt*. La délétion de *exo1-d* permet supprimer, en partie, les foyers surnuméraires dans mutant *rad52-d* mais pas dans les cellules *wt*.

En plus d'une différence dans le nombre de cellules présentant des foyers RPA, il a été remarqué que le mutant *rad52-d* présente des foyers RPA beaucoup plus intenses que ce qui est observé dans les cellules *wt*. Pour comparer les deux intensités de foyers, les cellules *wt* et *rad52-d* ont été mises en cultures séparément puis rassemblées dans un même tube avant de les déposer sur une lamelle de microscopie. Les cellules *wt* expriment une nucléopore fusionnée à une étiquette CFP. Ainsi, les cellules *wt* se distinguent des cellules *rad52-d* de par la présence d'un signal CFP positif correspondant à la membrane nucléaire (Figure ci-dessous) et l'intensité des foyers peut être comparé sur un même plan avec les mêmes paramètres.

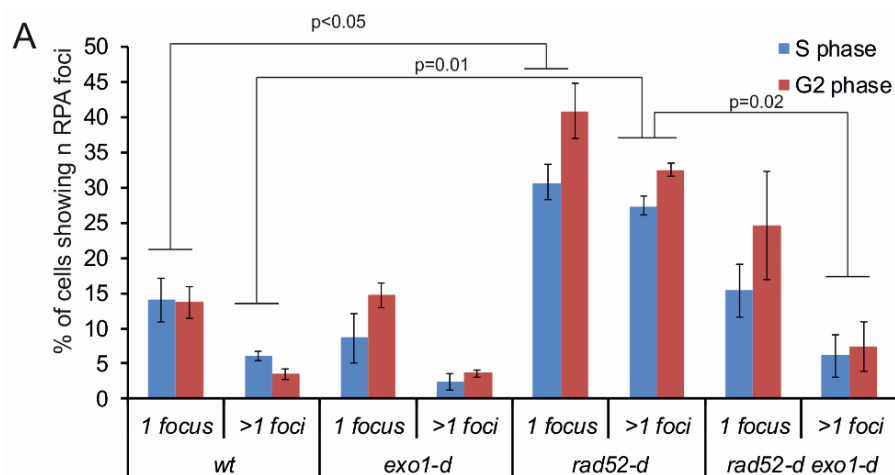
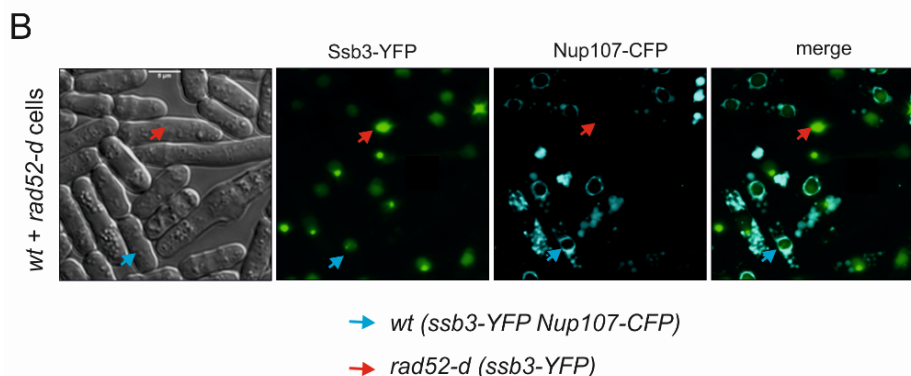


Figure : Analyse des foyers spontanés de RPA. (A) Quantification du pourcentage de cellules montrant 1 ou plus de 1 foyer RPA dans les souches indiquées. **(B)** Analyse qualitative des foyers RPA dans les cellules sauvages (*wt*) et *rad52-d*. les cellules des deux génotypes sont mélangées ensemble. Pour distinguer les cellules *rad52-d* des cellules *wt*, celles-ci expriment une étiquette fluorescente (CFP) associée à la nucléopore Nup107. Ainsi, les cellules *wt* peuvent se distinguer



des cellules *rad52-d* de par la présence d'un signal détecté par le filtre CFS et qui correspond à l'enveloppe nucléaire. La flèche bleue indique la présence d'un foyer dans une cellule *wt*. La flèche rouge indique un foyer intense détecté dans une cellule *rad52-d* (absence du marquage CFP).

Annexe 3

Preserving replication fork integrity and competence via the homologous recombination pathway.

Anissia Ait Saada^{1,2}, Sarah AE Lambert^{1,2} and Antony M. Carr³

¹ Institut Curie, PSL Research University, CNRS, UMR3348 F-91405, Orsay, France.

² University Paris Sud, Paris-Saclay University, CNRS, UMR3348, F-91405, Orsay, France.

³ Genome Damage and Stability Centre, School of Life Sciences, University of Sussex, Falmer, Sussex BN1 9RQ, UK.

Abstract

Flaws in the DNA replication process have emerged as a leading driver of genome instability in human diseases. Alteration to replication fork progression is a defining feature of replication stress and the consequent failure to maintain fork integrity and complete genome duplication within a single round of S-phase compromises genetic integrity. This includes increased mutation rates, small and large scale genomic rearrangement and deleterious consequences for the subsequent mitosis that result in the transmission of additional DNA damage to the daughter cells. Therefore, preserving fork integrity and replication competence is an important aspect of how cells respond to replication stress and avoid genetic change. Homologous recombination is a pivotal pathway in the maintenance of genome integrity in the face of replication stress. Here we review our recent understanding of the mechanisms by which homologous recombination acts to protect, restart and repair replication forks. We discuss the dynamics of these genetically distinct functions and their contribution to faithful mitotic segregation.

Genome duplication is a highly controlled process organized in three main steps: the firing of replication origins to initiate DNA synthesis; elongation by replication forks that progress bi-directionally from origins to copy the DNA and termination, when converging forks meet and fuse (reviewed in (1)). Eukaryotic genomes contain multiple replication origins, the firing of which is spatially and temporally regulated (reviewed in (2)). During an individual S phase, only a subset of the potential origins are instrumental in genome duplication. The remaining dormant origins are passively replicated by forks emerging from neighboring active origins. The resources necessary for DNA synthesis, such the availability of dNTPs and core replication factors, require a careful balance between initiation and elongation (3, 4). Excessive origin firing is detrimental to genome maintenance because it results in the exhaustion of replication factors. Conversely, the slow progression of replication forks provides a window of time for dormant origins to fire, promoting the completion of DNA replication before cells enter mitosis in order to avoid mitotic abnormalities and the transmission of damage to the next generation.

Alterations to the dynamics of genome duplication can lead to replication errors that cause genome instability, from the nucleotide level up to large-scale chromosomal rearrangements (reviewed in (5)). Such changes to DNA replication are collectively known as replication stress (Figure 1), a term that covers a wide variety of situations, including intrinsic fork-obstacles (i.e. DNA bound proteins and DNA-RNA hybrids), DNA damage, secondary DNA structures, deficiency or excess of origin firing and replication occurring in inappropriate metabolic conditions (for example, without fully coordinated regulation of the cell cycle - often referred to as unbalanced DNA replication). The majority of these events result in alterations to replication fork progression and challenge the faithful duplication of the genome (reviewed in (6, 7)).

Slow or arrested replication forks stimulate the use of potentially mutagenic DNA repair pathways that can lead to the accumulation of mutations and chromosomal rearrangements (reviewed in (8, 9)). In addition, if the slow progression of replication cannot be compensated by the firing of dormant origins, there is the risk that cells will enter mitosis with unresolved replication intermediates (Figure 1). This is exemplified at common fragile sites (CFS), which are defined as being prone to DNA breakage in mitosis (reviewed in (2)). CFS are often replicated late in S phase and/or associated with origin-poor genomic regions. When un-replicated loci segregate, the intertwined DNA strands in the un-replicated region form an ultra-fine bridge (UFB) because each strand of the duplex belongs to a separate sister chromatid (10–13). Thus, the DNA is stretched during mitosis. CFS-associated UFBs are refractory to conventional staining with DNA intercalating agents and are rapidly coated by proteins, including PICH (Plk1-interaction checkpoint helicase) and the single stranded DNA

binding protein RPA. UFBs resulting from the segregation of un-replicated chromosome regions can be distinguished from other UFBs (for example those associated with topologic entanglement at centromeres) because they are flanked by two sister FANCD2 (Fanconi Anemia group D2) foci (reviewed in (14)). Thus, replication stress favors the formation of a subclass of UFBs that are likely to break during mitosis, generating DNA lesions that are transmitted to the two daughter cells (15–18).

The current interest in understanding the cause, and biological consequences of, replication stress derives from observations that replication stress frequently accompanies pathological and physiological processes. For example, endogenous replication stress has been demonstrated to be a common source of genome instability in pre-neoplastic lesions, contributing significantly to the acquisition of the multiple genetic modifications that define carcinogenesis (19, 20), reviewed in (21). Known as "oncogene-induced replication stress" (OIS), this is thought to arise because the initial activation of an oncogene interferes with the DNA replication program, forcing cells to initiate DNA synthesis in inappropriate metabolic conditions. These may include insufficient dNTP pool, insufficient or excessive licensed origins, conflicts with the transcription program and replication in the presence of inappropriately active nucleases due to cell cycle dysregulation (22–26). Unbalanced DNA replication due to OIS causes cells to accumulate mutations in S phase and to enter mitosis with persistent and/or unusual replication intermediates (Figure 1). The processing of such intermediates can also contribute to oncogene-induced genotoxicity (27). At later stages of carcinogenesis, replication stress has also been linked to structural and numerical chromosomal instability (CIN) that fuels the process of metastasis (28, 29). In addition to contributing to carcinogenesis through inducing mutations and chromosome instability, replication stress has also been proposed to represent an Achilles heel of cancer cells that can be chemically targeted for anti-cancer therapy (30).

Replication stress has also been linked to normal physiology: embryonic stem cells (ESCs) and pluripotent stem cells (PSCs) are characterized by rapid proliferation and constitutively express hallmarks of replication stress. These include the presence of DNA repair foci in unperturbed cells, reduced DNA replication fork speed and the excess accumulation of single stranded DNA at replication forks (31). Cellular differentiation alleviates the expression of these replication stress markers. Since the endogenous replication stress observed in old hematopoietic stem cells impacts on their self-renewal capacity (32), replication stress is proposed to underlie the functional decline of PSCs. Induced PSCs (iPSCs), derived by reprogramming adult somatic cells, also exhibit replication stress and associated genome instability, compromising their use in regenerative medicine (33). Lowering replication stress

using chemical tools has therefore been proposed as one strategy to optimize the use of PSCs and iPSCs in regenerative medicine.

Because the progression of replication forks is an intrinsically precarious process, replication forks need to be well-escorted in order that they can appropriately react to obstacles. When a replication fork transiently stalls, is subjected to prolonged arrest or collapses to become dysfunctional, it is likely to be rescued by a converging fork, the arrival of which is favored by the activation of a nearby dormant origin. When a converging fork is not available to resolve the problem caused by a stalled dysfunctional fork (for example when two converging forks collapse in a region with no intervening replication origin), the dysfunctional fork must be restarted if the cell is to avoid trying to separate un-replicated chromosome regions. Importantly, these two fork rescue pathways, fork-restart and rescue by a converging fork, are in dynamic competition. The restart of a replication fork can be initiated and then aborted because of the arrival of an opposite fork. Recently, it has been revealed that these two fork rescue pathways require distinct functions of the homologous recombination pathway, which are discussed below (34).

In many experiments where cells are treated with agents that cause genome-wide replication stress, it is difficult to know if the individual affected forks are functional or dysfunctional. For example, the initial cellular response to inhibition of DNA polymerases (for example using hydroxyurea to deplete dNTP pools or aphidicolin to directly inhibit polymerization) is activation of the intra-S phase checkpoint. This pathway attempts to maintain the stalled or slow fork in a replication competent state and, depending on the origin of the fork obstacle, collaborate with a variety of accessory DNA helicases and DNA repair factors to aid the timely resumption of fork elongation. If successful, such replication competent forks simply resume canonical DNA replication. For those forks that do become dysfunctional (and the proportion of these is expected to increase over time), it is unclear what happens both at the level of fork DNA structure and the association of replication proteins. When forks become dysfunctional, helicases and repair factors preserve the integrity of the fork to facilitate either its fusion with a converging fork or, less frequently, to restart replication in order to complete S phase. These processes utilize the homologous recombination (HR) pathway and are discussed in more detail below.

The HR pathway and replication stress tolerance

HR is an evolutionarily conserved DNA repair pathway whose pivotal player is the recombinase RecA in prokaryotes and Rad51 in eukaryotes (reviewed in (35)). HR is involved in the repair of several types of DNA lesions, including Double Strand Breaks (DSBs) and single stranded DNA gaps (ssDNA gaps). Research in prokaryotes first established that HR is intimately coupled to the process of DNA replication, escorting the progressing replication forks to protect and, if necessary, repair and restart them. Subsequently, HR has also been shown to be a key pathway that allows eukaryotic cells to tolerate replication stress (36–39). Thus, HR is believed to have therapeutic relevance to anti-cancer therapy.

RecA and Rad51 exhibit many biochemical properties in vitro, the regulation and biological functions of which are not fully elucidated in vivo (reviewed in (40)). Both proteins bind ssDNA and, to a less extent, dsDNA. The binding to ssDNA requires RecA or Rad51 to bind ATP and is cooperative, allowing a nucleoprotein filament to form around ssDNA. Eukaryotic Rad51 has poor ATPase activity but, upon ATP hydrolysis, Rad51 loses affinity for ssDNA. Following ATP binding and filament formation, Rad51 promotes pairing between homologous DNA molecules, strand invasion and strand exchange. In vivo, the Rad51-filament is thought to be the active recombination intermediate driving the homology search, the subsequent pairing of homologous sequences and strand invasion step of recombination.

In vivo, the activity of eukaryotic HR has been most extensively studied in the context of DSB repair (reviewed in (41)). Recombinational repair of DSBs is initiated by the 5'-3' resection of DSB ends to expose a ssDNA with 3' ends that are coated with RPA. The subsequent formation of stable Rad51 filaments on these substrates requires numerous HR mediators. The main mediator in yeast models (*S. cerevisiae* and *S. pombe*) is Rad52, which is required to displace RPA and facilitates loading of Rad51. Yeast Rad52 also possesses a separate single strand annealing activity that can mediate Rad51-independent recombination events: Rad52 promotes the pairing of two complementary ssDNA that are coated with RPA. In metazoans, the key Rad51 loader is BRCA2 rather than Rad52. Heterozygous mutation of BRCA2 predisposes patients to ovarian and breast cancers. BRCA2 is not structurally related to Rad52, has no single strand annealing activity and is not able to displace RPA from ssDNA. This last function is achieved by DSS1, a BRCA2 interacting factor, which mimics DNA to facilitate RPA displacement (42). Metazoans do contain a structural homolog of Rad52 that plays a role in tolerating replication stress, but this function appears to utilize the single strand annealing activity of Rad52 and is reported to be independent of Rad51 (43, 44).

In mammalian cells the Rad51 pathway of HR is not active in G1 (45, 46). In S phase and G2, once the Rad51 nucleoprotein filament is formed it promotes a homology search and invades

a homologous duplex (usually this target sequence is the sister chromatid) to form a three-stranded paranemic intermediate. The invading strand then displaces one of the strands of the recipient duplex and anneals with the complementary strand. The non-complementary strand is displaced as a ssDNA coated with RPA. The resulting structure is called a displacement loop (D-loop). The 3' end of the invading strand is capable of priming DNA synthesis, thus promoting repair of the DSB. At a dysfunctional replication fork, the formation of a D-loop would provide an appropriate opportunity to re-prime DNA synthesis (Figure 2A). While the D-loop is formed during DSB repair from a processed DNA end, there is accumulating evidence that the biological functions of HR at replication forks can occur independently of DSBs formation by fork cleavage. Indeed, at a replication fork, the two sister chromatids are physically associated, promoting any HR events to the appropriate template. Cleaving such a structure would likely increase the potential for ectopic recombination, an important consideration for the highly repetitive genomes of metazoan organisms

Repairing replication forks by Break-induced replication

In prokaryotes replication generally initiates at a single origin and two forks replicate an entire circular chromosome (reviewed in (47)). Thus, replication is largely unidirectional within each half of the chromosome. Because of this, a dysfunctional fork is not usually rescued by a converging fork. Replication is therefore restarted at dysfunctional forks by recombination-dependent replication (RDR). To effect RDR, a dysfunctional fork is, if not already broken, first cleaved to form a single-ended DSB that is rapidly processed to ssDNA and coated with a RecA filament that subsequently invades the template duplex to establish a D-loop. The resulting DNA structure is rapidly processed by nucleases and the resulting RDR fork appears to be canonical, with the replicative helicase being reloaded by a specialized machinery.

In eukaryotic organisms, a single-ended DSB can also initiate replication, but the mechanism is somewhat different to that in prokaryotes, most likely because the necessary loading of the Cdc45-MCM-GINS (CMG) replicative helicase outside of G1-S phase would conflict with the mechanism required to ensure a single round of replication per cell cycle (48). In addition, the requirement for RDR in eukaryotes is much reduced since the majority of dysfunctional forks are rescued by a converging fork derived from a nearby origin of replication. Budding yeast has been extensively used to characterize replication events induced by a DSB end (known as BIR; break-induced replication, reviewed in (49)). The experimental system used involves generating a single site-specific enzymatic break in G2 cells (note: both sister chromatids are cleaved and thus the sister chromatid cannot act as a template for strand invasion) where only one end of the break has homology to a separate template chromosome. Thus BIR, as

generally characterized, is focused on RDR initiated in G2, where the template is on a separate chromosome.

The initiation of BIR in budding yeast can follow at least two pathways: Rad51 (the eukaryotic orthologue of RecA) is required for the most common pathway (Figure 2B). This requires a region of homology in excess of 70 bp (50–52). In G2 cells there is a delay of several hours between strand invasion and the initiation of DNA synthesis within the D-loop (53), most likely caused by activation of a checkpoint that monitors second end capture (an ill defined pathway that ensures both ends of a DSB engage in DSB repair (54)). In the absence of Rad51, a second pathway that uses the strand annealing activity of Rad52 can initiate replication (55). This Rad51-independent BIR pathway, which is generally suppressed in the presence of Rad51 (50), can be initiated at shorter regions of homology (microhomology and regions of homeology such as those present in Ty elements of budding yeast) and is thus more prone to generate gross chromosomal rearrangements (56). Rad51-independent BIR is initiated very late, likely after the cell has attempted mitosis one or more times and secondary damage is caused by aberrant chromosome fusions and segregation.

Once established, BIR forks are not canonical and replication proceeds via a migrating D-loop (57–59) that can travel for over 100 kb, a form of replication that results in conservative (as opposed to canonical semi-conservative) DNA replication (Figure 2B). While the precise architecture of the machinery driving BIR is not known, it requires various helicases such as Pif1 and Sgs1, leading and lagging strand synthesis are not coupled (58), the inessential polymerase delta accessory factor Pol32 is required (51) and the majority of the DNA is synthesized by polymerase delta. Although there are conflicting reports as to the requirement for the CMG replicative helicase (59, 60), intuitively it is hard to envisage how this specialized machine would be required for D-loop migration and it is also unlikely that G2 cells would attempt to load this key marker of replication competence because this would counteract the complex processes that ensure a single round of replication in each cell cycle.

An important feature of BIR is the high level of mutations produced during replication. These arise through various processes including replication fork slippage, template exchange events and erroneous base substitutions that are inefficiently corrected by mismatch repair (58, 61, 62). In addition, the newly synthesized strand is present in the cell for an extended period as single stranded DNA because leading and lagging strand synthesis are not coupled. This can result in two additional issues; firstly, newly replicated bases on the single-stranded leading strand are more susceptible to modifications that cannot be repaired in the usual fashion from an opposing duplex strand (58, 63). Second, extensive ssDNA attracts Rad51 and this can result

in promiscuous strand invasions that must be kept in check by anti-recombinases such as Srs2 (64). Further genomic instability results from the potential for loss of heterozygosity associated with copying the homologous chromosome and by the resolution of the D-loop junction (most likely when BIR is paused) by structure-specific nuclease to cause "half-crossovers" (65, 66).

While BIR has been extensively studied in G2/M phase in budding yeast, a recent study examined BIR in budding yeast S phase cells by using a nickase to introduce a site-specific persisting single strand nick that is processed to a DSB when encountered by the replication fork (67) (Figure 2A). This identified some significant differences between the two cell cycle stages: while replication was restarted in S phase in a Rad51-dependent manner and was highly error prone, initiation occurred without the two hour delay associated with the second-end capture checkpoint and Mus81 activity limited the length of DNA that was replicated in a highly error prone manner. This is most likely because the D-loop was being "reset" into a more fork-like structure. It was not clear if replication continued after this Mus81 activity in a less error-prone manner or simply stopped, allowing the downstream sequences to be replicated by an incoming converging fork. As expected (and which was shown previously (68, 69) using a DSB-free recombination-dependent replication system in fission yeast - see below), it was also noted that incoming canonical forks rescued the increased mutation frequency associated with BIR in S phase. These differences may reflect the physiological role of BIR in S phase: the rescue of dysfunctional broken replication forks that are not resolved by converging fork. It is possible that BIR in G2/M cells is simply a consequence of failed homologous recombination (i.e. a pathological response to failed second end capture). However, it may have a physiological function in rescuing DSBs introduced within or close to telomeres, where one chromosome fragment can be lost due to its small size.

BIR in metazoan cells has been implicated in restarting DNA replication during S phase in *Xenopus* in response to DSBs introduced specifically at replication forks (70) and in human cells at fragile sites or when they are mutated in some key homologous recombination proteins such as BRCA2 (44, 71, 72). It has also been proposed to play a role in telomere maintenance in ALT (alternative lengthening of telomeres) cells (73–75). The error prone nature of BIR has thus been proposed to underpin a wide range of genetic lesions associated with human disease and cancer (43, 62, 76, 77). The formal definition of BIR - replication initiated from a DNA double strand break - may not always apply to recombination dependent DNA synthesis in mammalian cells, which can also be initiated from single strand lesions associated with dysfunctional replication forks (see below). Indeed, there is circumstantial evidence that the first response to a dysfunctional mammalian replication forks is not associated with DSB formation. DSBs arise later, possibly providing an alternative opportunity

to rescue the situation (78, 79). Unfortunately, the nomenclature used across the field regarding the status of a replication fork is not consistent and in many experiments it is not possible to clearly distinguish between arrested forks that remain competent to resume and dysfunctional forks that would first need to be restarted (likely by HR-based mechanisms). In addition, there is a tendency to assume that RDR in metazoans is always initiated through a DSB intermediate, so BIR is often considered synonymous with RDR in eukaryotes. These issues cause confusion, prevent a clear distinction between the metabolism of stalled (replication competent) and dysfunctional forks, and encourage the assumption that recovery of all forms of dysfunctional forks can essentially be considered as a single pathway.

However, Rad51-dependent RDR in human cells has clear links with genome rearrangements that occur between repeated sequences due to ectopic recombination and the many microhomology-mediated events observed in human genetic disorders and cancer cells (21, 80, 81). Micro-homology-mediated rearrangements have been attributed to a model known as micro-homology-mediated break induced replication (MMBIR (82–84), which is proposed to be Rad51-independent and equivalent to the Rad51-independent BIR characterized in *S. cerevisiae*. However, it remains unclear how distinct MMBIR is from Rad51-dependent RDR, since the template switching that occurs during Rad51-dependent RDR (BIR) - also related to the Fork Stalling and Template Switching model (FoSTeS (85)) - could explain some, if not the majority, of the rearrangements attributed to MMBIR.

Recent work has identified mitosis-specific DNA synthesis (MiDAS, Figure 2C) in human cells (72, 86). MiDAS is conservative, Rad51 independent and Rad52 dependent (43, 44). MiDAS has been shown to occur at common fragile sites and at telomeres in cancer cells that maintain telomeres by ALT. Interestingly, MiDAS acts at CFS to suppress the formation of ultrafine bridges, and may represent a final opportunity to complete replication. MiDAS is initiated by the cleavage of persistent arrested fork structures by Mus81 and Slx4 (44, 87) which is itself activated by Polo-like kinases to cleave Holliday junction-like structures when cells are preparing for mitosis (88). Similarly at telomeres, Rad51-independent BIR may provide a final opportunity to elongate telomeres with arrested replication forks (73, 74), using either single stranded regions of another telomere or extrachromosomal telomere circle. The fact that both are apparently independent of Rad51 but depend on Rad52 strongly suggests that these replication events are not initiated by strand invasion, but by strand annealing.

Taken together, the evidence from metazoan cells clearly implicates RDR in a multitude of fork recovery pathways and it is obvious that in many instances (for example a replication fork encountering a single strand break) this can initiate from a DNA - DSB and thus is thus formally

equivalent to BIR as defined by the extensive analysis in budding yeast. However, RDR without an intervening DSB is also possible (see below) and it remains unclear how extensively these two pathways are used in human cells.

Recombination-dependent replication restart without a DSB.

The use of engineered Replication Fork Barriers (RFBs) has allowed a deeper understanding of the molecular transactions occurring at dysfunctional forks that act to both stabilize and restart them (Figure 3). In the fission yeast *S. pombe*, the *RTS1* barrier has been used extensively to study the response to a dysfunctional replication fork (76, 89, 90). In this system, Rad51-mediated fork restart occurs in ~ 20 minutes and requires Rad52 and the strand exchange activity of Rad51 (34, 69, 91). This supports the model in which Rad51 promotes the invasion of single stranded DNA with a 3' end that acts to template restarted replication. Interestingly, in the *RTS1* system, a DSB is not induced at the site of the collapsed fork and the sister chromatids remain physically attached throughout the restart event (34, 92, 93). Two models can be envisaged that mediate HR-dependent fork restart in this context (Figure 3A): either the fork could reverse to form a DSB end that is homologous to the reannealed parental strands, or the fork could simply back-track, allowing annealing of the parental strands without the coordinated annealing of newly replicated strands. In this second scenario, nucleases would be required to remove the newly replicated lagging strand. In support of this, fission yeast Dna2 was shown to cleave nascent strands behind back-tracked forks when wild type cells are exposed to hydroxyurea, thus preventing reversed fork (chicken-foot) formation (94). However, in these experiments the intra-S phase checkpoint was active, which maintains the vast majority of forks in a replication competent state. Whether Dna2 performs an equivalent task at dysfunctional forks has not been addressed.

The formation of ssDNA that allows the formation of the Rad51 filament that is necessary to restart replication at the *RTS1* barrier was recently shown to be regulated in the same manner as resection is regulated to initiate DSB repair (92, 93). An initial short-range resection is mediated by the Mre11/Rad50/Nbs1 (MRN) complex and Ctp1 (the fission orthologue of CtIP). This generates a short ssDNA region of ~ 100-150 bp that can prime long-range resection that is mediated by Exo1, generating larger ssDNA regions of up to 1KB (Figure 4). Interestingly, the initial MRN-Ctp1-dependent resection is sufficient to initiate Rad51-mediated fork restart. Surprisingly, the initial resection was shown to be controlled by the Non Homologous End Joining (NHEJ) factor Ku, which binds to dysfunctional forks to prevent extensive degradation. We hypothesize that Ku recognizes and binds to the regressed arm of a reversed fork, from

which it is subsequently removed by MRN and Ctp1. Thus, as described for DSB repair, the resection of a dysfunctional fork would occur via a two-step process, likely coordinating resection with Rad51 loading. Interestingly, without Rad51 or Rad52, this fork restart is prevented and the arrested forks are extensively resected directly by Exo1 (34) (Figure 4). It is thus possible that Rad52-dependent Rad51 DNA loading generates a DNA structure that is obligatory for Ku recruitment, such as a reversed fork structure (see below) that acts as a key regulatory point in the control of resection. Alternatively, Rad51 and Rad52 may be involved in the active recruitment of the initial end-resection machinery. Consistent with this, mammalian RAD52 is required to prime MRE11-dependent resection of reversed forks in the absence of BRCA2 (95).

Forks restarted at *RTS1* by HR without a DSB intermediate differ from origin-born replication forks (68, 91, 96). Unlike forks initiated by BIR, they progress via semi-conservative DNA synthesis but with both strands being copied by polymerase delta (91) (Figure 3A). Like BIR-initiated forks, forks restarted at *RTS1* are highly mutagenic: DNA synthesis is less processive, liable to replication slippage at micro-homology and highly prone to U-turn switches between inverted repeats that generate acentric and dicentric chromosomes (68, 96). Therefore, Rad51-mediated fork restart may underline copy number variation observed in response to replication stress in human cells. In addition, during the act of restart, the newly replicated strands bound by Rad51 are able to search for homology throughout the genome and thus cause HR-dependent chromosomal rearrangements between repeat sequences (76, 90).

Rad51 has multiple functions during replication, including the safeguarding of arrested forks from becoming dysfunctional, the protection of dysfunctional forks from excessive degradation (thus allowing their successful merger with converging forks (Figure 3B) and the restart of replication either by BIR or in the absence of an induced DSB. In fission yeast, the ability of Rad51 to restart replication forks requires its strand exchange activity whereas its ability to protect dysfunctional forks from degradation requires only its DNA binding activity (34) (Figure 4). It is therefore likely that the ability of the Rad51 filament to perform strand exchange in vivo is tightly regulated during cell cycle to help maintain genome stability. In support of this, budding yeast Rad51, while associated with the fork during S-phase, repairs post replicative gaps only in G2 (Figure 3C) and this repair function is regulated by CDK activity (97). In mammals, the recombination-dependent activity of RAD51 at replication forks is regulated by RADX, a RPA-like single stranded DNA binding protein which antagonizes aberrant RAD51-dependent fork-remodeling (98).

Replication fork-protection and remodeling towards fork-reversal

While the requirement of HR for efficient unperturbed DNA replication could be explained by a necessity for DSB repair of replication-dependent DNA lesions, several papers at the start of the decade identified links between replication and HR that were independent of direct DNA repair in metazoan, as proposed in yeast (76). Hashimoto (99) used *Xenopus* replicating extracts and electron microscopy to show that, in the absence of RAD51, forks accumulated increased levels of MRE11-dependent gaps in the newly synthesized DNA behind the fork and elevated levels of leading and lagging strand uncoupling at the fork junction (these latter being Mre11-independent) (Figure 5). Petermann et al, (78) used DNA combing following short-term (1-2 hours) and long-term (12-14 hours) hydroxyurea exposure to show that RAD51 promoted the resumption of DNA synthesis following short-term inhibition. Only the longer-term inhibition of replication correlated with the formation of DSBs, which are likely to be associated with the activity of Mus81 (100, 101).

These functions for HR proteins in protecting replication forks from the accumulation of DNA lesions following short-term replication arrest and preventing forks from becoming dysfunctional (or rapidly restarting them if they did) were extended by the work of Schlacher et al, (102, 103). These studies used DNA fiber analysis to show that, when replication was inhibited by hydroxyurea in BRCA2 deficient cells, newly replicated DNA was rapidly (within 15 minutes) degraded at a rate of between 1.8 - 2.2kb per hour in an Mre11-dependent manner (Figure 3B). This protection of forks from degradation required Rad51 filament formation plus filament stabilization by BRCA2 (102) and the core Fanconi anaemia pathway (103). Because Fanconi anaemia cell lines displayed severe fork de-protection phenotypes but can undergo classical DSB repair, it was proposed that fork protection defined a novel "recombination independent" function for HR, where the formation of a RAD51 filament protected ssDNA rather than promoting strand exchange (Figure 5).

Despite the fact that Fanconi anaemia and BRCA2-defective cells are defective in fork protection (as defined by the inability to prevent nascent strand degradation), they do not show a reduced ability to restart transiently stalled forks or display significant sensitivity to transient replication arrest (102, 103). However, they do show an increase in genome instability after such treatments, manifesting chromatid breaks and radial structures on mitotic chromosome spreads. This contrasts with cells defective in the BLM helicase, which show a decrease in fork resumption and an increase in sensitivity to fork-stalling agents (104), despite not being defective for fork protection (103). Thus, protection of forks by HR proteins, which prevents nascent strand degradation and the appearance of single stranded gaps by

electron microscopy analysis, does not directly equate to preventing forks becoming dysfunctional and suggested that RAD51 plays multiple and separable roles in regulating replication.

It remains unclear why the loss of fork protection is detrimental to genome integrity following replication stress: conceptually, unprotected forks could be efficiently rescued by converging forks. Perhaps an explanation can be extrapolated from a recent study in fission yeast. This showed that dysfunctional forks arrested at *RTS1* in the absence of Rad51 accumulate large ssDNA gaps and that, despite the presence of a converging fork, these unprotected forks are converted into sister chromatid bridges during mitosis, which subsequently break (34) (Figure 4). This demonstrated that the lack of Rad51 impaired appropriate fork merging. This role of Rad51 in promoting fork merging was dependent on its ability to bind DNA and to form a filament, but not on the ability to engage in strand exchange, a situation reminiscent of fork protection described by Schlacher et al. (102). Thus, while these arrested forks in the fission yeast were dysfunctional, the ssDNA associated with unprotected, but otherwise functional, forks in human cells could cause a similar failure of fork merging: RAD51, BRCA2 and the Fanconi anaemia pathways may hence function to maintain transiently arrested forks in a conformation that is competent for termination. Consistent with this, linear DNA harboring a ssDNA overhang bound by RAD51 filament (but not when bound by RPA) is resistant to MRE11-mediated degradation in vitro (105). In light of the complexity of the function of HR factors during DNA replication, it remains to be defined which BRCA2 and HR functions are critical to suppress tumor initiation.

A specific DNA structure at replication forks, known as a reversed fork or chicken-foot, has emerged as a pivotal intermediate during the response to replication stress of metazoan cells ((106, 107) (reviewed in (108)). At reversed forks, the newly replicated strands are annealed together in a manner that is coordinated with the re-annealing of the parental strands, forming a four-way structure equivalent to a Holliday junction (Figure 3B). Fork-reversal was initially proposed as a DNA configuration that allowed DNA damage tolerance by translesion DNA synthesis (109). Physical evidence for reversed forks in eukaryotic cells was first provided by their visualization by electron microscopy: checkpoint-defective mutants of the yeast *S. cerevisiae* that were dying from unresolved replication stress showed high levels of reversed fork structures, but these were not seen in wild-type cells exposed to equivalent stress (110). This initially led the hypothesis that fork reversal represented pathological "dead-end" DNA structures at terminally arrested forks. However, subsequent studies established that fork reversal occurs at high frequency upon reversible replication stress in numerous biological systems, including mammalian cells (106) and physarum polycephalum (111). They could also be induced non-pathologically in the fission yeast *S. pombe* (94). A broad spectrum of intrinsic

and exogenous replication stresses are now known to promote the extensive formation of reversed forks in many organisms. These include dNTP depletion, various DNA damaging agents, topoisomerase inhibitors, intrinsically difficult to replicate sequences (such as trinucleotide repeats) and oncogene expression causing unbalanced DNA replication. Reversed forks have also been observed in rapidly divided embryonic stem cells (31, 112).

A high frequency of fork reversal therefore appears to be a conserved cellular response to replication stress. Likely, forks encountering obstacles rapidly undergo controlled fork reversal but remain fully capable of resuming DNA replication. Indeed, it cannot be excluded that forks which have not been physically impeded in their progression could undergo fork reversal as a consequence of a global cellular response acting in *cis*. Fork reversal appears to provide a way to prevent the degradation of newly synthesized DNA and the associated accumulation of lesion that can result in genetic instability (71, 95, 105, 113). This would not conflict with the original hypothesis, where the annealing of the two newly synthesized strands can also provide the opportunity for DNA damage tolerance by translesion synthesis. Furthermore, the annealing of the parental strands may allow to remove the original problem by providing, for example, the correct context for repairing base lesions. To what extent fork reversal is an obligatory DNA intermediate during the resumption of replication by an otherwise competent fork remains unclear. In mammalian cells, the RecQ-like helicase RecQL1 has the ability to migrate reversed forks to resolve the reversed fork structure and allow replication to be resumed (114). Alternatively, the regressed arm of a functional but reversed fork may be fully resected by nuclease activities, such as DNA2 as has been proposed in fission yeast (94) and humans (115). The fate of the replisome during fork reversal is unknown and the exact role that the reversed fork structure plays in handling replication dynamics therefore remains to be defined.

When forks are reversed, they are protected from extensive degradation by the stabilization of RAD51 filaments by BRCA2. In the absence of BRCA2, reversed forks are rapidly degraded, resulting in nascent strand loss (fiber analysis) and a reduction in the steady-state level of reversed forks upon electron microscopy (Figure 5). Surprisingly, the initial fork-reversal in both BRCA2 proficient and deficient cells is also dependent on RAD51 (71, 95). This function in initiating fork reversal can be genetically separated from the function of RAD51 in protecting reversed forks: a mutant of RAD51-T131P that results in unstable RAD51 filaments is able to promote reversed forks (in both BRCA2 proficient and deficient hydroxyurea treated cells) but is unable to protect reversed forks from subsequent degradation when BRCA2 is present (95, 116). Thus, RAD51 has a BRCA2-independent function in promoting fork reversal followed by a BRCA2-dependent function in protecting the reversed fork from excessive degradation (Figure 5). Consistent with a stable filament-independent role for Rad51 at

replication forks that is independent of BRCA2, a fraction of Rad51 can associate with chromatin undergoing replication in the absence of BRCA2 (105, 117). Potentially, Rad51 associates with replication forks even in the absence of stress to facilitate fork progression through intrinsic fork obstacles. In fission yeast, Rad51 has been reported to associate directly with the CMG helicase (118) and, in budding yeast, Rad51 association with the replication fork is a prerequisite to ensure the later repair of damage induced-ssDNA gaps left behind the moving fork (97). A physical association between the DNA polymerase alpha and Rad51 has also been suggested to facilitate leading-strand re-priming downstream of DNA lesions to ensure continuous fork progression (105). Thus, there is ample prescient for recombination-independent functions for Rad51 during DNA replication.

In addition to occurring at functionally competent forks, fork reversal is likely to accompany dysfunctional forks that cannot resume replication without the intervention of the HR machinery. A potential benefit of fork reversal in this situation is the formation of a structure (a DSB end) that can provide an entry point for the resection machinery (Figure 4) (93, 115). This provides an opportunity to regulate the production of a 3' ssDNA that can be used to establish a D-loop on the reannealed parental strands that can prime DNA synthesis if the dysfunctional fork is not rescued by a converging fork. Indeed, in fission yeast the requirement for Ku in the regulation of resection at dysfunctional forks has led to the proposal that fork reversal is instrumental during Rad51-mediated restart of dysfunctional forks. The formation of a reversed fork may be important for the coordination of the resection with fork restart by homologous recombination (see above). It remains unclear if the lack of visualization of reversed fork structures by electron microscopy in wild type yeast cells subjected to replication stress is a consequence of fork reversal not being a common response to replication perturbation in simple eukaryotic organisms, or if these structures are frequently formed but rapidly resolved.

It again remains unclear if fork reversal to provide a regressed double stranded arm is an obligatory step in restarting a dysfunctional fork. As discussed above, an alternative would be to degrade the nascent lagging strand while displacing the nascent leading strand and reannealing the two parental strands (Figure 3A). Nonetheless, once a regressed arm has formed, experiments in fission yeast suggest that its controlled resection is necessary to ensure restart. Alternative models for fork restart from a reversed fork propose that MUS81 resolves the Holliday junction to generate a single-ended DSB (71, 72, 119, 120). While single ended breaks generated in S phase by replication of a persisting ssDNA nick (as in BIR, see above) is clearly permissive to restarting replication, it is unclear if MUS81-dependent cleavage of arrested forks is a major pathway of fork restart by HR, either in yeast or in human cells. Petermann et al, (78) suggested such breaks only appear in human cells after extensive

(24 hour) incubation in hydroxyurea and that these DSBs are not the initiating point for subsequent replication: replication occurring after release from 24 hours hydroxyurea arrest instead initiated from new origin firing. There is evidence of MUS81-dependent breaks and associated replication restart in BRCA2 deficient cells (but intriguingly not in BRCA1-deficient cells) that have been treated with hydroxyurea for 2 hours (71), but at present there is insufficient evidence to support MUS81-dependent breaks forming as a physiological response to fork arrest, or to determine if such breaks engage in BIR.

Concluding remarks

The resistance of BRCA-deficient tumors to chemotherapy treatments, including PARP inhibitors, is closely associated with restoration of replication fork protection, prompting a significant effort to understand how replication fork dynamics impacts on cancer treatments (121, 122). Numerous additional proteins have been shown to mediate fork reversal and thus potentially restrain MRE11 activity at reversed forks including BRCA1, RAD54, REV1, RECQL5, PARP1 (122), FBH1 (a conserved UvrD-family 3'-5' DNA helicases) (123) FancM (Fanconi anemia 3'-5' DNA helicase) (reviewed in (107)). Whether the fork-reversal activities of specific factors are related to specific features of stalled and arrested forks that generated by distinct barriers, or whether they have largely redundant activities at all arrested forks remains unknown. It is known that some factors travel with the replication machinery and, in vitro, some (such as SMARCAL1, ZRANB3 and HLF) recognize different fork structures and have differential requirements for RPA-bound ssDNA gap to promote in vitro helicase/translocase activities.

Several other proteins have been implicated in the inhibition of resection factors acting downstream of MRN, DNA2 (BOD1L) and EXO1 (WRN) (124). Many additional proteins have been implicated either directly or indirectly in fork remodeling. These including SWI/SNF helicase-like proteins such as yeast Rad5, its human orthologue HLF and a range of potential chromatin-associated factors suggesting that fork dynamics is tightly controlled as an important nexus for the regulation of replication. Understanding how replication fork dynamics are regulated in response to various type of replication stress and during cell cycle progression is critical not only to understand how cells achieve the faithful duplication of their genome, but also to define better anti-cancer therapeutics.

Bibliography

1. Dewar JM, Walter JC. Mechanisms of DNA replication termination. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2017; 18:507-16.
2. Técher H, Koundrioukoff S, Nicolas A, Debatisse M. The impact of replication stress on replication dynamics and DNA damage in vertebrate cells. *Nat Rev Genet* 2017; 18:535-50.
3. Poli J, Tsaponina O, Crabbé L, Keszthelyi A, Pantesco V, Chabes A et al. dNTP pools determine fork progression and origin usage under replication stress. *EMBO J* 2012; 31:883-94.
4. Mantiero D, Mackenzie A, Donaldson A, Zegerman P. Limiting replication initiation factors execute the temporal programme of origin firing in budding yeast. *EMBO J* 2011; 30:4805-14.
5. Gaillard H, García-Muse T, Aguilera A. Replication stress and cancer. *Nat Rev Cancer* 2015; 15:276-89.
6. Lambert S, Carr AM. Impediments to replication fork movement: stabilisation, reactivation and genome instability. *Chromosoma* 2013; 122:33-45.
7. Magdalou I, Lopez BS, Pasero P, Lambert SA. The causes of replication stress and their consequences on genome stability and cell fate. *Semin Cell Dev Biol* 2014; 30:154-64.
8. Lambert S, Carr AM. Replication stress and genome rearrangements: lessons from yeast models. *Curr Opin Genet Dev* 2013; 23:132-9.
9. Watanabe T, Marotta M, Suzuki R, Diede SJ, Tapscott SJ, Niida A et al. Impediment of Replication Forks by Long Non-coding RNA Provokes Chromosomal Rearrangements by Error-Prone Restart. *Cell Rep* 2017; 21:2223-35.
10. Chan KL, Palmal-Pallag T, Ying S, Hickson ID. Replication stress induces sister-chromatid bridging at fragile site loci in mitosis. *Nat Cell Biol* 2009; 11:753-60.
11. Ying S, Minocherhomji S, Chan KL, Palmal-Pallag T, Chu WK, Wass T et al. MUS81 promotes common fragile site expression. *Nat Cell Biol* 2013; 15:1001-7.
12. Naim V, Wilhelm T, Debatisse M, Rosselli F. ERCC1 and MUS81-EME1 promote sister chromatid separation by processing late replication intermediates at common fragile sites during mitosis. *Nat Cell Biol* 2013; 15:1008-15.
13. Naim V, Rosselli F. The FANC pathway and BLM collaborate during mitosis to prevent micro-nucleation and chromosome abnormalities. *Nat Cell Biol* 2009; 11:761-8.
14. Liu Y, Nielsen CF, Yao Q, Hickson ID. The origins and processing of ultra fine anaphase DNA bridges. *Curr Opin Genet Dev* 2014; 26:1-5.
15. Moreno A, Carrington JT, Albergante L, Al Mamun M, Haagensen EJ, Komseli ES et al. Unreplicated DNA remaining from unperturbed S phases passes through mitosis for resolution in daughter cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2016; 113:E5757-64.
16. Lukas C, Savic V, Bekker-Jensen S, Doil C, Neumann B, Pedersen RS et al. 53BP1 nuclear bodies form around DNA lesions generated by mitotic transmission of chromosomes under replication stress. *Nat Cell Biol* 2011; 13:243-53.

17. Pedersen RT, Kruse T, Nilsson J, Oestergaard VH, Lisby M. TopBP1 is required at mitosis to reduce transmission of DNA damage to G1 daughter cells. *J Cell Biol* 2015; 210:565-82.
18. Harrigan JA, Belotserkovskaya R, Coates J, Dimitrova DS, Polo SE, Bradshaw CR et al. Replication stress induces 53BP1-containing OPT domains in G1 cells. *J Cell Biol* 2011; 193:97-108.
19. Gorgoulis VG, Vassiliou LV, Karakaidos P, Zacharatos P, Kotsinas A, Liloglou T et al. Activation of the DNA damage checkpoint and genomic instability in human precancerous lesions. *Nature* 2005; 434:907-13.
20. Miron K, Golan-Lev T, Dvir R, Ben-David E, Kerem B. Oncogenes create a unique landscape of fragile sites. *Nat Commun* 2015; 6:7094.
21. Hills SA, Diffley JF. DNA replication and oncogene-induced replicative stress. *Curr Biol* 2014; 24:R435-44.
22. Ozeri-Galai E, Lebofsky R, Rahat A, Bester AC, Bensimon A, Kerem B. Failure of origin activation in response to fork stalling leads to chromosomal instability at fragile sites. *Mol Cell* 2011; 43:122-31.
23. Mannava S, Moparthy KC, Wheeler LJ, Natarajan V, Zucker SN, Fink EE et al. Depletion of deoxyribonucleotide pools is an endogenous source of DNA damage in cells undergoing oncogene-induced senescence. *Am J Pathol* 2013; 182:142-51.
24. Ekholm-Reed S, Méndez J, Tedesco D, Zetterberg A, Stillman B, Reed SI. Deregulation of cyclin E in human cells interferes with prereplication complex assembly. *J Cell Biol* 2004; 165:789-800.
25. Jones RM, Mortusewicz O, Afzal I, Lorvellec M, García P, Helleday T et al. Increased replication initiation and conflicts with transcription underlie Cyclin E-induced replication stress. *Oncogene* 2013; 32:3744-53.
26. Macheret M, Halazonetis TD. Intragenic origins due to short G1 phases underlie oncogene-induced DNA replication stress. *Nature* 2018;
27. Neelsen KJ, Zanini IM, Herrador R, Lopes M. Oncogenes induce genotoxic stress by mitotic processing of unusual replication intermediates. *J Cell Biol* 2013; 200:699-708.
28. Bakhom SF, Ngo B, Laughney AM, Cavallo JA, Murphy CJ, Ly P et al. Chromosomal instability drives metastasis through a cytosolic DNA response. *Nature* 2018; 553:467-72.
29. Burrell RA, McClelland SE, Endesfelder D, Groth P, Weller MC, Shaikh N et al. Replication stress links structural and numerical cancer chromosomal instability. *Nature* 2013; 494:492-6.
30. Da-Rè C, Halazonetis TD. DNA replication stress as an Achilles' heel of cancer. *Oncotarget* 2015; 6:1-2.
31. Ahuja AK, Jodkowska K, Teloni F, Bizard AH, Zellweger R, Herrador R et al. A short G1 phase imposes constitutive replication stress and fork remodelling in mouse embryonic stem cells. *Nat Commun* 2016; 7:10660.
32. Flach J, Bakker ST, Mohrin M, Conroy PC, Pietras EM, Reynaud D et al. Replication stress is a potent driver of functional decline in ageing haematopoietic stem cells. *Nature* 2014; 512:198-202.
33. Ruiz S, Lopez-Contreras AJ, Gabut M, Marion RM, Gutierrez-Martinez P, Bua S et al. Limiting replication stress during somatic cell reprogramming reduces genomic instability in induced pluripotent stem cells. *Nat Commun* 2015; 6:8036.

34. Ait Saada A, Teixeira-Silva A, Iraqui I, Costes A, Hardy J, Paoletti G et al. Unprotected Replication Forks Are Converted into Mitotic Sister Chromatid Bridges. *Mol Cell* 2017; 66:398-410.e4.
35. Costes A, Lambert SA. Homologous recombination as a replication fork escort: fork-protection and recovery. *Biomolecules* 2012; 3:39-71.
36. Michl J, Zimmer J, Buffa FM, McDermott U, Tarsounas M. FANCD2 limits replication stress and genome instability in cells lacking BRCA2. *Nat Struct Mol Biol* 2016; 23:755-7.
37. Wilhelm T, Ragu S, Magdalou I, Machon C, Dardillac E, Técher H et al. Slow Replication Fork Velocity of Homologous Recombination-Defective Cells Results from Endogenous Oxidative Stress. *PLoS Genet* 2016; 12:e1006007.
38. Wilhelm T, Magdalou I, Barascu A, Técher H, Debatisse M, Lopez BS. Spontaneous slow replication fork progression elicits mitosis alterations in homologous recombination-deficient mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2014; 111:763-8.
39. Feng W, Jasin M. BRCA2 suppresses replication stress-induced mitotic and G1 abnormalities through homologous recombination. *Nat Commun* 2017; 8:525.
40. San Filippo J, Sung P, Klein H. Mechanism of eukaryotic homologous recombination. *Annu Rev Biochem* 2008; 77:229-57.
41. Ranjha L, Howard SM, Cejka P. Main steps in DNA double-strand break repair: an introduction to homologous recombination and related processes. *Chromosoma* 2018;
42. Zhao W, Vaithiyalingam S, San Filippo J, Maranon DG, Jimenez-Sainz J, Fontenay GV et al. Promotion of BRCA2-Dependent Homologous Recombination by DSS1 via RPA Targeting and DNA Mimicry. *Mol Cell* 2015; 59:176-87.
43. Sotiriou SK, Kamileri I, Lugli N, Evangelou K, Da-Ré C, Huber F et al. Mammalian RAD52 Functions in Break-Induced Replication Repair of Collapsed DNA Replication Forks. *Mol Cell* 2016; 64:1127-34.
44. Bhowmick R, Minocherhomji S, Hickson ID. RAD52 Facilitates Mitotic DNA Synthesis Following Replication Stress. *Mol Cell* 2016; 64:1117-26.
45. Karanam K, Kafri R, Loewer A, Lahav G. Quantitative live cell imaging reveals a gradual shift between DNA repair mechanisms and a maximal use of HR in mid S phase. *Mol Cell* 2012; 47:320-9.
46. Orthwein A, Noordermeer SM, Wilson MD, Landry S, Enchev RI, Sherker A et al. A mechanism for the suppression of homologous recombination in G1 cells. *Nature* 2015; 528:422-6.
47. Michel B, Sandler SJ. Replication Restart in Bacteria. *J Bacteriol* 2017; 199
48. Blow JJ, Dutta A. Preventing re-replication of chromosomal DNA. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2005; 6:476-86.
49. Sakofsky CJ, Malkova A. Break induced replication in eukaryotes: mechanisms, functions, and consequences. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 2017; 52:395-413.
50. Ira G, Haber JE. Characterization of RAD51-independent break-induced replication that acts preferentially with short homologous sequences. *Mol Cell Biol* 2002; 22:6384-92.

51. Lydeard JR, Jain S, Yamaguchi M, Haber JE. Break-induced replication and telomerase-independent telomere maintenance require Pol32. *Nature* 2007; 448:820-3.
52. Mehta A, Beach A, Haber JE. Homology Requirements and Competition between Gene Conversion and Break-Induced Replication during Double-Strand Break Repair. *Mol Cell* 2017; 65:515-526.e3.
53. Malkova A, Naylor ML, Yamaguchi M, Ira G, Haber JE. RAD51-dependent break-induced replication differs in kinetics and checkpoint responses from RAD51-mediated gene conversion. *Mol Cell Biol* 2005; 25:933-44.
54. Jain S, Sugawara N, Lydeard J, Vaze M, Tanguy Le Gac N, Haber JE. A recombination execution checkpoint regulates the choice of homologous recombination pathway during DNA double-strand break repair. *Genes Dev* 2009; 23:291-303.
55. Malkova A, Ivanov EL, Haber JE. Double-strand break repair in the absence of RAD51 in yeast: a possible role for break-induced DNA replication. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93:7131-6.
56. VanHulle K, Lemoine FJ, Narayanan V, Downing B, Hull K, McCullough C et al. Inverted DNA repeats channel repair of distant double-strand breaks into chromatid fusions and chromosomal rearrangements. *Mol Cell Biol* 2007; 27:2601-14.
57. Donnianni RA, Symington LS. Break-induced replication occurs by conservative DNA synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013; 110:13475-80.
58. Saini N, Ramakrishnan S, Elango R, Ayyar S, Zhang Y, Deem A et al. Migrating bubble during break-induced replication drives conservative DNA synthesis. *Nature* 2013; 502:389-92.
59. Wilson MA, Kwon Y, Xu Y, Chung WH, Chi P, Niu H et al. Pif1 helicase and Pol δ promote recombination-coupled DNA synthesis via bubble migration. *Nature* 2013; 502:393-6.
60. Lydeard JR, Lipkin-Moore Z, Sheu YJ, Stillman B, Burgers PM, Haber JE. Break-induced replication requires all essential DNA replication factors except those specific for pre-RC assembly. *Genes Dev* 2010; 24:1133-44.
61. Smith CE, Llorente B, Symington LS. Template switching during break-induced replication. *Nature* 2007; 447:102-5.
62. Deem A, Keszthelyi A, Blackgrove T, Vayl A, Coffey B, Mathur R et al. Break-induced replication is highly inaccurate. *PLoS Biol* 2011; 9:e1000594.
63. Sakofsky CJ, Roberts SA, Malc E, Mieczkowski PA, Resnick MA, Gordenin DA et al. Break-induced replication is a source of mutation clusters underlying kataegis. *Cell Rep* 2014; 7:1640-8.
64. Elango R, Sheng Z, Jackson J, DeCata J, Ibrahim Y, Pham NT et al. Break-induced replication promotes formation of lethal joint molecules dissolved by Srs2. *Nat Commun* 2017; 8:1790.
65. Deem A, Barker K, Vanhulle K, Downing B, Vayl A, Malkova A. Defective break-induced replication leads to half-crossovers in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 2008; 179:1845-60.
66. Smith CE, Lam AF, Symington LS. Aberrant double-strand break repair resulting in half crossovers in mutants defective for Rad51 or the DNA polymerase delta complex. *Mol Cell Biol* 2009; 29:1432-41.

67. Mayle R, Campbell IM, Beck CR, Yu Y, Wilson M, Shaw CA et al. DNA REPAIR. Mus81 and converging forks limit the mutagenicity of replication fork breakage. *Science* 2015; 349:742-7.
68. Mizuno K, Miyabe I, Schalbetter SA, Carr AM, Murray JM. Recombination-restarted replication makes inverted chromosome fusions at inverted repeats. *Nature* 2013; 493:246-9.
69. Nguyen MO, Jalan M, Morrow CA, Osman F, Whitby MC. Recombination occurs within minutes of replication blockage by RTS1 producing restarted forks that are prone to collapse. *Elife* 2015; 4:e04539.
70. Hashimoto Y, Puddu F, Costanzo V. RAD51- and MRE11-dependent reassembly of uncoupled CMG helicase complex at collapsed replication forks. *Nat Struct Mol Biol* 2011; 19:17-24.
71. Lemaçon D, Jackson J, Quinet A, Brickner JR, Li S, Yazinski S et al. MRE11 and EXO1 nucleases degrade reversed forks and elicit MUS81-dependent fork rescue in BRCA2-deficient cells. *Nat Commun* 2017; 8:860.
72. Minocherhomji S, Ying S, Bjerregaard VA, Bursomanno S, Aleliunaite A, Wu W et al. Replication stress activates DNA repair synthesis in mitosis. *Nature* 2015; 528:286-90.
73. Dilley RL, Verma P, Cho NW, Winters HD, Wondisford AR, Greenberg RA. Break-induced telomere synthesis underlies alternative telomere maintenance. *Nature* 2016; 539:54-8.
74. Min J, Wright WE, Shay JW. Alternative Lengthening of Telomeres Mediated by Mitotic DNA Synthesis Engages Break-Induced Replication Processes. *Mol Cell Biol* 2017; 37
75. Roumelioti FM, Sotiriou SK, Katsini V, Chiourea M, Halazonetis TD, Gagos S. Alternative lengthening of human telomeres is a conservative DNA replication process with features of break-induced replication. *EMBO Rep* 2016; 17:1731-7.
76. Mizuno K, Lambert S, Baldacci G, Murray JM, Carr AM. Nearby inverted repeats fuse to generate acentric and dicentric palindromic chromosomes by a replication template exchange mechanism. *Genes Dev* 2009; 23:2876-86.
77. Costantino L, Sotiriou SK, Rantala JK, Magin S, Mladenov E, Helleday T et al. Break-induced replication repair of damaged forks induces genomic duplications in human cells. *Science* 2014; 343:88-91.
78. Petermann E, Orta ML, Issaeva N, Schultz N, Helleday T. Hydroxyurea-stalled replication forks become progressively inactivated and require two different RAD51-mediated pathways for restart and repair. *Mol Cell* 2010; 37:492-502.
79. Xu Y, Ning S, Wei Z, Xu R, Xu X, Xing M et al. 53BP1 and BRCA1 control pathway choice for stalled replication restart. *Elife* 2017; 6
80. Liu P, Carvalho CM, Hastings PJ, Lupski JR. Mechanisms for recurrent and complex human genomic rearrangements. *Curr Opin Genet Dev* 2012; 22:211-20.
81. Carvalho CM, Lupski JR. Mechanisms underlying structural variant formation in genomic disorders. *Nat Rev Genet* 2016; 17:224-38.
82. Hastings PJ, Ira G, Lupski JR. A microhomology-mediated break-induced replication model for the origin of human copy number variation. *PLoS Genet* 2009; 5:e1000327.

83. Carvalho CM, Pfundt R, King DA, Lindsay SJ, Zuccherato LW, Macville MV et al. Absence of heterozygosity due to template switching during replicative rearrangements. *Am J Hum Genet* 2015; 96:555-64.
84. Payen C, Koszul R, Dujon B, Fischer G. Segmental duplications arise from Pol32-dependent repair of broken forks through two alternative replication-based mechanisms. *PLoS Genet* 2008; 4:e1000175.
85. Lee JA, Carvalho CM, Lupski JR. A DNA replication mechanism for generating nonrecurrent rearrangements associated with genomic disorders. *Cell* 2007; 131:1235-47.
86. Bergoglio V, Boyer AS, Walsh E, Naim V, Legube G, Lee MY et al. DNA synthesis by Pol η promotes fragile site stability by preventing under-replicated DNA in mitosis. *J Cell Biol* 2013; 201:395-408.
87. Duda H, Arter M, Gloggnitzer J, Teloni F, Wild P, Blanco MG et al. A Mechanism for Controlled Breakage of Under-replicated Chromosomes during Mitosis. *Dev Cell* 2016; 39:740-55.
88. Gritenaite D, Princz LN, Szakal B, Bantele SC, Wendeler L, Schilbach S et al. A cell cycle-regulated Slx4-Dpb11 complex promotes the resolution of DNA repair intermediates linked to stalled replication. *Genes Dev* 2014; 28:1604-19.
89. Lambert S, Watson A, Sheedy DM, Martin B, Carr AM. Gross chromosomal rearrangements and elevated recombination at an inducible site-specific replication fork barrier. *Cell* 2005; 121:689-702.
90. Lambert S, Mizuno K, Blaisonneau J, Martineau S, Chanet R, Fréon K et al. Homologous recombination restarts blocked replication forks at the expense of genome rearrangements by template exchange. *Mol Cell* 2010; 39:346-59.
91. Miyabe I, Mizuno K, Keszthelyi A, Daigaku Y, Skouteri M, Mohebi S et al. Polymerase δ replicates both strands after homologous recombination-dependent fork restart. *Nat Struct Mol Biol* 2015; 22:932-8.
92. Tsang E, Miyabe I, Iraqui I, Zheng J, Lambert SA, Carr AM. The extent of error-prone replication restart by homologous recombination is controlled by Exo1 and checkpoint proteins. *J Cell Sci* 2014; 127:2983-94.
93. Teixeira-Silva A, Ait Saada A, Hardy J, Iraqui I, Nocente MC, Fréon K et al. The end-joining factor Ku acts in the end-resection of double strand break-free arrested replication forks. *Nat Commun* 2017; 8:1982.
94. Hu J, Sun L, Shen F, Chen Y, Hua Y, Liu Y et al. The intra-S phase checkpoint targets Dna2 to prevent stalled replication forks from reversing. *Cell* 2012; 149:1221-32.
95. Mijic S, Zellweger R, Chappidi N, Berti M, Jacobs K, Mutreja K et al. Replication fork reversal triggers fork degradation in BRCA2-defective cells. *Nat Commun* 2017; 8:859.
96. Iraqui I, Chekkal Y, Jmari N, Pietrobon V, Fréon K, Costes A et al. Recovery of arrested replication forks by homologous recombination is error-prone. *PLoS Genet* 2012; 8:e1002976.
97. González-Prieto R, Muñoz-Cabello AM, Cabello-Lobato MJ, Prado F. Rad51 replication fork recruitment is required for DNA damage tolerance. *EMBO J* 2013; 32:1307-21.
98. Dungrawala H, Bhat KP, Le Meur R, Chazin WJ, Ding X, Sharan SK et al. RADX Promotes Genome Stability and Modulates Chemosensitivity by Regulating RAD51 at Replication Forks. *Mol Cell* 2017; 67:374-386.e5.
99. Hashimoto Y, Ray Chaudhuri A, Lopes M, Costanzo V. Rad51 protects nascent DNA from Mre11-dependent degradation and promotes continuous DNA synthesis. *Nat Struct Mol Biol* 2010; 17:1305-11.

100. Hanada K, Budzowska M, Davies SL, van Drunen E, Onizawa H, Beverloo HB et al. The structure-specific endonuclease Mus81 contributes to replication restart by generating double-strand DNA breaks. *Nat Struct Mol Biol* 2007; 14:1096-104.
101. Froget B, Blaisonneau J, Lambert S, Baldacci G. Cleavage of stalled forks by fission yeast Mus81/Eme1 in absence of DNA replication checkpoint. *Mol Biol Cell* 2008; 19:445-56.
102. Schlacher K, Christ N, Siaud N, Egashira A, Wu H, Jasin M. Double-strand break repair-independent role for BRCA2 in blocking stalled replication fork degradation by MRE11. *Cell* 2011; 145:529-42.
103. Schlacher K, Wu H, Jasin M. A distinct replication fork protection pathway connects Fanconi anemia tumor suppressors to RAD51-BRCA1/2. *Cancer Cell* 2012; 22:106-16.
104. Davies SL, North PS, Hickson ID. Role for BLM in replication-fork restart and suppression of origin firing after replicative stress. *Nat Struct Mol Biol* 2007; 14:677-9.
105. Kolinjivadi AM, Sannino V, De Antoni A, Zadorozhny K, Kilkenny M, Técher H et al. Smarcal1-Mediated Fork Reversal Triggers Mre11-Dependent Degradation of Nascent DNA in the Absence of Brca2 and Stable Rad51 Nucleofilaments. *Mol Cell* 2017; 67:867-881.e7.
106. Ray Chaudhuri A, Hashimoto Y, Herrador R, Neelsen KJ, Fachinetti D, Bermejo R et al. Topoisomerase I poisoning results in PARP-mediated replication fork reversal. *Nat Struct Mol Biol* 2012; 19:417-23.
107. Neelsen KJ, Lopes M. Replication fork reversal in eukaryotes: from dead end to dynamic response. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2015; 16:207-20.
108. Quinet A, Lemaçon D, Vindigni A. Replication Fork Reversal: Players and Guardians. *Mol Cell* 2017; 68:830-3.
109. Higgins NP, Kato K, Strauss B. A model for replication repair in mammalian cells. *J Mol Biol* 1976; 101:417-25.
110. Sogo JM, Lopes M, Foiani M. Fork reversal and ssDNA accumulation at stalled replication forks owing to checkpoint defects. *Science* 2002; 297:599-602.
111. Maric C, Bénard M. Replication forks reverse at high frequency upon replication stress in *Physarum polycephalum*. *Chromosoma* 2014; 123:577-85.
112. Zellweger R, Dalcher D, Mutreja K, Berti M, Schmid JA, Herrador R et al. Rad51-mediated replication fork reversal is a global response to genotoxic treatments in human cells. *J Cell Biol* 2015; 208:563-79.
113. Taglialatela A, Alvarez S, Leuzzi G, Sannino V, Ranjha L, Huang JW et al. Restoration of Replication Fork Stability in BRCA1- and BRCA2-Deficient Cells by Inactivation of SNF2-Family Fork Remodelers. *Mol Cell* 2017; 68:414-430.e8.
114. Berti M, Ray Chaudhuri A, Thangavel S, Gomathinayagam S, Kenig S, Vujanovic M et al. Human RECQ1 promotes restart of replication forks reversed by DNA topoisomerase I inhibition. *Nat Struct Mol Biol* 2013; 20:347-54.
115. Thangavel S, Berti M, Levikova M, Pinto C, Gomathinayagam S, Vujanovic M et al. DNA2 drives processing and restart of reversed replication forks in human cells. *J Cell Biol* 2015; 208:545-62.

116. Zadorozhny K, Sannino V, Beláň O, Mlčoušková J, Špírek M, Costanzo V et al. Fanconi-Anemia-Associated Mutations Destabilize RAD51 Filaments and Impair Replication Fork Protection. *Cell Rep* 2017; 21:333-40.
117. Tarsounas M, Davies D, West SC. BRCA2-dependent and independent formation of RAD51 nuclear foci. *Oncogene* 2003; 22:1115-23.
118. Bailis JM, Luche DD, Hunter T, Forsburg SL. Minichromosome maintenance proteins interact with checkpoint and recombination proteins to promote s-phase genome stability. *Mol Cell Biol* 2008; 28:1724-38.
119. Lai X, Broderick R, Bergoglio V, Zimmer J, Badie S, Niedzwiedz W et al. MUS81 nuclease activity is essential for replication stress tolerance and chromosome segregation in BRCA2-deficient cells. *Nat Commun* 2017; 8:15983.
120. Rondinelli B, Gogola E, Yücel H, Duarte AA, van de Ven M, van der Sluijs R et al. EZH2 promotes degradation of stalled replication forks by recruiting MUS81 through histone H3 trimethylation. *Nat Cell Biol* 2017; 19:1371-8.
121. Ray Chaudhuri A, Callen E, Ding X, Gogola E, Duarte AA, Lee JE et al. Replication fork stability confers chemoresistance in BRCA-deficient cells. *Nature* 2016; 535:382-7.
122. Ding X, Ray Chaudhuri A, Callen E, Pang Y, Biswas K, Klarmann KD et al. Synthetic viability by BRCA2 and PARP1/ARTD1 deficiencies. *Nat Commun* 2016; 7:12425.
123. Fugger K, Mistrik M, Neelsen KJ, Yao Q, Zellweger R, Kousholt AN et al. FBH1 Catalyzes Regression of Stalled Replication Forks. *Cell Rep* 2015;
124. Higgs MR, Reynolds JJ, Winczura A, Blackford AN, Borel V, Miller ES et al. BOD1L Is Required to Suppress Deleterious Resection of Stressed Replication Forks. *Mol Cell* 2015; 59:462-77.

Figure 1: Pathways preventing transmission of DNA damage upon replication stress

Replication stress results in various types of corrupted replication forks. These include stalled forks that retain their replication competence and dysfunctional fork that have lost their replication competence. This later class can either be associated with a double strand break (broken fork) or be DSB-free. Sub-pathways of homologous recombination (HR) act to protect stalled forks from becoming dysfunctional, or restart and repair dysfunctional forks. In this way recombination factors ensure either successful merger with a converging fork (fork protection), or promote recombination-dependent replication (RDR) to allow replication to be completed when a converging fork is not available. HR therefore promotes the completion of DNA replication in a timely manner, avoiding mitotic catastrophe. When HR is genetically impaired (*i.e.* by mutations in HR genes) late replicated regions and/or regions with low origins densities can accumulate unprotected forks, unresolved replication intermediates and un-replicated DNA. These may persist through late G2 and into mitosis. Fork cleavage by structure-specific endonucleases (*i.e.* Mus81) offers the opportunity to resolve replication problems via break-induced replication (BIR) that results in mitotic DNA synthesis (MiDAS). The persistence of abnormal replication intermediates in mitosis jeopardizes faithful chromosome segregation, resulting in various types of mitotic abnormalities (*i.e.* chromatin bridges, ultra-fine bridges, lagging chromosomes and micronuclei). Mitotic abnormalities can trigger chromosomal breakage and rearrangement which are transmitted to the next generation.

Figure 2: Models of DSB-initiated recombination-dependent replication

A. Replication forks encountering a DNA nick are converted into broken forks, which may be accompanied by the loss of replisome components (1). The DNA end-resection machinery (*i.e.* Mre11 and Exo1) generates a single-stranded 3'overhang that is coated by the RAD51 recombinase (2) which promotes strand invasion into the sister chromatid to form a D-loop structure from which DNA synthesis can be primed (3). In budding yeast, break-induced replication (BIR) proceeds by conservative DNA synthesis using a migrating D-loop that is mediated by the Pif1 helicase. The non-essential Pol32 sub-unit of the DNA polymerase delta is required for BIR, which is highly error-prone and limited by an incoming converging fork (4). Alternatively, Mus81 endonuclease can cleave the D-loop structure allowing the restoration of semi-conservative DNA synthesis (4'). It is not known if the replisome associated with such a re-set fork is canonical or not.

B. BIR can be initiated by the breakage of a single chromatid in G2 (1,2). The migrating D-loop and its associated conservative DNA synthesis can proceed until the end of the chromosome (3). In the example shown, the sister chromatid provides the donor template, but BIR can employ ectopic homologous sequence during repair of a DSB. BIR in G2 generates long stretches of ssDNA (4) which is highly sensitive to mutations and formation of secondary recombination intermediates.

C. Unresolved replication forks in mammalian cells are cleaved by MUS81 in late G2 and mitosis (1). The strand annealing activity of RAD52 (2) promotes the formation of joint-molecules (3) the nature of which nature remains elusive. Mitotic DNA synthesis (MiDAS) requires POLD3, a component of the DNA polymerase delta homologous to yeast Pol32. Here, the sister chromatid is shown as the donor template, but MiDAS can also result in ectopic micro-homology mediated BIR (MMBIR).

Figure 3: Model of DSB-free recombination-dependent replication

A. Restart of replication forks that have lost replication competence (1) requires recombination proteins. Several helicases and translocases can mediate fork reversal (2) allowing DNA-end resection to generate ssDNA on which Rad51 is loaded (3). The Rad51 filament then promotes strand invasion into the reformed parental DNA duplex to generate a D-loop intermediate (4) from which DNA synthesis is primed, restoring a functional but non-canonical fork (5). Alternatively, fork-restart may be initiated by resection of the lagging strand (2') and the backtracking of the fork, generating an extruded leading strand onto which Rad51 is loaded (3'). In fission yeast, Rad51-mediated restarted forks are associated with a semi-conservative DNA synthesis during which both strands are synthesized by the DNA polymerase delta.

B. Protection of stalled replication forks. Upon fork stalling (1), transient uncoupling allows RAD51 to bind to the ssDNA at the fork junction. This can occur independently of the BRCA2 loader (2). RAD51 promotes fork-reversal (3), possibly in a coordinated manner with additional helicases and translocases (*i.e.* SMARCAL1, ZRANB3, HTLF). BRCA2-dependent loading of RAD51 onto the fourth arm of the reversed fork protects the double-stranded DNA end from nucleolytic attack (4) by multiple exo- and endonucleases and helicases (*i.e.* DNA2, MRE11, CtIP, EXO1, WRN). Likely, RAD51-mediated fork reversal and protection maintain the integrity of the fork and allow appropriate merger with a converging forks (5). Whether limited end-resection is required for RAD51-mediated fork reversal and protection is unknown. The fate of the replisome at reversed fork is also unknown.

C. Repair of post-replicative gaps. When replicative DNA polymerases encounter a DNA lesion (1), transient and controlled uncoupling can occur, resulting in the formation of a ssDNA gap at the fork junction (2) which is subsequently coated by Rad51. DNA synthesis is resumed via repriming downstream the DNA lesion, leaving an internal ssDNA gap behind the moving fork (3). The ssDNA gap is enlarged by the DNA-end resection machinery facilitating further Rad51 loading by recombination mediators (4). The repair of the ssDNA gap is finalized in G2 phase (5).

Figure 4: Model of Rad51-mediated fork-protection and restart to avoid mitotic sister chromatid bridges in fission yeast

A. A dysfunctional fork (1) undergoes fork-reversal providing a single double stranded DNA end for the non-homologous end joining heterodimer Ku to bind (2). Initial fork-resection mediated by Mre11/Rad50/Nbs1 (MRN) complex and Ctp1 (the fission orthologue of budding yeast Sae2 and mammalian CtIP), which remove Ku from the DSB end to generate short ssDNA gap onto which Rad51 can be loaded (3). The initial resection primes Exo1-mediated long-range resection to generate a larger ssDNA gap (4) onto which additional Rad51 is loaded. Rad51 promotes strand invasion into the parent duplex DNA, priming DNA synthesis and fork restoration (5). At the same time the Rad51 filament protects the reversed arm from extensive Exo1-dependent resection thus maintaining the fork structure in a form competent for merge with a converging fork (5'). Rad51-mediated fork protection and restart are genetically separable functions and the ultimate outcome depends strongly on the timing of the arrival of the converging fork.

B. In the absence of Rad51 or Rad52, a dysfunctional fork (1) is not protected and undergoes uncontrolled resection by the DNA end-resection machinery (2). Large ssDNA gaps, up to 3 kb in size, form behind the fork (3) that are responsible for failure of termination of DNA replication (4). Such pathological termination events trigger mitotic sister chromatid bridges, a type of ultra-fine bridge that breaks during mitosis.

Figure 5: Abnormal replication intermediates in the absence of recombination factors

A. Without RAD51. Replication fork stalling (1) results in uncoupling and ssDNA gap formation at the fork junction (2). Resection of the ssDNA gap generates large stretched of ssDNA which cannot be repaired without RAD51 (3). Backtracking of the resected-fork (4) potentially provides a substrate to MUS81 (5). Fork-repair can subsequently be initiated in mitosis by RAD52 (6).

B. Without BRCA2. Replication fork stalling (1) results in uncoupling and ssDNA gap formation. RAD51 binds independently of BRCA2 (2) and fork reversal is mediated by RAD51 cooperatively with helicases and translocases (*i.e.* SMARCAL1, ZRANB3, HTLF) (3). The reversed fork provides an entry point for the uncontrolled activity of the DNA end-resection machinery, resulting in a large ssDNA gap (4). As in (A), backtracking and fork cleavage can facilitate fork-repair in mitosis (5 and 6).

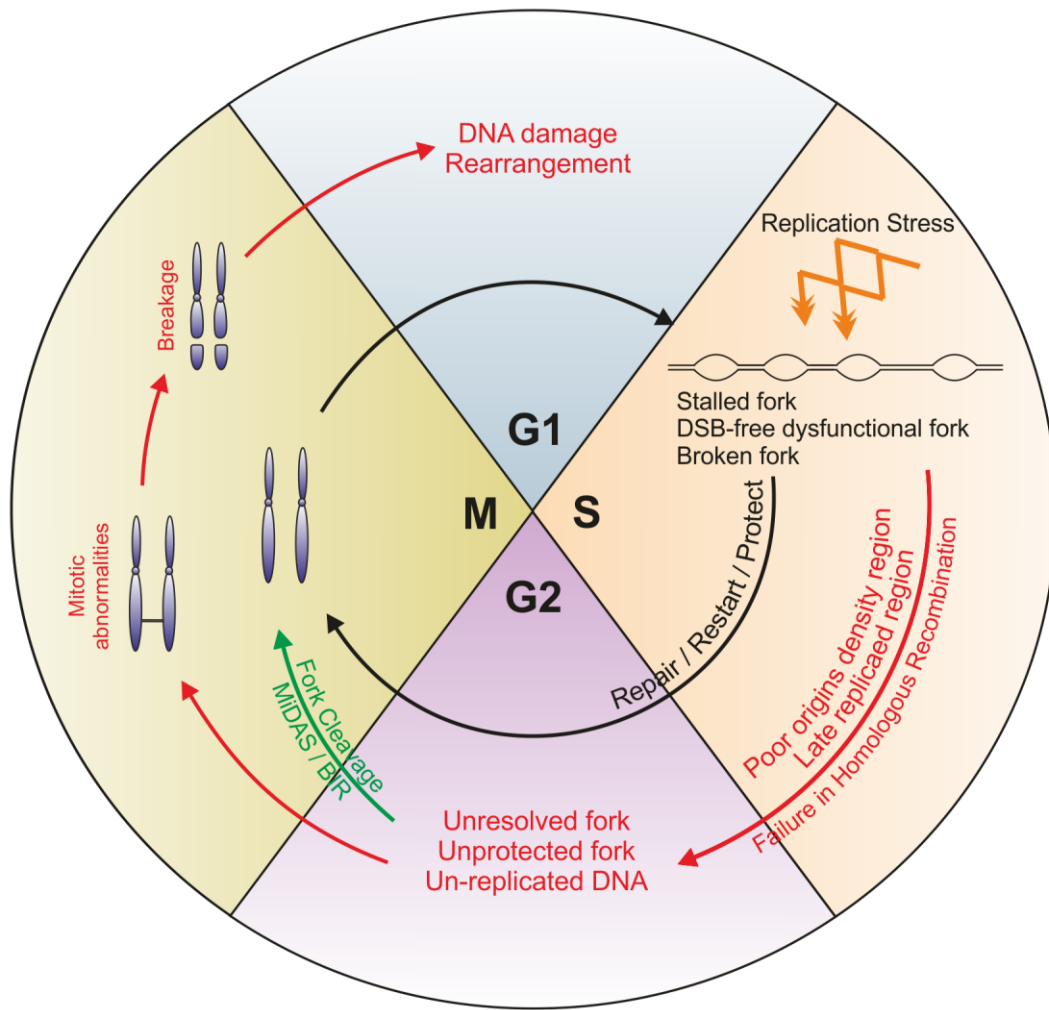
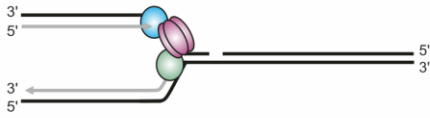


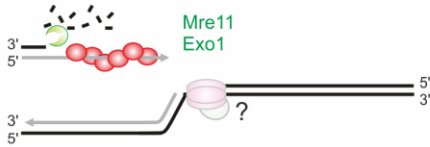
Figure 1

A. Fork-repair by BIR in S-phase

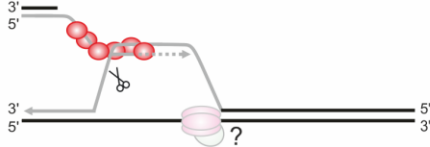
1. Broken fork



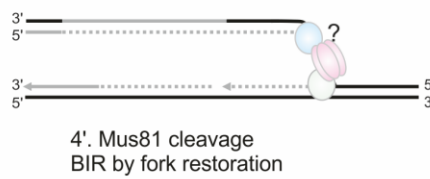
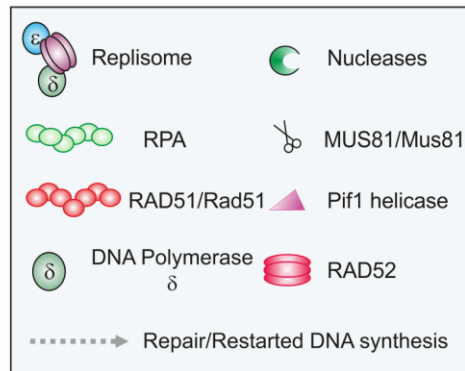
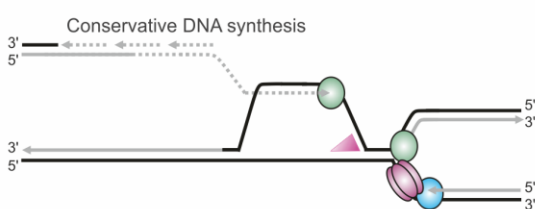
2. End-resection Rad51 loading



3. D-Loop formation

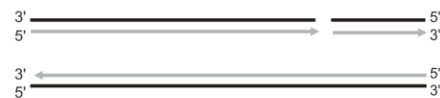


4. BIR by migrating D-loop

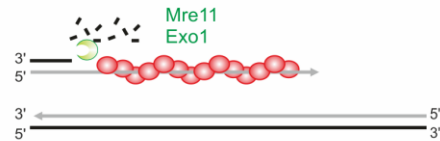


B. DSB repair by BIR in G2-phase

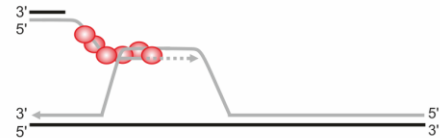
1. DSB



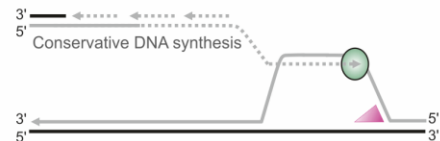
2. End-resection Rad51 loading



3. D-Loop formation



4. BIR by migrating D-loop

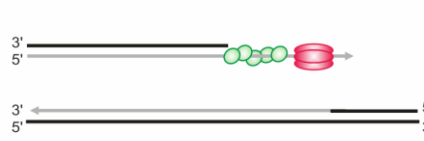


C. Fork-repair in G2/M (MiDAS)

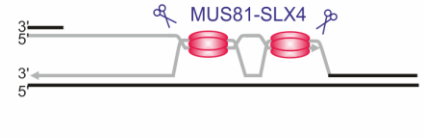
1. Fork cleavage



2. RAD52 recruitment



3. D-loop formation by RAD52-dependent strand annealing



4. BIR by migrating D-loop

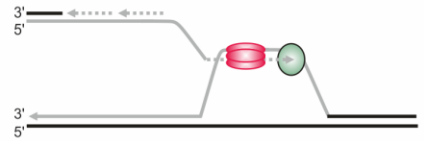
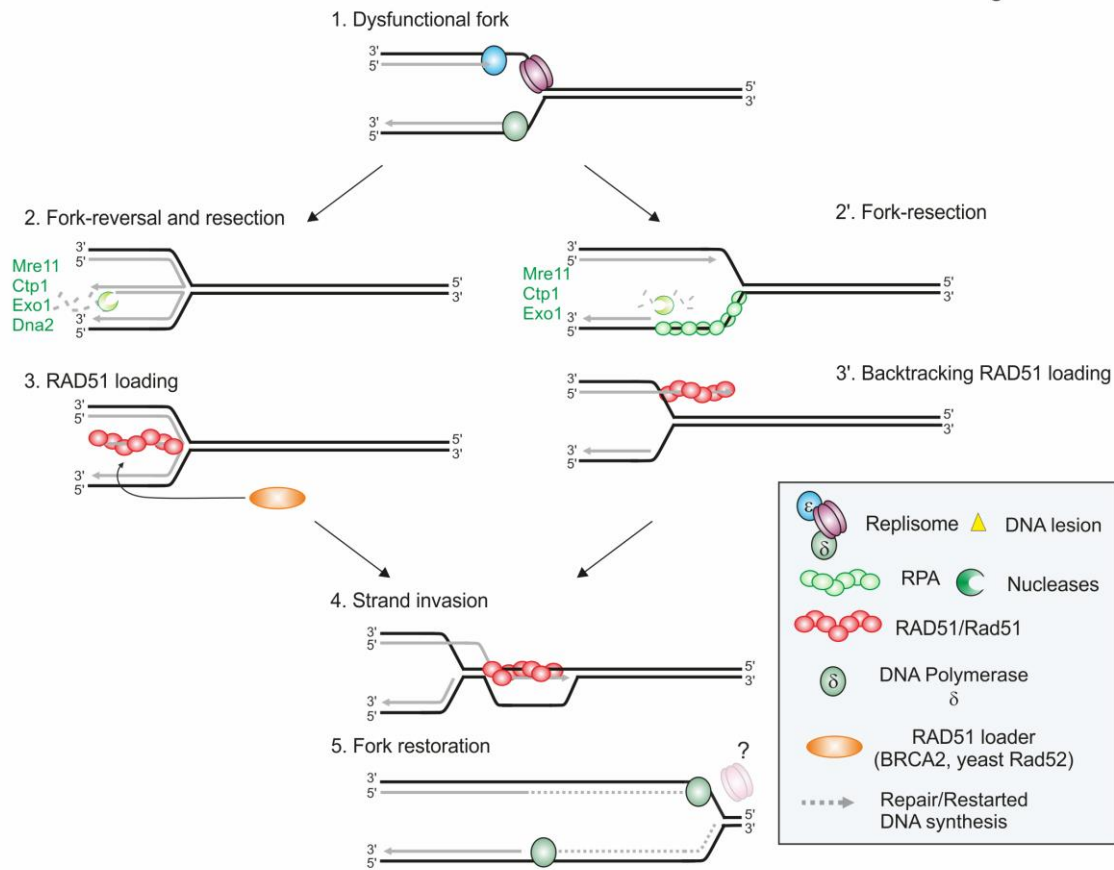


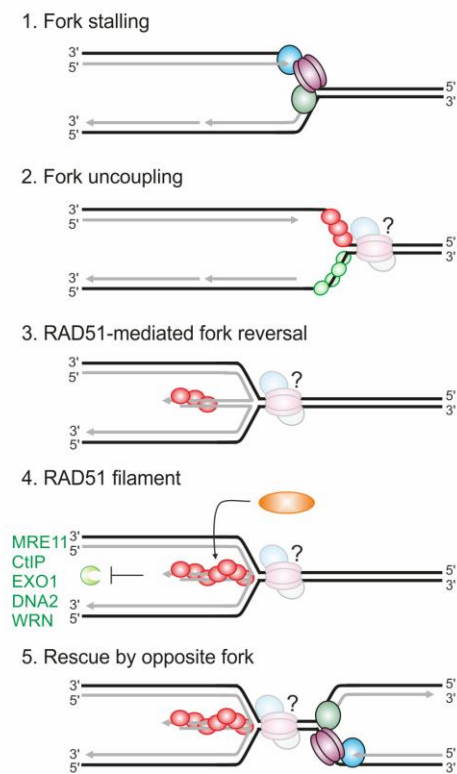
Figure 2

A. Fork-restart

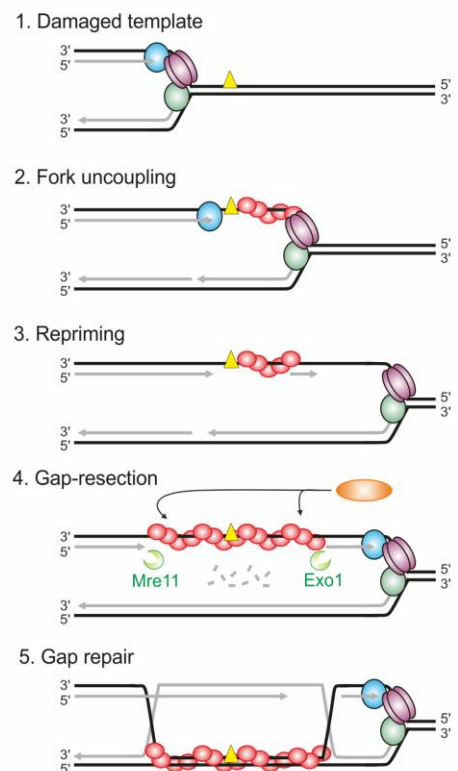
Figure 3



B. Fork-protection



C. Repair of post-replicative gap



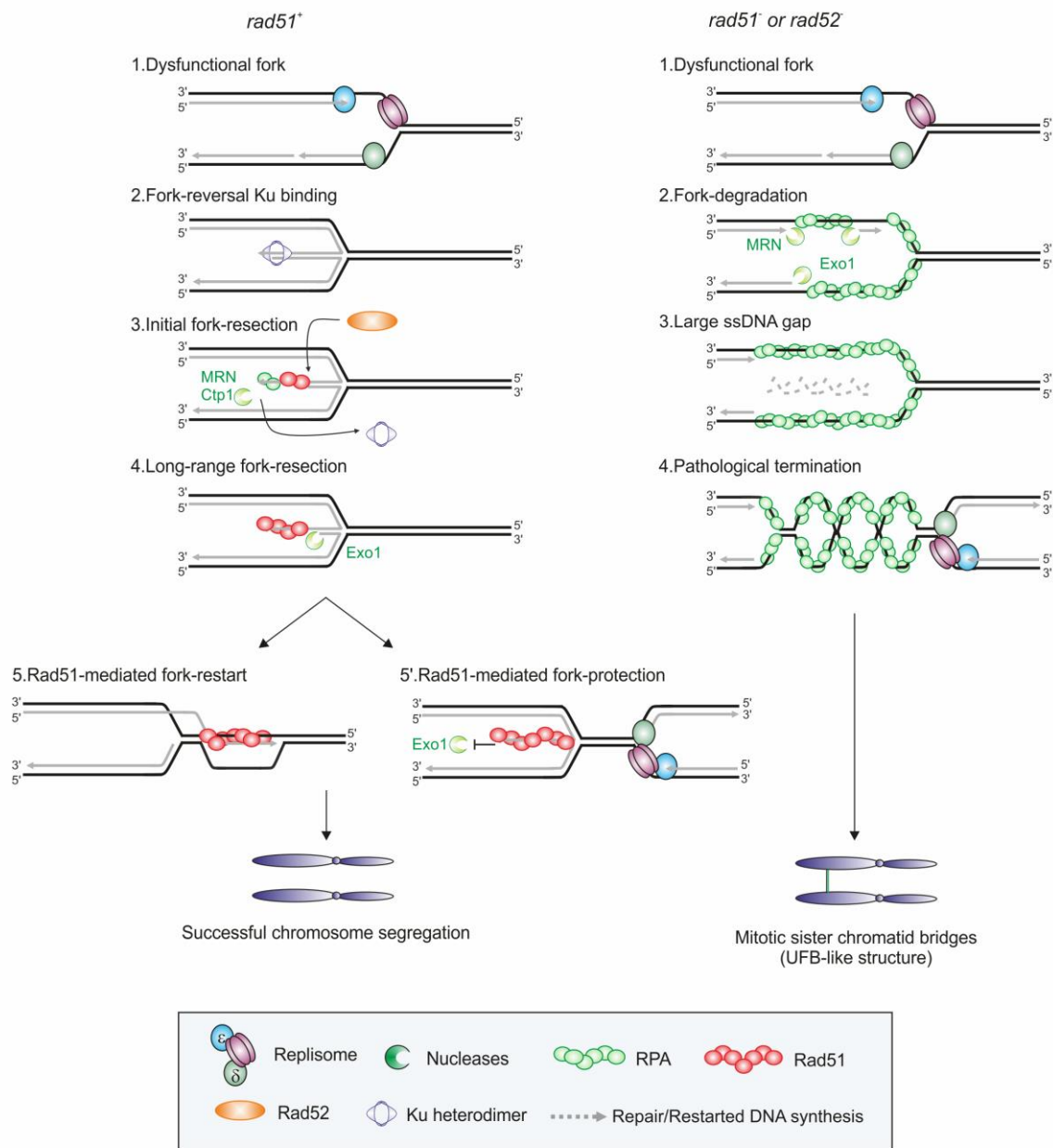


Figure 4

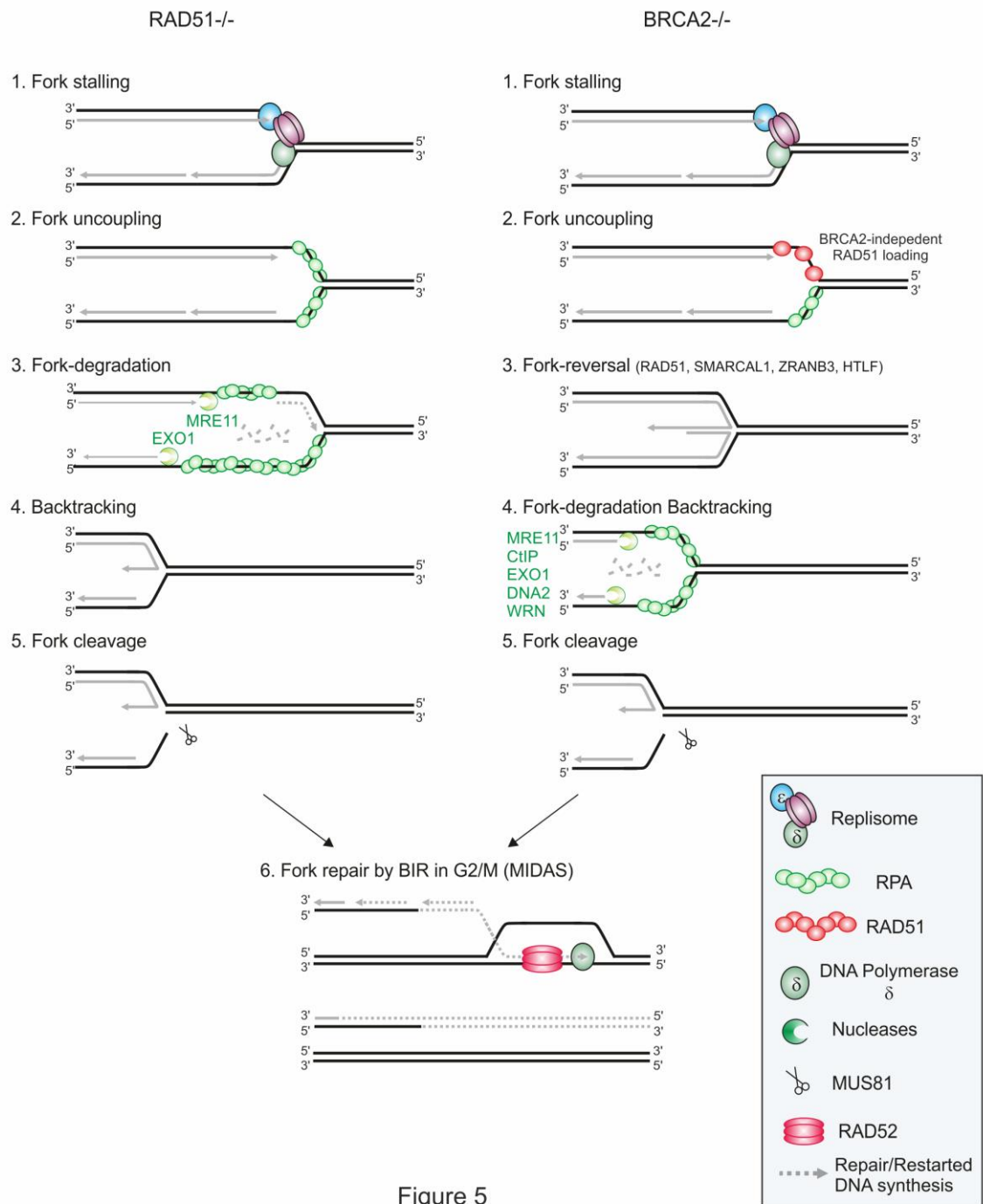


Figure 5

Titre : Mécanismes par lesquels la recombinaison homologue prévient les défauts mitotiques induits par le stress réplicatif

Mots clés : Réplication, stress réplicatif, recombinaison homologue, protection, Rad51

Résumé :

Des stress réplicatifs sont rencontrés à chaque phase S du cycle cellulaire et différents mécanismes permettent leur prise en charge. La recombinaison homologue (RH) tient un rôle important dans le maintien de la stabilité du génome au cours de la réplication. En effet, la RH escorte la progression des fourches et prévient les défauts mitotiques. Toutefois, le lien moléculaire entre le stress réplicatif et les défauts mitotiques n'est pas élucidé. De façon générale, les fourches de réplication bloquées peuvent être sauvées grâce à leur fusion avec la fourche convergente ou à leur redémarrage par la RH. Le laboratoire a développé un essai génétique reposant sur l'utilisation d'une barrière de réplication conditionnelle afin d'étudier le mécanisme par lequel la RH contribue au sauvetage des fourches de réplication bloquées. L'équipe a montré que le redémarrage des fourches bloquées par la RH est conditionné par l'exposition d'un ADNsb et non d'une cassure double-brin. Ainsi, les fonctions de la RH au cours de la gestion du stress réplicatif peuvent être adressées indépendamment de sa fonction de réparation des cassures (fonction relativement bien documentée). Les travaux décrits dans ce manuscrit s'inscrivent autour des mécanismes que la RH engage afin d'assurer la stabilité génétique en réponse au stress réplicatif. Plus précisément, je me suis intéressée à l'implication des facteurs de la RH dans la protection des fourches de réplication bloquées au niveau moléculaire et cellulaire.

En absence de la recombinaison homologue Rad51 ou de son chargeur Rad52, le blocage d'une seule fourche de réplication est suffisant pour induire des défauts mitotiques, incluant des ponts anaphasiques (lien physique entre chromatides soeurs). Il s'avère que les fourches bloquées sont extensivement dégradées par la nucléase Exo1 en absence de Rad51/Rad52. De manière intéressante, l'accumulation excessive d'ADNsb à la fourche est à l'origine de la non-dissociation des chromatides soeurs en mitose et ce malgré l'arrivée de la fourche convergente. Ainsi, les fourches non protégées sont le siège de terminaison pathologique mettant à mal la ségrégation des chromosomes. La RH étant impliquée dans la protection et le redémarrage des fourches de réplication, l'utilisation du mutant de séparation de fonction, Rad51-3A, a permis de montrer que ces deux fonctions sont génétiquement séparables. Ce mutant, capable de protéger et incapable de redémarrer les fourches de réplication, ne présente pas de symptômes de terminaison pathologique. Ainsi, au-delà de sa capacité à redémarrer les fourches inactivées, les facteurs de la RH assurent la terminaison de la réplication en maintenant les fourches de réplication dans une conformation propice à une fusion avec la fourche convergente. Ces résultats contribuent à une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires mis en place par la RH afin de maintenir la stabilité génétique au cours du stress réplicatif.



Title : Mechanism by which homologous recombination prevents replication stress-induced mitotic defects

Keywords : Replication, replication stress, homologous recombination, fork protection, Rad51

Abstract :

During each cell cycle, replication stress (RS) can compromise the progression of the replicating forks and threaten the fidelity of chromosome duplication and segregation. Replication stresses emerged as a major source of genetic instability and cancer development. Several mechanisms, including homologous recombination (HR), operate to buffer the deleterious effects of RS. HR acts as an escort to fork progression and prevents mitotic defects. Nonetheless, the molecular mechanisms underlying the destructive role of RS in triggering mitotic defects remain elusive. An experimental system involving a conditional unipolar replication fork barrier (RFB) was developed in the lab in fission yeast. In this system, HR features handling RS can be assessed independently of its well-known function in double strand break repair. The work described here aims to understand the mechanism by which HR prevents mitotic defects in response to RS. In general, blocked replication forks can be rescued either by fork convergence or by HR-mediated fork restart. However, in the absence of Rad51 recombinase or its loader Rad52, a single activated RFB is sufficient to induce mitotic abnormalities including anaphase bridges despite the arrival of the converging fork.

The involvement of HR factors in fork protection was assessed at the molecular and cellular levels. We found that terminally-arrested forks are extensively resected by the Exo1 nuclease in the absence of Rad51/Rad52. Interestingly, the excess of ssDNA accumulation at the fork triggers sister chromatid non-disjunction in mitosis despite the arrival of an uncorrupted converging fork to rescue replication. Thus, unprotected replication forks are prone to pathological termination threatening chromosome segregation. HR is involved in fork protection and restart. Moreover, using the Rad51 mutant, Rad51-3A, we showed that HR plays two distinctive roles in fork protection and restart. This separation function mutant is proficient for fork protection but deficient for fork restart by HR and does not show any pathological termination. Thus, beyond their ability to restart inactivated forks, HR factors ensure replication termination by maintaining the forks in a suitable conformation for a fusion with the converging fork. Overall, these results shed light on how HR preserves genome stability in response to RS.

