



HAL
open science

Régulation des étapes précoces de la recombinaison homologue humaine par BRCA2 et RAD52

Ali-Akbar Muhammad

► **To cite this version:**

Ali-Akbar Muhammad. Régulation des étapes précoces de la recombinaison homologue humaine par BRCA2 et RAD52. Biochimie, Biologie Moléculaire. Université Paris-Saclay, 2021. Français. NNT : 2021UPASL031 . tel-03656075

HAL Id: tel-03656075

<https://theses.hal.science/tel-03656075v1>

Submitted on 1 May 2022

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.

Régulation des étapes précoces de la Recombinaison Homologue Humaine par BRCA2 et RAD52

*Regulation of the early stages of Human Homologous
Recombination by BRCA2 and RAD52*

Thèse de doctorat de l'université Paris-Saclay

École doctorale n°582 : oncologie : biologie - médecine - santé (CBMS)
Spécialité de doctorat : Aspects moléculaires et cellulaire de la biologie
Unité de recherche : Université Paris-Saclay, Institut Gustave Roussy, CNRS,
Intégrité du génome et cancers, 94805, Villejuif, France
Réfèrent : Faculté de médecine

Thèse présentée et soutenue à Paris-Saclay,
Le 03/05/2021, par

Ali-Akbar MUHAMMAD

Composition du Jury

| | |
|---|--------------|
| Sophie ZINN Directrice de Recherche - CEA Paris Saclay | Présidente |
| FLEURY Fabrice Directeur de Recherche - CNRS, Université de Nantes | Rapporteur |
| WHITE Charles Directeur de Recherche - CNRS, Université de Clermont Auvergne | Rapporteur |
| GANGLOFF Serge Directeur de Recherche - Institut Pasteur | Examineur |
| GUIROUILH.B. Josée Chargée de Recherche - Institut Cochin | Examinatrice |

Direction de la thèse

| | |
|--|-----------------------|
| DUPAIGNE Pauline Chargée de Recherche (HDR) - Gustave Roussy | Directrice de thèse |
| LE CAM Éric Directeur de Recherche - Gustave Roussy | Co-Directeur de thèse |

REMERCIEMENTS

*Je souhaite remercier, tout d'abord, mes encadrants de thèse **Pauline DUPAIGNE** et **Eric LE CAM** qui m'ont accueilli dans leur laboratoire et encadré durant cette aventure. Merci pour votre confiance et votre soutien. Vous avez su vous adapter à la personne que j'étais en me laissant une grande liberté tout en gardant un œil sur le déroulement de ma thèse. Merci, cette expérience a été très enrichissante à vos côtés.*

*Je tiens à remercier sincèrement l'ensemble des membres de mon jury de thèse d'avoir accepté de participer à l'aboutissement de cette aventure et de consacrer du temps à l'examen de mon travail. Merci à Monsieur **Fabrice FLEURY** ainsi qu'à Monsieur **Charles WHITE** pour avoir accepté d'être rapporteurs de ma thèse. Merci à Madame **Josée GUIROUILH.B** et Monsieur **Serge GANGLOFF** pour avoir examiné ma thèse. Merci à Madame **Sophie ZINN**, présidente du jury.*

*Je tiens à remercier mes collègues du quotidien **Sonia, Gerrard, Hugo, Ibtissam** pour leur aide et notamment **Yann** pour son partage d'expérience concernant la réalité du monde du travail.*

*Une pensée également pour les anciens membres de l'équipe comme **Catherine, Alexandra, Olivier, Karima** (ainsi que ceux que j'oublie), un grand merci à vous. Merci également à **Eliana** pour son aide et son accueil au début de la thèse.*

*Merci aux collaborateurs qui m'ont permis de développer mon travail et ma curiosité par le biais de nos interactions. Merci à **Bernard LOPEZ, Josée GUIROUILH.B** et **Ayeong SO** pour les échanges sur les différents sujets très intéressants. Merci à **Jean-Yves MASSON** et **Thibaut PETERLINI** pour les échanges sur BRCA2 ainsi que leur purification de protéines de qualité. Merci également à **Xavier VEAUTE** de nous avoir fourni des protéines de qualité pour nos travaux.*

Merci à tous ceux que je ne cite pas mais que je n'oublie pas pour m'avoir aidé par leur présence, par leurs conseils à l'aboutissement de cette thèse.

*Merci à mes amis **Rida, Farid** et **Kamil** pour avoir été à mes côtés durant toutes ces années d'études et m'avoir soutenu.*

*Enfin, un grand merci à ma famille, ma mère, mon père, mes sœurs **Sonia, Sobia, Shahana**, et ma copine **Aisha**, pour leur soutien quotidien et pour m'avoir supporté dans les moments difficiles.*

Table des matières

| | |
|--|-----------|
| REMERCIEMENTS | 2 |
| INTRODUCTION GENERALE..... | 6 |
| I. LA REPARATION DE L'ADN..... | 7 |
| A. Généralités sur la recombinaison homologue, voie de réparation de l'ADN..... | 7 |
| B. La réparation des cassures doubles brins (CDB) | 8 |
| 1) Les mécanismes de réparations des CDB | 8 |
| a) La voie NHEJ (Non-Homologous End Joining) | 8 |
| b) La voie Alt-EJ (Alternative End Joining)..... | 10 |
| c) La Recombinaison Homologue (RH) | 11 |
| i. La voie SDSA (Synthesis Dependant Strand Annealing) | 13 |
| ii. La voie DSBRe (Double Strand Break Repair) | 14 |
| iii. La voie SSA (Single-Strand Annealing)..... | 15 |
| iv. La voie BIR (Break Induced Replication)..... | 16 |
| 2) Le choix de la voie de réparation..... | 17 |
| C. La réparation des fourches de réplication endommagées..... | 20 |
| D. RH, réparation des CDB et Cancer | 23 |
| II. LE MECANISME MOLÉCULAIRE DE RECOMBINAISON HOMOLOGUE ET SA REGULATION | 25 |
| A. Mécanisme général et ses différentes voies..... | 25 |
| 1) Etapes présynaptiques : reconnaissance du dommage et résection puis assemblage du nucléofilament présynaptique..... | 25 |
| a) Formation de l'ADNsb..... | 25 |
| b) Assemblage du nucléofilament présynaptique | 26 |
| c) Régulation du nucléofilament | 26 |
| 2) Etapes synaptiques : recherche d'homologie, invasion de brin et formation de la D-loop..... | 27 |
| a) Recherche et reconnaissance de l'homologie, formation du complexe synaptique | 27 |
| b) Formation de la D-loop | 28 |
| c) Initiation de la synthèse..... | 29 |
| 3) Etapes post-synaptiques : dissolution ou stabilisation de la D-loop puis résolution..... | 30 |
| a) Dissolution de la D-loop..... | 30 |
| b) Capture du deuxième brin | 30 |
| c) Formation de la double jonction de Holliday, migration de branches et résolution | 31 |
| B. Formation du nucléofilament actif humain : RAD51 et ses partenaires..... | 32 |
| 1) RAD51 facteur clé de la recombinaison homologue | 32 |
| 2) RPA | 35 |
| 3) Les protéines médiatrices de la RH | 36 |
| a) Généralités : les différentes catégories de protéine RMP | 36 |
| b) BRCA2 | 38 |
| c) RAD52 | 40 |
| I. Rôle de RAD52 dans la voie SSA..... | 40 |
| II. Rôle de RAD52 dans la RH..... | 41 |
| III. Rôle de RAD52 dans le BIR..... | 41 |
| IV. RAD52 et R-loop..... | 42 |
| 4) Les paralogues de RAD51 | 43 |
| 4) Les antirecombinases | 44 |
| a) PARI | 45 |
| b) BLM, RTEL, RECQL5, FANCI, FBH1..... | 45 |
| c) Fonction antirecombinase de RAD54 | 47 |
| C) Recherche d'homologie, invasion de brin, résolution de la synapse et rôle de RAD54..... | 47 |
| III. PROBLÉMATIQUES ET OBJECTIFS DE LA THÈSE | 50 |

| | |
|---|------------|
| IV. METHODOLOGIE - ETUDE MOLECULAIRE DE LA RH..... | 51 |
| A. Généralité sur les interactions ADN-Protéine..... | 51 |
| B. Méthodologie pour l'étude des interactions ADN-protéines en MET | 53 |
| 1) La Microscopie Electronique (ME)..... | 53 |
| a) Principe de la microscopie électronique..... | 53 |
| b) La microscopie électronique à transmission..... | 54 |
| 2) Les techniques de préparations des échantillons..... | 57 |
| a) Grilles de MET et étalement de l'ADN | 57 |
| b) Coloration positive et une observation en champ sombre | 58 |
| c) Coloration négative et une observation en champ clair..... | 59 |
| C. Caractérisation des intermédiaires de recombinaison en biochimie, apport de l'imagerie moléculaire | 60 |
| 1) Substrat d'ADN | 61 |
| a) Amplification des fragments d'ADN par PCR (Polymerase Chain Reaction) | 62 |
| b) Purification des produits PCR par chromatographie FPLC (Fast Performance Liquid Chromatography) | 63 |
| c) Purification par HiTrap® Streptavidine | 63 |
| d) Hybridation des fragments d'ADN..... | 63 |
| 2) Test biochimique pour mimer les étapes de la RH <i>in vitro</i> | 64 |
| a) Expérience de gel retard..... | 64 |
| b) Test de D-loop..... | 64 |
| V. CARACTERISATION DES FILAMENTS ACTIFS : JEU ENTRE BRCA2 ET RAD52..... | 65 |
| A. Introduction | 65 |
| B. Matériels & Méthodes | 66 |
| C. Résultats | 69 |
| 1) Caractérisation en MET et par gel des constructions mimant les intermédiaires de RH | 69 |
| 2) Polymérisation de RPA et RAD51 sur les intermédiaires..... | 70 |
| 3) Effet de BRCA2 et RAD52 sur la nucléation de RAD51 et l'installation du filament RAD51 | 72 |
| 4) Architecture des filaments actifs..... | 77 |
| D. Discussion | 80 |
| VI. ÉTUDE DE LA RECHERCHE D'HOMOLOGIE : COMPLEXES SYNAPTIQUES ET D-LOOP | 81 |
| A. Introduction | 81 |
| B. Matériels & Méthodes | 81 |
| C. Résultats | 82 |
| 1) Rôles des médiateurs dans la recherche d'homologie..... | 82 |
| 2) Microhomologie | 87 |
| D. Discussion | 89 |
| VII. CARACTÉRISATION D'UNE FORME CHIMÉRIQUE DE Rad51 : SMRad51 | 91 |
| A. Introduction | 91 |
| B. Matériels & Méthodes | 91 |
| C. Résultats | 92 |
| D. Discussion | 95 |
| VIII. CHOIX DE LA VOIE DE REPARATION : RAD52 VS RAD51 | 97 |
| A. Introduction | 97 |
| B. Matériels & Méthodes | 97 |
| C. Résultats | 98 |
| D. Discussion | 101 |
| IX. RÉSULTATS SUPPLÉMENTAIRES : STABILISATION DE LA D-LOOP PAR CAPTURE DU SECOND BRIN ET INITIALISATION DE LA SYNTHÈSE | 103 |
| A. Introduction | 103 |

| | |
|--|------------|
| B. Matériels & Méthodes | 103 |
| C. Résultats préliminaires et perspectives | 104 |
| D. Discussion | 106 |
| DISCUSSION GENERALE | 107 |
| LISTE DES ABREVIATIONS | 109 |
| LISTE DES FIGURES..... | 110 |
| ABSTRACT IN ENGLISH..... | 111 |
| RESUME EN FRANÇAIS..... | 112 |
| BIBLIOGRAPHIE | 114 |
| Annexe I : Article de Méthode | 138 |
| Annexe II : Article I | 154 |
| Annexe III : Article II | 185 |

INTRODUCTION GENERALE

La double hélice d'ADN, support de l'information génétique, est constamment soumise à des modifications structurales et des changements d'états au cours du cycle cellulaire. En effet, dans les grandes voies du métabolisme de l'ADN impliquant la réplication, la transcription, la réparation des lésions et la recombinaison, la double hélice passe par de multiples états transitoires dont la mécanistique est contrôlée par des acteurs protéiques spécifiques souvent conservés dans l'évolution. La prise en charge ainsi que la régulation de ces structures intermédiaires sont cruciales afin d'empêcher les réarrangements et modifications, de permettre au cycle cellulaire de se poursuivre, garantissant ainsi l'intégrité et la bonne transmission des génomes. La Recombinaison Homologue (RH) est une voie de réparation des cassures simple et double brin de l'ADN dont le mécanisme est basé sur l'appariement de l'ADN lésé avec une séquence homologue qui sert de matrice pour la réparation. Le mécanisme moléculaire passe donc par la formation de structures intermédiaires complexes qui sont remodelées et hautement contrôlées par un certain nombre d'acteurs. La recombinase RAD51 est l'acteur central de ce processus assurant la recherche d'homologie et la formation de la synapse, elle est escortée par divers partenaires qui, en fonction du contexte, régulent ses activités.

L'objectif de ma thèse a été d'étudier les rôles de RAD51 avec ses partenaires RAD52, BRCA2 et RPA dans la mise en place et la résolution de ces structures intermédiaires. Pour cela j'ai utilisé la microscopie électronique à transmission (MET) des complexes ADN-protéines couplée à des techniques de biochimies afin de caractériser précisément les rôles de ces acteurs dans les étapes précoces du mécanisme de RH.

Les chapitres I et II font un 'état de l'art' sur les différentes voies de réparation des cassures double brin (CDB) (chapitre I) et le mécanisme de recombinaison homologue (RH) (chapitre II). Dans le chapitre III j'expose les questions, la problématiques et les objectifs de ma thèse. Le chapitre IV est consacré à la méthodologie et les outils que j'ai utilisé pour mener cette étude. Les chapitre V à IX exposent les résultats que j'ai obtenus : Tout d'abord sur les rôles de RAD52 et BRCA2 dans la mise en place et l'architecture du nucléofilament RAD51 (chapitre V); puis leur activité dans le processus de recherche d'homologie (chapitre VI) en caractérisant précisément en MET les structures formées (complexe synaptique et D-loop). Les chapitres VII et VIII présentent des résultats obtenus dans le cadre d'une collaboration avec l'équipe de Bernard Lopez (Institut Cochin, Paris) : d'une part l'étude d'une forme dominante négative de RAD51 (SMRAD51), les conséquences sur les voies de réparation des CDB et sur la formation du filament présynaptique (chapitre VII); puis les rôles du recrutement de RAD51 et RAD52 dans le choix la balance entre les voies SSA/RH (chapitre VIII). Et pour finir je présente des résultats préliminaires ainsi que les perspectives de nouvelles expériences sur la stabilisation de la D-loop par capture du second brin ainsi que sur la mise en place de la synthèse de brin au sein de la D-loop (chapitre IX).

I. LA REPARATION DE L'ADN

A. Généralités sur la recombinaison homologue, voie de réparation de l'ADN

Tout au long de la vie des cellules, l'ADN est soumis à des agressions d'origines exogènes et endogènes entraînant l'accumulation de lésions. Par exemple, le métabolisme cellulaire produit des espèces réactives de l'oxygène qui sont sources de nombreux dommages. L'environnement soumet également l'ADN des cellules à différentes agressions, telles que les rayonnements ultraviolet (UV), les radiations ionisantes ou des agents chimiques génotoxiques. Les lésions ainsi générées dans la double hélice d'ADN sont de natures très diverses : bases altérées ou perdues, liens intra- ou inter-brins, dimères de thymines, cassures simple ou double brin. Le métabolisme de l'ADN lui-même est source de dommages : en effet, au cours de la réplication, les polymérases qui réalisent la copie à l'identique de l'ADN peuvent elles-mêmes commettre des erreurs qui rompent la complémentarité entre les deux brins. Ainsi, de nombreux dommages peuvent aussi s'accumuler au cours du processus de réplication. Si ces lésions sont mal ou pas réparées, les conséquences peuvent être graves pour la cellule et ses descendantes, en fonction de la nature de l'altération d'origine. Les cassures double brin (CDB) font partis des lésions les plus toxiques pour les cellules. En effet, une CDB non réparée peut résulter en la perte de la portion du chromosome ne comportant pas de centromère au moment de la division cellulaire, perte délétère pour la cellule. Elle peut ainsi entraîner une aneuploïdie (nombre anormal de chromosomes dans une cellule) ou des translocations entre régions de chromosomes, ce qui peut rapidement affecter la viabilité cellulaire en supprimant ou modifiant une partie de l'information génétique disponible et aussi être à l'origine de pathologie grave telle que le cancer.

Afin d'assurer la survie cellulaire et la maintenance du génome, il existe de nombreux mécanismes moléculaires souvent conservés dans l'évolution capables de réparer l'ADN endommagé. Deux mécanismes principaux peuvent réparer les CDB : la réparation par jonction des extrémités non-homologues (NHEJ), ligature directe des deux extrémités de la cassure ; la recombinaison homologue (RH) par recherche d'une séquence homologue (le plus souvent au niveau de la chromatide sœur saine) pour recopier et ainsi réparer la région endommagée. Bien que très efficace pour la réparation des cassures franches, la voie du NHEJ peut être source d'erreurs alors que la RH est sans erreur si elle utilise la bonne séquence homologue et permet donc une réparation plus fidèle des CDB. Le choix de la voie de réparation est dépendant de l'étape du cycle cellulaire. La RH est surtout active en phases S et G2, lorsque les deux chromatides sœurs sont disponibles.

La RH est également un mécanisme crucial pour assurer la réparation et le redémarrage des fourches de réplication endommagées (San Filippo, Sung, and Klein 2008a). En effet, la progression des fourches de réplication peut être altérée par la présence de lésions ou autre 'barrières' qui bloquent la machinerie réplivative. La RH utilise le brin d'ADN non endommagé afin de réactiver la fourche de réplication (Cox et al. 2000; West 2003; Spies and Kowalczykowski 2005).

Si la RH est un mécanisme biologique crucial pour assurer le maintien de l'intégrité du génome, elle est également impliquée directement dans les phénomènes d'adaptation et d'évolution dus aux modifications du génome. De ce fait, la RH assure un rôle essentiel au

cours de la méiose ou dans des processus de transfert d'information génétiques horizontaux tels que la transformation bactérienne. Dans la méiose, elle est responsable de l'échange d'information entre les allèles paternels et maternels dans les cellules germinales, générant ainsi de la diversité génétique par brassage, puis la ségrégation des paires de chromosomes homologues à travers la formation de crossing-over (San Filippo, Sung, and Klein 2008a).

Des défauts dans le processus de RH sont souvent délétères et peuvent entraîner la mort cellulaire ou encore provoquer des réarrangements dans le génome à l'origine de processus de cancérogenèse. Il s'agit donc d'un mécanisme extrêmement contrôlé.

B. La réparation des cassures doubles brins (CDB)

1) Les mécanismes de réparations des CDB

a) *La voie NHEJ (Non-Homologous End Joining)*

La voie NHEJ, de jonction non homologue des extrémités, ou encore de recombinaison non homologue, est responsable de la majorité des réparations des CDB chez les eucaryotes supérieurs (Rothkamm et al. 2003), et est active durant tout le cycle cellulaire. 60% des cassures induites par des agents génotoxiques sont réparées par le NHEJ chez les vertébrés. Le NHEJ fait partie des voies majeurs de réparations des CDB. On distingue généralement 3 phases : (1) L'étape de reconnaissance, (2) l'étape de maturation des extrémités et (3) l'étape de ligation des extrémités (Figure 1).

La réparation débute avec la reconnaissance et le recrutement de l'hétérodimère KU70/KU80 (appelé simplement KU par la suite) sur les extrémités d'ADN de la CDB. Le complexe KU-ADN ainsi formé est à l'origine du recrutement de DNA-PK_{cs} (sous-unité catalytique de la protéine kinase dépendante de l'ADN) (Hammel et al. 2010). L'interaction entre les deux protéines requiert la présence d'ADN (Gottlieb Tm and Jackson Sp 1993), entraînant un changement de conformation de la partie C-terminal de Ku qui contribue à l'association avec DNA-PK_{cs} et son activation (Lehman, Hoelz, and Turchi 2008). Il a été proposé que DNA-PK soit capable de former un pont entre les extrémités de la cassure. Après reconnaissance des extrémités de l'ADN, Ku est capable de glisser vers l'intérieur pour permettre l'accès à d'autres protéines aux extrémités d'ADN (Walker, Corpina, and Goldberg 2001). KU se comporte comme une plateforme de recrutement de DNA-PK_{cs} mais aussi d'autres protéines impliquées dans le NHEJ, telles que XLF (Xrcc4 like factor), WRN (Werner), PAXX (paralogue XRCC4 et de XLF) (Ochi et al. 2015). Le complexe XRCC4-XLF forme un long filament hélicoïdale capable de former des ponts entre des molécules d'ADN qui permet la protection et l'alignement des extrémités d'ADN pour faciliter la réparation (Ropars V et al. 2011; Andres et al. 2012).

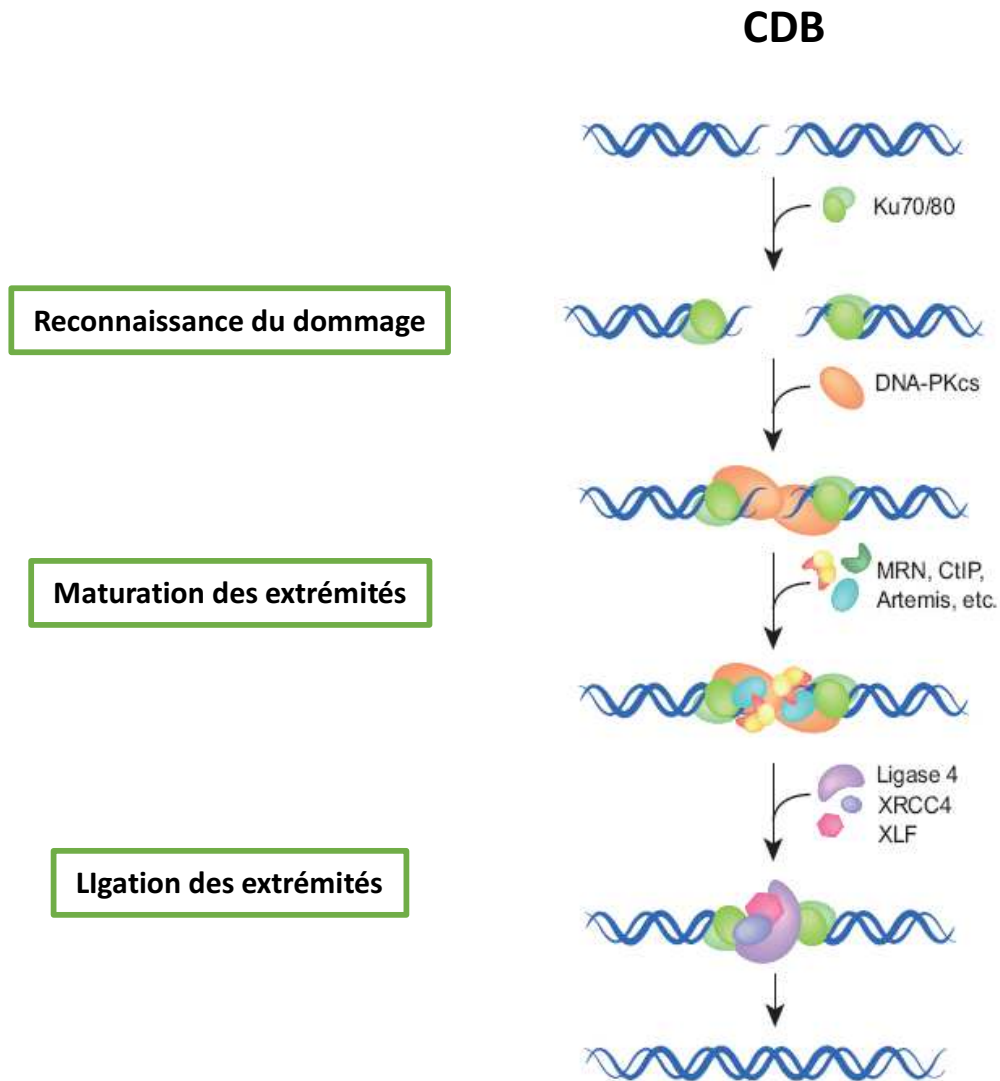


Figure 1 : Mécanisme du NHEJ (Dueva and Iliakis 2013)

KU permet à la fois de protéger les extrémités et de constituer une plateforme de recrutement pour certains partenaires de cette voie. La sous-unité catalytique de DNA-PK (DNA-PKcs) interagit avec le complexe ADN-KU, ce qui entraîne une translocation de KU vers l'intérieur. DNA-PKcs peut phosphoryler de nombreux substrats dont Ku70/80, WRN (Werner), Artemis, XRCC4, XLF, DNA Ligase IV, mais le rôle de cette activité kinase n'est pas clairement établie. L'autophosphorylation de DNA-PK entraîne l'inhibition de son activité Kinase et sa déstabilisation avec les extrémités d'ADN (Uematsu et al. 2007)(Meek K, V, and Sp 2008).

Les protéines du complexe de maturation appartiennent à plusieurs classes d'enzymes parmi lesquelles des nucléases (Artémis), APLF (Aprataxin and PNK-like), l'hélicase et nucléase WRN, des nucléotides kinases/phosphatases (PNK) et les ADN polymérases (pol λ , pol μ , TdT...) chez les mammifères. Après le contact entre les extrémités d'ADN, le complexe de ligation est

recruté pour souder l'ADN au niveau de la cassure. Ce complexe est composé de DNA ligase 4, XRCC4 et XLF. XLF interagit avec le complexe XRCC4-LIG4 pour promouvoir la réparation et la ligation (Ahnesorg P, P, and Sp 2006).

Le complexe de ligation est ensuite recruté pour relier les extrémités de la cassure. Ce complexe est composé de DNA ligase IV, XRCC4 et XLF. PAXX apparaît être dans une position intermédiaire entre le complexe de maturation et le complexe de ligation. XLF apparaît être le partenaire qui assure le lien entre le complexe KU-ADN et le complexe XRCC4-LIG4, lequel forme un filament hélicoïdale.

La voie du NHEJ est certes une voie majeure de la réparation des CDB non programmée dans tous les contextes cellulaires, mais elle constitue aussi la voie qui assure la réparation des CDB programmées au cœur de la recombinaison V(D)J (Variable (Diversity) Joining) au cours de la maturation des lymphocytes B et T chez les humains et d'autres vertébrés (Malu S et al. 2012). C'est une réaction de recombinaison clivage-spécifique qui permet de créer la grande diversité de récepteurs des cellules T et la formation des immunoglobulines. C'est un phénomène clé dans la défense contre les pathogènes bactériens, viraux et parasitaires (Lieber 2010). Par conséquent, les patients dépourvus de certains acteurs du NHEJ canonique sont non seulement sensibles au rayonnement ionisant, mais développent également une sévère immunodéficiência combinée (*SCID pour Severe Combined Immuno Deficiency*) caractérisé par un blocage de la différenciation des lymphocytes T, associé ou non au développement anormal d'autres souches immunitaires, dont les lymphocytes B et les cellules NK (Natural Killer). Les patients ont des phénotypes particuliers tels que la microcéphalie et un retard de croissance (Chinn Ik and Wt 2015).

b) La voie Alt-EJ (Alternative End Joining)

La voie Alt-EJ est également un mécanisme de jonction des extrémités qui est indépendant de KU et qui semble intervenir lorsque le NHEJ est dérégulé ou défectueux. Cette voie de réparation Alt-EJ utilise des microhomologies de séquence de part et d'autre de la lésion de 4pb à 25pb pour favoriser l'alignement des deux extrémités et permettre la ligation. Cette hybridation de micro-homologies est alors prise en charge par la ligase Lig3/LIGIII et la protéine XRCC1.

Cette voie est dépendante de PARP1 et de l'ADN ligase III. La reconnaissance des lésions et la fixation de PARP1 (poly(ADP- ribose) polymerase-1) au niveau des CDB qui est suivie par la polyADP-ribosylation d'autres protéines (modifications post traductionnelle par ajout de PolyADP-riboses). Dans cette voie de réparation, PARP1 est directement impliquée dans le recrutement du complexe de résection et de ligation incluant MRN, CtIP, XRCC1 et la Ligase III (Masani S et al 2016). La fonction endonucléase du complexe MRN, qui est stimulée par la CtIP phosphorylée, semble initier l'Alt-EJ en traitant les extrémités d'ADN pour générer des extrémités 3' sortante de 15 à 100 nucléotides (figure 2).

L'étape dite de maturation inclue d'autres enzymes décrits comme essentielles incluant la polymérase θ ($pol\theta$), la nucléase FEN1 (Flap Endonuclease-1), la kinase hPNK (human PolyNucleotide Kinase). La dernière étape de ligation par Ligase III en présence de XRCC1 et/ou peut-être aussi la Ligase I. Ces deux ligases fonctionneraient de manière

hiérarchique. La ligase I pourrait agir comme une ligase de secours en absence de ligase III. La voie Alt-EJ est un mécanisme de réparation mutagène pouvant aboutir à des délétions dans la séquence d'ADN.

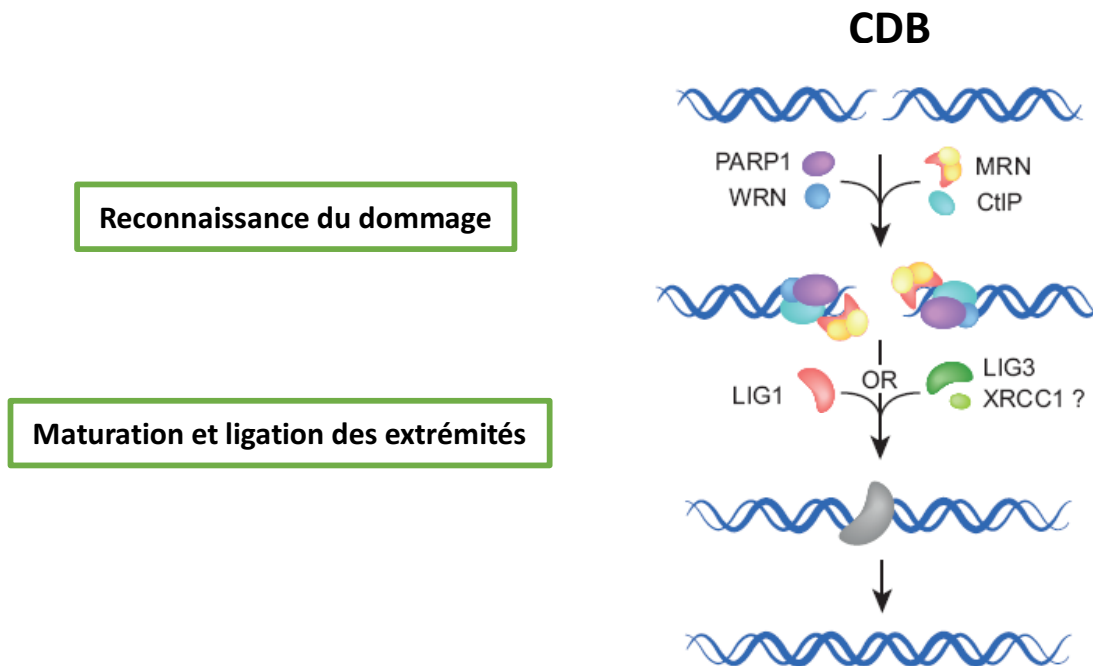


Figure 2 : Mécanisme de l'Alt-EJ (Dueva and Iliakis 2013)

c) La Recombinaison Homologue (RH)

Le mécanisme de RH est basé sur l'utilisation d'une séquence homologue comme matrice pour réparer le brin d'ADN endommagé, entraînant la formation d'un intermédiaire synaptique par appariement homologue. Dans les phases S et G2 du cycle cellulaire, la chromatide sœur fournit la séquence homologue, de telle sorte que les dommages sont fidèlement réparés, sans conséquences génétiques. Les étapes centrales du mécanisme moléculaire (présynaptiques, synaptiques et postsynaptiques) ainsi que les acteurs de la RH sont conservés dans tous les organismes vivants, des bactéries à l'Homme, ainsi que dans certains bactériophages et virus (Cromie Ga, Jc, and Dr 2001). Cependant, selon le contexte et les espèces, il existe un certain nombre de variations du mécanisme dans lesquelles les intermédiaires formés sont pris en charge et remodelés différemment selon les activités des protéines recrutées. Dans les étapes présynaptiques, la résection, c'est-à-dire la dégradation d'un brin d'ADN dans la direction 5'→3' et la formation d'un ADN 3'-OH simple brin de chaque côté de la lésion, initie la RH (figure 3). La résection est assurée en deux étapes par des nucléases et l'hélicases (voir chapitre II), ce qui aboutit à la formation d'extrémités 3' simple brin (sb) de plusieurs centaines de nucléotides (nt) (Symington Ls 2016). À cette étape, si la cassure et la résection ont eu lieu au niveau de séquences répétées, une voie alternative impliquant un processus d'hybridation des deux extrémités sb peut permettre la réparation. C'est la voie SSA (Single Strand Annealing) qui entraîne alors la perte de matériel génétique.

RPA est la première protéine recrutée sur les extrémités sb, puis l'assemblage des recombinases (RAD51 chez les eucaryotes) pour former le nucléofilament présynaptique permet le processus de recherche des séquences homologues dans tout le génome, suivi de l'appariement homologue. Différentes structures synaptiques peuvent alors être formées et résolues sous l'action d'hélicases et de nucléases, avec ou sans crossing over (CO). Le mécanisme moléculaire sera expliqué en détails dans la section « II. Le mécanisme moléculaire de recombinaison homologue et sa régulation ».

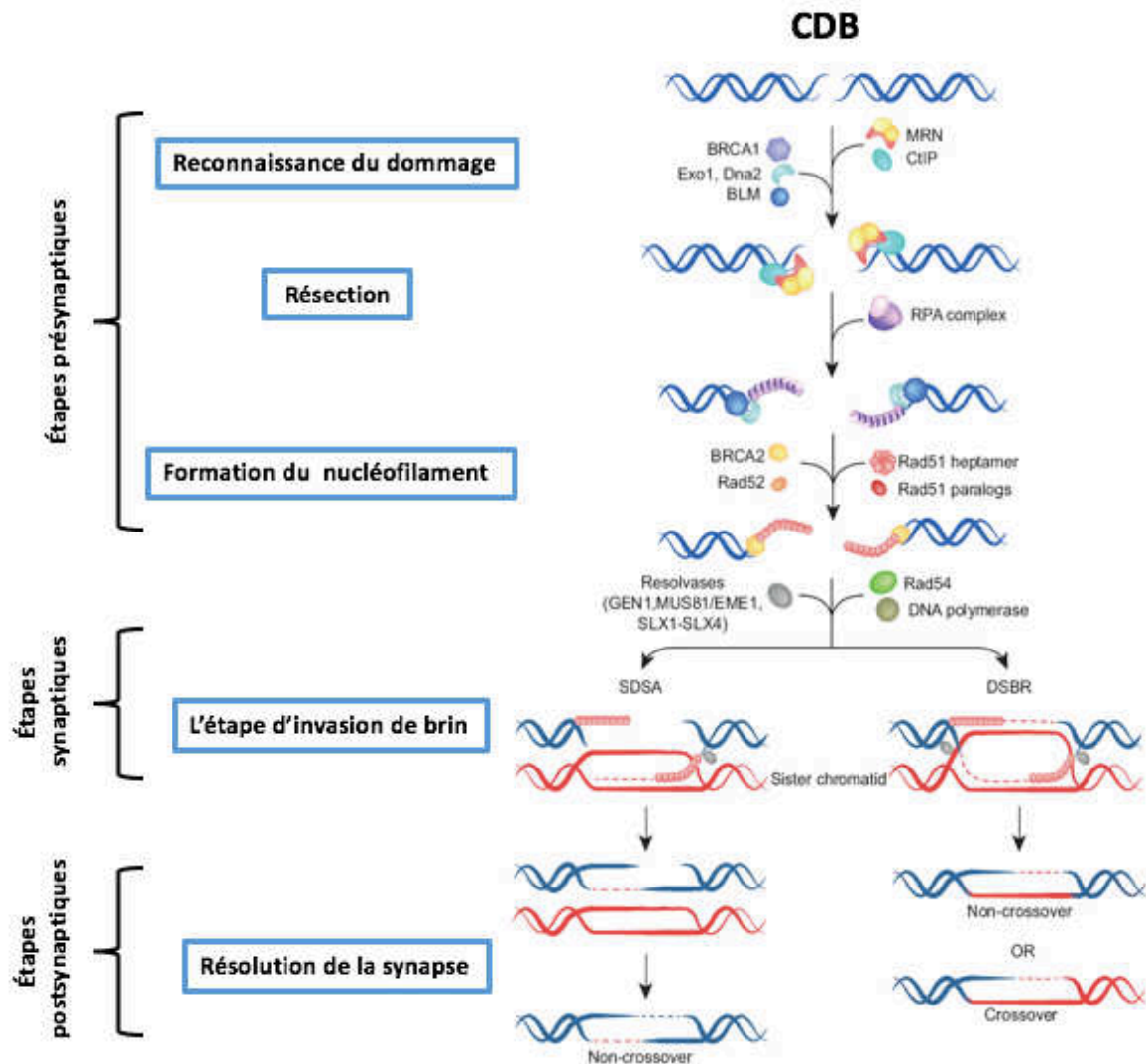


Figure 3 : Mécanisme de la RH (Dueva and Iliakis 2013)

Dans la phase post-synaptique, la synapse peut être résolue dans trois sous-voies différentes avec/ou sans croisements génétiques : le modèle de réparation de Szostak *et al.* impliquant la formation d'une double jonction de Holliday (djH) (nommé DSBR pour Double Strand Break Repair) (Szostak et al. 1983), la voie par réhybridation de brins après une courte étape de synthèse (SDSA pour Synthesis Dependent Strand Annealing) et la réplication induite

par la cassure (BIR pour Break Induced Replication). Sur le plan génétique, ces différentes voies aboutissent soit à un processus de conversion génique lorsqu'il y a un échange non réciproque d'information, soit à un transfert réciproque d'information génétique au travers la formation de crossing-over. La plupart des événements de réparation de l'ADN par RH n'impliquent pas de crossing-over, limitant la voie DSBR et privilégiant la voie SDSA.

i. La voie SDSA (Synthesis Dependant Strand Annealing)

Dans ce mécanisme de réparation, après l'étape d'invasion et d'initiation de la synthèse, le brin d'ADN envahissant/néosynthétisé est déplacé du brin matrice vers l'extrémité du second brin résecté de la cassure. Ces deux brins se réhybrident, permettant de réamorcer la synthèse d'ADN pour compléter les brèches d'ADNsb (Gap). Dans cette voie, il n'y a pas de formation de jonction de Holliday (figure 4). Ce processus n'a lieu que si la structure synaptique formée reste petite et est dissoute grâce à l'action d'une hélicase. Le produit résultant de ce mécanisme ne subit pas de CO. Il s'agit du mécanisme de réparation prépondérant des CDB dans les cellules somatiques.

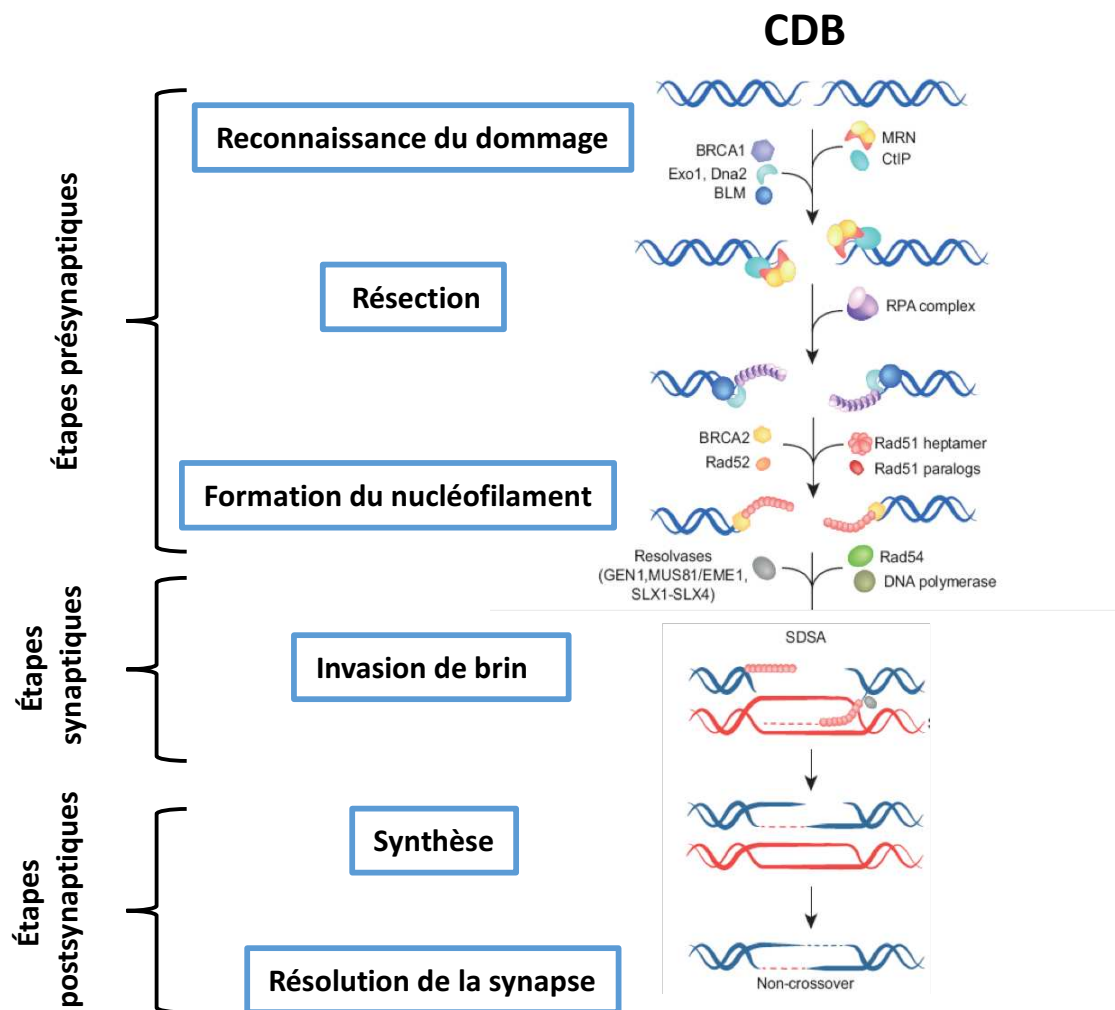


Figure 4 : La voie SDSA (Dueva and Iliakis 2013)

ii. La voie DSBR (Double Strand Break Repair)

Dans la voie canonique DSBR, la deuxième extrémité d'ADNsb de la CDB est capturée dans la D-loop et s'apparie avec le brin déplacé, ce qui conduit à la formation d'une djH. La capture du second brin est favorisée par Rad52 chez la levure et chez l'Homme (Nimonkar, Sica, and Kowalczykowski 2009; McIlwraith Mj and Sc 2008). Il y a ensuite une étape de ligation, puis les intermédiaires de la djH peuvent être résolus soit par clivage endonucléolytique des jonctions avec la formation de produits avec CO ou sans CO, soit par les actions combinées d'hélicases et de topoisomérases avec la formation d'un produit exclusivement sans CO (figure 5). La formation de CO et donc la voie DSBR de la RH se font principalement dans la RH au cours de la méiose, et sont évitées lors de la réparation, en effet les CO peuvent entraîner des délétions, des inversions ou des translocations. Même si le mécanisme précis de résolution est encore inconnu, plusieurs résolvases ont été identifiées pour cliver, *in vitro*, les jonctions de Holliday, telles que, Slx1-Slx4, Mus81-Mms4 (EME1 chez l'Homme), Yen1 (orthologue de GEN1 chez l'Homme) (West Sc et al. 2015). Les résolvases (notamment MUS81-EME1 et GEN1) sont régulées par phosphorylation/déphosphorylation tout au long du cycle cellulaire, à la fois dans les cellules méiotiques et mitotiques, afin de coordonner la résolution des molécules jointes (Matos J et al. 2011; Talhaoui I, M, and G 2016). Les djH peuvent également être résolues par un mécanisme de dissolution impliquant des hélicases et des topoisomérases. Chez l'Homme, le complexe 'BTR' constitué de l'hélicase BLM, la topoisomérase TOPOIII α et le cofacteur RMI1/2 (BTR pour BLM-TOPOIII α -RMI1/2). BLM est une hélicase de la famille RecQ qui constituent un groupe très conservé de protéines jouant des rôles à l'interface entre réplication et recombinaison et intervenant dans le maintien de la stabilité du génome. Dans cette famille, Sgs1, BLM et WRN sont capable de promouvoir la migration de branches des jonctions de Holliday (JHs) avec une processivité remarquable (Karow et al. 2000). Lors de la dissolution, l'activité de ce complexe fait migrer les deux jonctions l'une vers l'autre pour générer des hémicaténanes que la topoisomérase clive et dissout, conduisant à des produits sans CO.

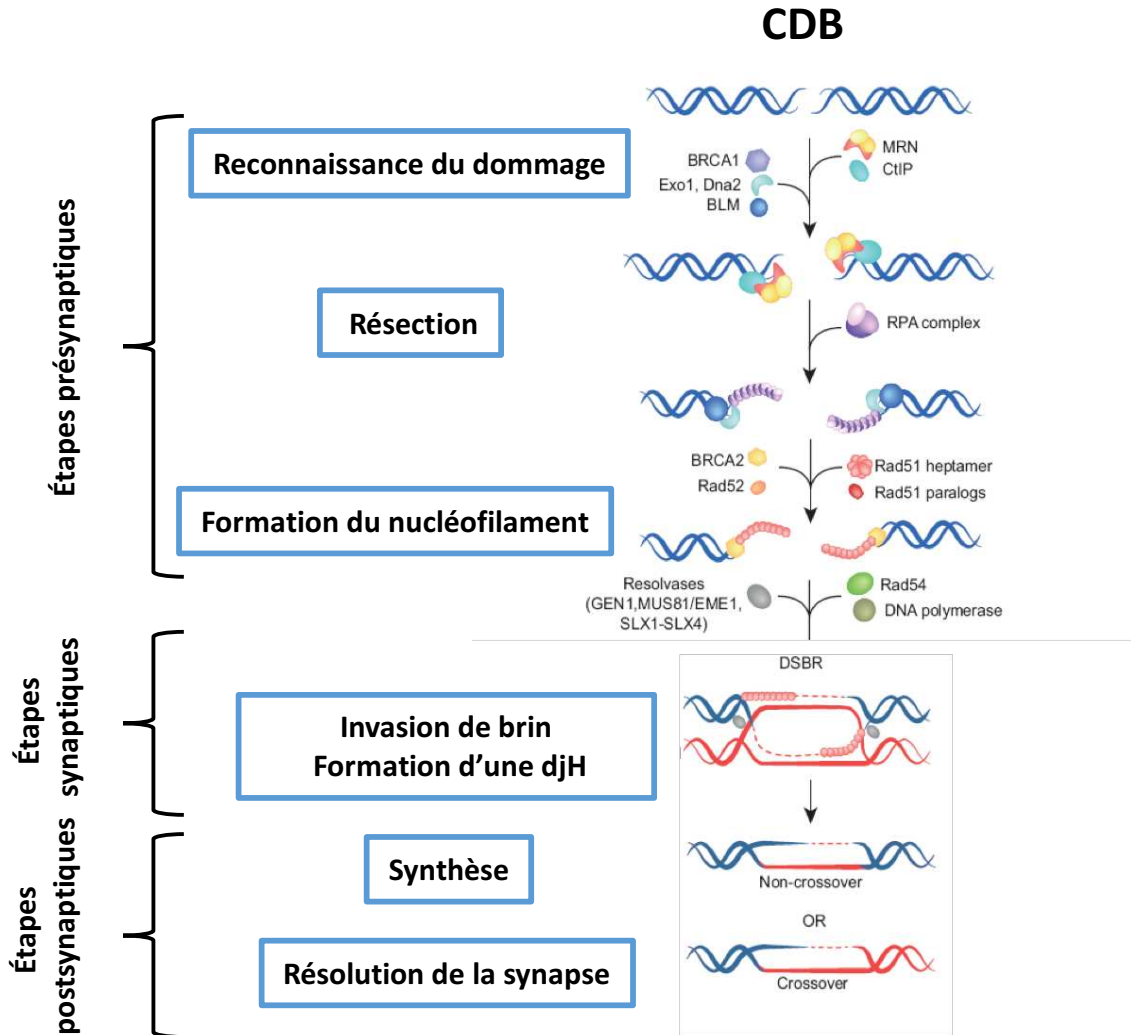


Figure 5 : La voie DSBR (Dueva and Iliakis 2013)

iii. La voie SSA (Single-Strand Annealing)

Le SSA est une voie alternative de réparation des CDB par recombinaison entraînant une perte de matériel génétique. En effet elle met en jeu l'hybridation de brins complémentaires localisés à proximité de la cassure au niveau de séquences répétées (figure 6). Après l'étape de la résection, les régions homologues sont exposées et peuvent alors s'hybrider sous l'action de RAD52, mais indépendamment de RAD51 et de son activité de recherche d'homologie et d'appariement homologue. Les extrémités sb sortantes (Flap) ainsi créées sont clivées par XPF-ERCC1 (Rad1-Rad10 chez la levure). L'intervention de polymérase et de la DNA ligase 1 va ensuite permettre de compléter la brèche et réparer la CDB. Une surexpression de *RAD51* restaure la bonne réparation des CDB chez les mutants *RAD52*, ce qui suggère que les différentes voies dépendantes et indépendantes de RAD51 pourraient se mobiliser en même temps au site de cassure, sur l'ADNsb, et entrer en compétition pour effectuer la réparation. Le choix du mécanisme de recombinaison dépend de différents

facteurs incluant la localisation de la cassure (télomères, répétitions), la phase du cycle cellulaire, la présence et la quantité des protéines impliquées dans les étapes précoces du mécanisme, mais aussi la présence d'autres protéines dont la fonction est de contrôler l'évolution des intermédiaires et de les orienter vers une voie plutôt qu'une autre.

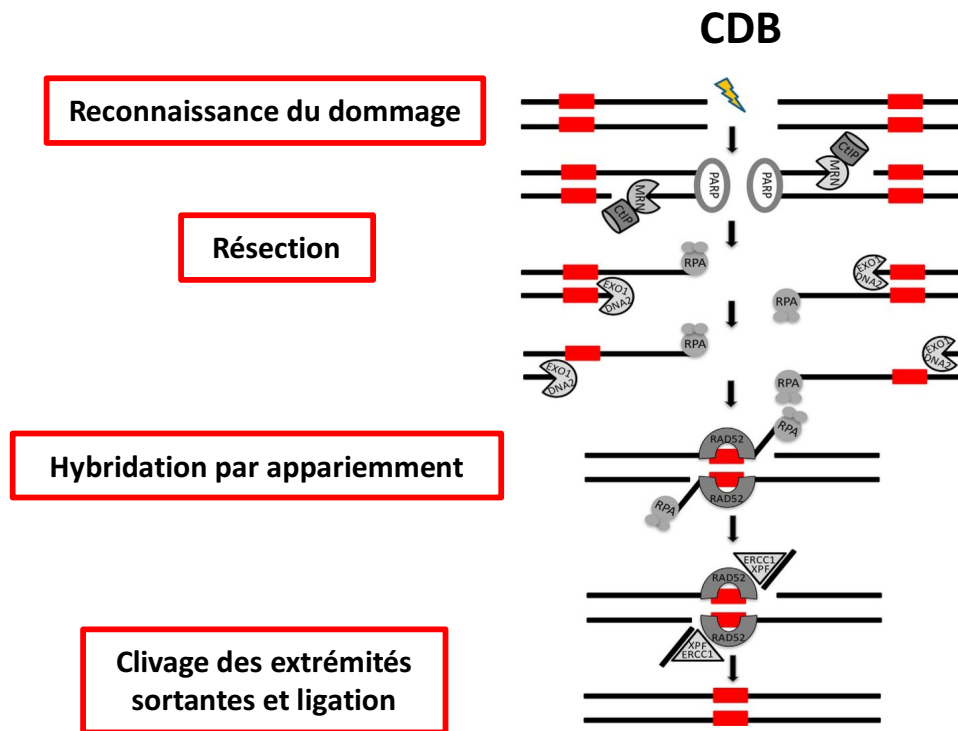


Figure 6 : Mécanisme du SSA (Sallmyr and Tomkinson 2018)

iv. La voie BIR (Break Induced Replication)

Les CDB sont des lésions pouvant se produire aux fourches de réplication arrêtées ou aux télomères. Dans ce cas, l'autre extrémité de la cassure peut être perdue ou manquante. La voie BIR implique un processus d'invasion de brin RAD51-dépendant, suivi de l'initiation de la synthèse d'ADN qui va se poursuivre pendant des centaines de kilobases, sans qu'il puisse y avoir de capture du deuxième brin de l'extrémité manquante (Krogh Bo and Ls 2004). Cette synthèse est radicalement différente de celle relative à la réplication car au lieu d'une fourche de réplication, le BIR procède via une bulle migratrice (Figure 7). La voie BIR est responsable d'instabilités génétiques, notamment la formation d'amas de mutations et une hypermutagenèse, des pertes d'hétérozygotie, des translocations chromosomiques, des variations du nombre de copies et d'autres réarrangements génomiques complexes. Des études récentes dans les cellules humaines ont mis en évidence que des événements de BIR médiés par des microhomologies (MMBIR) peuvent entraîner des réarrangements complexes de

chromosomes, à l'origine de cancérogenèse et d'un certain nombre de troubles neurologiques chez l'Homme.

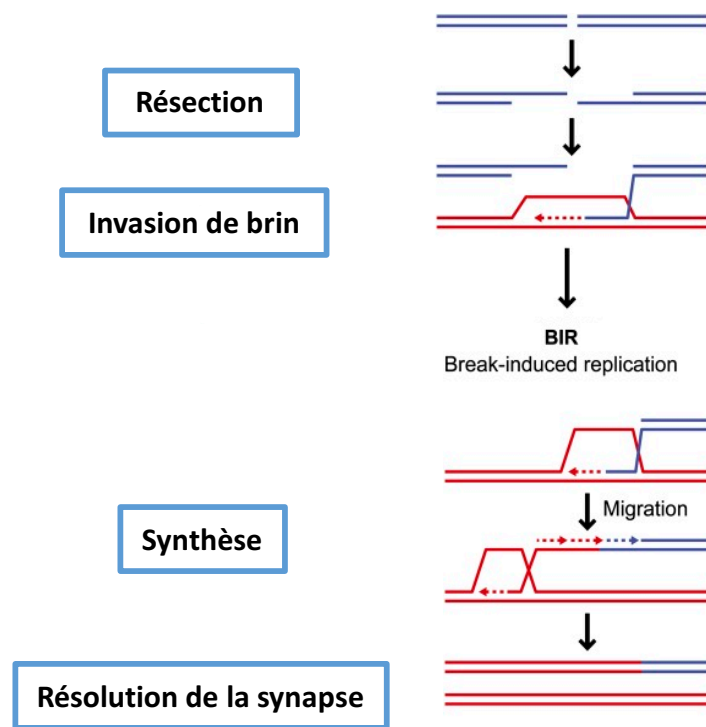


Figure 7 : La voie du BIR. Version adaptée de (Symington, Rothstein, and Lisby 2014)

2) Le choix de la voie de réparation

Lorsqu'une ou plusieurs CDB se produisent, leur reconnaissance puis le contrôle de la réponse et de la voie de réparation sont cruciales pour maintenir l'intégrité du génome. Tout d'abord, la résection des extrémités de la CDB constitue l'un des premiers critères pour définir la mise en place d'une voie de réparation plutôt qu'une autre. D'autre part, des modifications post-traductionnelles de certaines protéines impliquées dans les voies de réparation permettent de moduler leurs activités et ainsi contrôler les mécanismes associés. Finalement, ce choix entre les voies de réparation est également régi par l'activation de CDK, qui joue un rôle important au stade de la résection, étape nécessaire à l'initiation de la RH (au détriment du NHEJ), et qui est également important pour l'activation du point de contrôle (checkpoint) des dommages à l'ADN (Ferretti Lp, L, and Aa 2013). Cette régulation par CDK est privilégiée pendant les phases S et G2 (Aylon Y, B, and M 2004).

Le complexe MRN (MRX chez la levure) et la protéine Ku sont les premières protéines de réparation à se lier directement aux extrémités d'ADN formées au niveau de la cassure. Elles sont recrutées indépendamment et entrent en compétition dans leurs activités, afin de promouvoir respectivement la RH ou le NHEJ (Bressan Da, Bk, and Jh 1999; Tomita K et al. 2003; Mimitou Ep and Ls 2010, 2). Le complexe MRX est capable de déplacer la protéine Ku et

d'initier la RH (Shim Ey et al. 2010). Même si la compétition entre MRN et Ku semble être importante pour déterminer le choix de la voie entre RH et NHEJ, il semble que MRN/X joue également un rôle dans le NHEJ (Iwasaki D et al. 2016), ce qui soutient un modèle proposé dans lequel MRN/X participe à l'alignement des extrémités d'ADN dans un complexe synaptique juste avant l'activation d'une des deux voies de réparation de l'ADN (Huang J and Ws 2002). En revanche, à elle seule, la protéine Ku inhibe l'étape de la résection pour ne favoriser que le NHEJ (Mimitou Ep and Ls 2010). Notons que les trois composants du complexe MRN sont phosphorylés par ATM, qui joue donc un rôle important dans la régulation de la résection, en plus de son rôle dans le point de contrôle du cycle cellulaire, (Lavin Mf et al. 2015; Kijas Aw et al. 2015, 1).

La protéine CtIP (Sae2 chez la levure) est également impliquée dans la réponse aux CDB. Elle est présente à des niveaux relativement bas durant la phase G1, tandis qu'elle devient plus abondante en phase S-G2, (Yun Mh and K 2009), sa phosphorylation par CDK induit le recrutement de BRCA1 et l'activation de la RH (au détriment de l'Alt-EJ). Ainsi, CtIP-BRCA1 module le choix de la voie de réparation des CDB tout au long du cycle cellulaire (Yun Mh and K 2009). D'autre part, BRCA1 et CtIP sont requises pour le recrutement de la nucléase DNA2 au niveau de la CDB (Hoa Nn et al. 2015). Finalement, chez les vertébrés, CtIP active directement la résection des extrémités d'ADN en interagissant avec le complexe MRN (MRX chez la levure) via Mre11 et favorise ainsi la RH ou l'Alt-EJ (Sartori et al. 2007).

Après MRN, BLM et DNA2 assurent un processus de résection longue (plusieurs centaines de nucléotides) grâce à leurs activités hélicase et nucléase respectivement (figure 8). RPA assiste BLM et joue un rôle dans la polarité 5'-3' du processus. Aucune autre hélicase de la famille RecQ ne peut remplacer BLM pour cette fonction (Nimonkar et al. 2011). L'activité hélicase de BLM est stimulée par le complexe Topo IIIa-RMI1-RMI2 et par DNA2. De plus, BLM interagit avec RAD51 (Wu et al. 2001), ce qui permet d'envisager la possibilité d'un chargement de RAD51 en même temps que l'ADNsb est néoformé. WRN (une autre hélicase RecQ) peut aussi interagir avec DNA2 (Sturzenegger et al. 2014), mais n'est pas capable d'initier la résection à partir d'extrémités franches (Nimonkar et al. 2011; Sturzenegger et al. 2014). Cependant, WRN semble contribue partiellement à la résection des CDB *in vitro* (Sturzenegger et al. 2014) et *in vivo* (Tomimatsu et al. 2012), ce qui suggère que ces deux hélicases RecQ (BLM et WRN) pourraient coopérer pour former un long brin d'ADNsb.

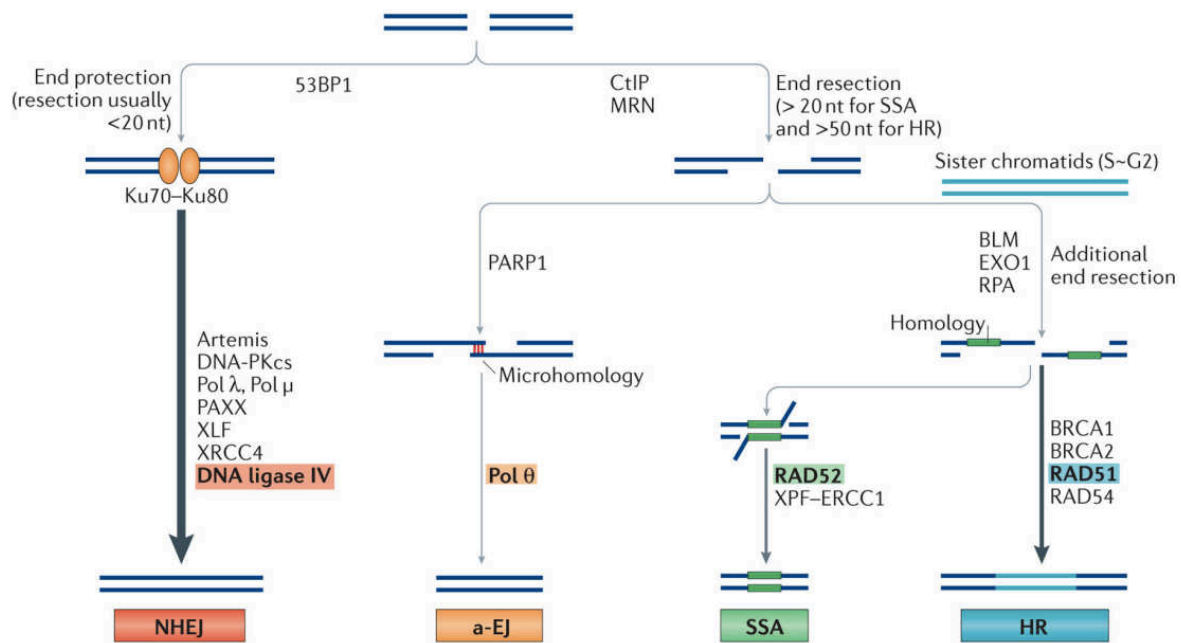


Figure 8 : Le choix des voies de réparation des CDBs (Chang et al. 2017)

Chez l'Homme un autre mécanisme de résection longue a été mis en évidence, impliquant l'action de la nucléase EXO1. EXO1 est également stimulée par le complexe MRN, RPA et BLM, cette dernière augmente l'affinité d'EXO1 pour les CDB sans pour autant affecter sa processivité (Nimonkar et al. 2011) (Nimonkar et al. 2008). En revanche, MRN augmente la processivité d'EXO1, probablement en restant associé à EXO1 lors de la résection. Enfin, CtIP interagit également avec EXO1 et stimule la résection des CDB (Eid et al. 2010).

53BP1 (RAD9 chez la levure) a d'abord été décrit comme un partenaire de liaison à la protéine suppresseur de tumeur p53. Elle joue un rôle important dans la réponse au dommage à l'ADN en recrutant des protéines de la réparation des CDB. 53BP1 empêche la résection en se fixant sur les extrémités de la CDB (Bothmer et al. 2010; Bunting et al. 2010) et est régulée par RIF1, une protéine connue pour bloquer la résection et favoriser la réparation des CDB par la voie du NHEJ (Escribano-Díaz et al. 2013; Zimmermann et al. 2013). D'autre part, il existe une relation antagoniste entre 53BP1 et BRCA1 dans laquelle BRCA1 (par son association avec CtIP) supprime l'effet inhibiteur de 53BP1 sur la résection et favorise la RH (Bunting et al. 2010). De façon importante, une double inactivation des gènes *BRCA1* et *53BP1* entraîne de sévères formes de cancer du sein (Bouwman et al. 2010) et il a récemment été découvert que PARP2 joue ici un rôle régulateur en limitant l'accumulation de 53BP1 sur les sites endommagés de l'ADN et en favorisant la résection (Fouquin A et al. 2017).

D'autres facteurs protéiques et modifications post-traductionnelles peuvent également contrôler le choix de la voie en régulant la RH et les autres voies à différents niveaux. Par exemple, chez la levure, Srs2 est connue pour inhiber précocement la RH en détruisant le filament présynaptique formé par Rad51 sur l'ADNsb. Il a été montré que Nej1 recrute l'hélicase Srs2 à l'ADN et favorise ainsi un mécanisme de type NHEJ/SSA (Carter Sd et al. 2009). D'ailleurs, d'autres acteurs de la résection et intermédiaires de la RH tels que les

filaments RAD51 et la D-loop représentent des cibles de la régulation. En plus du cycle cellulaire, la nature, l'origine, la quantité et la complexité des lésions de l'ADN influencent la voie choisie (Zierhut C and Jf 2008). Ainsi, ces différentes voies de réparation coexistent dans un équilibre finement contrôlé, qui lorsqu'il est altéré, peut-être nocif pour le génome et être à l'origine de la cancérogenèse.

C. La réparation des fourches de réplication endommagées

L'ADN doit être répliqué avec précision et efficacité à chaque cycle cellulaire afin d'assurer la transmission et la maintenance du génome. Dans les cellules eucaryotes, la fourche de réplication se déplace à une vitesse d'environ 1 à 2 kb/min (Yeeles Jtp et al. 2017). Cependant, sa progression peut être affectée (ralentie voire complètement arrêtée) si elle rencontre un obstacle. Il existe différents types d'obstacles rencontrés par les fourches de réplication (figure 9) : les structures secondaires de l'ADN, des protéines liées à l'ADN avec une très forte affinité, les collisions avec la machinerie de transcription et enfin, les lésions de l'ADN (bases endommagées) en sont quelques exemples (Lamber S. and Am 2013).

Une caractéristique importante d'une fourche bloquée est qu'elle est capable de reprendre la réplication, une fois que l'obstacle a été surmontée (Wyatt and West 2014). En effet, le réplisome peut rester lié à la fourche de réplication en totalité ou en partie, selon la nature des dommages. Et même si la réplication ne peut redémarrer, l'ADN néosynthétisé reste protégé dans le réplisome le temps que d'autres voies de redémarrage puissent être activées. Ces autres voies de redémarrage des fourches comprennent la convergence avec une autre fourche venant en sens inverse ou le déclenchement d'une origine dormante (McIntosh D and Jj 2012), le réamorçage/réinitiation (repriming) en aval des lésions suivie du remplissage des 'gaps' d'ADNsb (Gap filling) laissés derrière (Elvers I et al. 2011), ou encore un redémarrage impliquant le RH (également connu sous le nom de Réplication Dépendante de la Recombinaison ou RDR) (Ait Saada A, Sae, and Am 2018). La réplication peut se poursuivre sur l'un des brins, il se produit alors un découplage de la synthèse des deux brins d'ADN, la réinitiation de la réplication en aval de la lésion permet à la fourche de réplication de poursuivre sa progression, laissant une brèche d'ADN simple-brin. Plusieurs stratégies permettent de combler cette brèche en tolérant une lésion sans qu'elle soit réparée, c'est ce que l'on appelle les voies DDT (pour DNA Damage Tolerance pathways) : (1) la synthèse translésionnelle (ou TLS pour *trans-lesion synthesis*), un mécanisme par lequel une ADN polymérase spécialisée (dite translésionnelle dont Pol η , Pol ζ et Rev1 (Shilkin Es et al. 2020) remplace transitoirement l'ADN polymérase répliquative et insère un nucléotide directement en face de la lésion. Ces ADN polymérases translésionnelles étant très peu fidèles, la TLS est donc souvent à l'origine de mutations ; par conséquent, des mutations dans les gènes codant pour les polymérases translésionnelles ou d'autres protéines impliquées dans ce mécanisme entraînent une diminution de la fréquence de mutation en réponse à un traitement aux rayons UV. (2) le mécanisme de contournement des dommages (ou DA pour *damage avoidance*), un mécanisme fondé sur la RH. La région d'ADN simple-brin générée en aval de la lésion envahit la région homologue (double-brin) de la chromatide sœur ce qui permet à la cellule de récupérer l'information génétique altérée par la lésion. En fonction de la nature et du nombre

de lésions et également du contexte cellulaire, il existe une balance subtile entre les deux voies DDT.

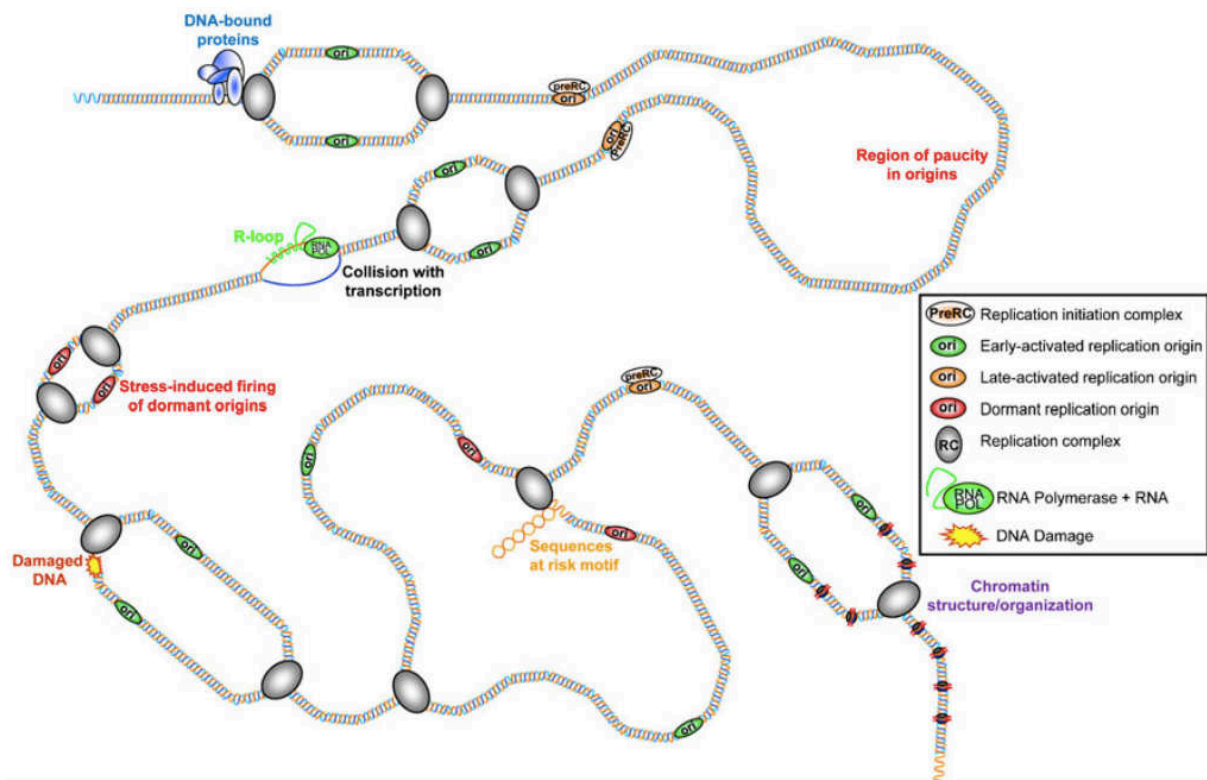


Figure 9 : Vue d'ensemble des obstacles provoquant un blocage des fourches de réplication (BFR). Les obstacles typiques provoquant le BFR (protéines liées à l'ADN, organisation de la chromatine, séquence de motifs à risques, dommages à l'ADN) et l'interférence entre la réplication et la transcription ont tous le potentiel d'interférer avec la progression de fourches de réplication et sa synthèse d'ADN associée. (Lambert S and Am 2013)

Si une fourche de réplication bloquée ne peut être redémarrée ou sauvée ou même si le point de contrôle intra-S n'est pas activé, cela peut conduire au processus d'effondrement (collapse) de la fourche, c'est-à-dire que la fourche de réplication perd sa capacité à répliquer l'ADN (Neelsen KJ and M 2015) soit par dissociation du réplisome et des facteurs associés, soit par rupture ou clivage de la fourche. S'il existe des preuves des deux situations, il n'y a pas de consensus. Il a été montré que les composants du réplisome (notamment Pol ϵ , Pol α et MCM) se dissocient de la fourche de réplication en l'absence d'activation du checkpoint des dommages à l'ADN (Zeman MK and Ka 2014). Or une autre étude a montré que le réplisome reste associé à la fourche bloquée dans des mutants de checkpoint mais que ce dernier est nécessaire pour maintenir le réplisome fonctionnel, notamment au travers la phosphorylation de l'hélicase répliquative (De Piccoli G et al. 2012). D'autres part, le clivage par des

endonucléases des intermédiaires formés à la fourche de réplication bloquée peuvent entraîner la formation de CDB.

Un exemple de remodelage des fourches de réplication en cas de stress réplicatif, en particulier dans les zones du génome qui sont difficiles à répliquer ou qui présentent des dommages à l'ADN, est la réversion de fourche. (Neelsen KJ and M 2015). Ce processus implique le retour en arrière de la fourche et la réhybridation des deux brins initiaux des chromatides sœurs entraînant la formation d'une structure à 4 branches. Ces structures peuvent être la cible des endonucléases telles que Mus81 ou le complexe Slx4, leur clivage entraînant la formation de CDB (Neelsen KJ and M 2015).

Il a été montré que les mécanismes de redémarrage impliquant un remodelage des fourches entraînent une augmentation de l'instabilité génétique, cependant les conséquences sont toujours moins délétères qu'un arrêt total de la réplication dans les cellules suite au collapse de fourche (Cortez D 2015). Il est donc crucial de comprendre ce qui contribue à favoriser le redémarrage et la réparation des fourches de réplication.

Ces dernières années, un nouveau mécanisme pour préserver la stabilité du génome impliquant le couple d'acteurs BRCA2-RAD51 a été caractérisé. Il a été montré qu'en cas de stress réplicatif, BRCA2 se relocalise aux fourches de réplication arrêtées et favorise la formation de filaments nucléoprotéiques RAD51 stables, inhibant dans le même temps la dégradation des fourches dépendante de MRE11 (Mijic S et al. 2017). BRCA1 joue également un rôle dans la stabilisation de la fourche et agit avec BRCA2 pour inhiber la nucléase MRE11 (Taglialatela A et al. 2017). Le rôle de RAD51 dans la stabilisation des fourches bloquées est clairement établi, une surexpression de *RAD51* permet de restaurer la stabilité des fourches bloquées (Clements Ke et al. 2018). En fait, RAD51 est un effecteur commun de plusieurs voies qui aboutissent à la dégradation nucléolytique des fourches bloquées et son mode d'action précis n'est pas bien compris. Il pourrait être lié à un blocage physique de la progression des nucléases sur l'ADN, ou à des interactions directes et inhibitrices entre RAD51 et les nucléases. D'autre part, le remodelage par réversion de fourche est dépendant de RAD51 (Zellweger R et al. 2015), ce qui complique d'autant plus la compréhension du rôle de RAD51 à la fourche, en effet il a été montré que les intermédiaires formés après réversion seraient eux aussi des points d'entrée pour diverses exonucléases, et donc soumis à une dégradation nucléolytique (Lemaçon D et al. 2017; Mijic S et al. 2017). D'ailleurs, le blocage de la réversion de fourche par une déplétion de RAD51 supprime considérablement la résection associée aux fourches bloquées (Lemaçon D et al. 2017). Au contraire, dans d'autres études, l'inhibition de RAD51 par les peptides BRC4 ou le B02, n'ont pas eu pour effet d'empêcher la résection (Taglialatela A et al. 2017; Schlacher et al. 2011, 11). Finalement, le mutant RAD51 T131P, affecté dans son affinité pour l'ADN et incapable de former des nucléofilaments stables présente une dégradation excessive des fourches bloquées et une instabilité du génome mais pas de défaut de réversion de fourche *in vivo* (Kolinjivadi Am et al. 2017). Ces données suggèrent une dissociation des fonctions de RAD51 pour la réversion de fourche et la protection des fourches contre la dégradation. De façon intéressante, plusieurs paralogs de RAD51, y compris RAD51C, XRCC2 et XRCC3, sont également nécessaires pour prévenir une résection excessive dépendante de MRE11 (Somyajit et al. 2015). Les mécanismes moléculaires associés à ces deux fonctions de RAD51 et de ses partenaires restent à préciser. Bien que la stabilisation de la fourche et la RH partagent ce même 'axe BRCA2-RAD51', les mécanismes impliqués

semblent indépendants, impliquant des acteurs et une dynamique variables (Tagliatela A et al. 2017; Dungrawala H et al. 2017) (Schlacher et al. 2011, 2), il est donc probable que des processus de régulation permettent de dicter le choix de la voie selon le contexte. Récemment, Nek1 a été identifié comme régulateur jouant sur la balance entre stabilisation de la fourche et RH. À la fin de la phase G2, Nek1 phosphoryle RAD54 et augmente son activité de démantèlement des filaments RAD51 (activité de translocation) après l'invasion de brin, favorisant ainsi l'achèvement de la RH. Ce n'est pas le cas pendant la phase S, où l'activité de RAD54 n'est pas stimulée par phosphorylation, RAD51 reste donc associée aux fourches de réplication bloquées. Ce mécanisme de régulation permet que l'axe BRCA2-RAD51 agisse plutôt en faveur de la protection et la stabilisation des fourches en réplication, et plutôt en faveur de la RH pour réparer les dommages à l'ADN avant le début de la mitose (Spies J et al. 2016, 1).

D. RH, réparation des CDB et Cancer

Les CDB sont parmi les lésions les plus toxiques et si elles n'entraînent pas la mort cellulaire, elles sont souvent à l'origine de mutations et aberrations chromosomiques entraînant la transformation néoplasique. D'autre part, toute altération d'un mécanisme de réparation est associée à la cancérogenèse, processus complexe, dont une des caractéristiques est l'instabilité génétique, responsable de l'accumulation de mutations et de la progression tumorale (Chapman Jr, Mr, and Sj 2012). Puisque la RH est un mécanisme de réparation des CDB avec une fidélité élevée, les mutations dans les gènes de la RH sont quasiment systématiquement associées au processus de cancérogenèse. Ainsi, les défauts dans les gènes de RH provoquent de nombreux syndromes génétiques, tels que l'ataxie télangiectasie, l'anémie de Fanconi et le syndrome de Bloom ayant des prédispositions au développement de cancer (Sullivan and Bernstein 2018). Le syndrome de Bloom, lié à l'absence d'une protéine BLM fonctionnelle, est caractérisé par une instabilité génétique marquée et une prédisposition des patients à tous les types de cancers. BLM est impliquée, entre autre, dans la régulation de la RH et du nucléofilament RAD51. D'autre part, les médiateurs du nucléofilament RAD51 et leurs partenaires d'interaction sont fortement corrélés aux maladies définies par l'instabilité génomique qui prédisposent au cancer. Ainsi, les mutations au sein des gènes comme *BRCA1/BRCA2* sont associées à une augmentation du risque de développer un cancer du sein, des ovaires, de la prostate et/ou du pancréas (Foulkes Wd, Bm, and C 2016; Nielsen Fc, T, and Cs 2016). Ces mutations sont variées, elles peuvent aller d'un simple changement d'acide aminé à une méthylation du promoteur du gène (Bernards Ss et al. 2018). L'implication des mutations des gènes *BRCA1* et *BRCA2* est de nos jours systématiquement évaluée dans tous types de cancer. Les mutations concernant les paralogs de RAD51 sont également liées à l'apparition de cancer. Une mutation monoallélique dans *RAD51C* et *RAD51D* se traduit par une augmentation du risque de développer un cancer de l'ovaire tandis qu'une mutation chez *RAD51B* augmente la fréquence d'apparition d'un cancer du sein (Honglin Song et al. 2015). Dans certaines cellules cancéreuses des mutations au niveau du gène *RAD54* ont également été décrites. *RAD54P63H*, *RAD54G325R* et *RAD54V444E* sont 3 mutations ponctuelles non-sens trouvées respectivement dans le cancer du côlon, le cancer sein et dans un lymphome (Matsuda M et

al. 1999).

Au cours des dernières années, les pratiques médicales et notamment les thérapies anticancéreuses ont évolué vers des traitements de plus en plus personnalisés basés sur les caractéristiques cellulaires et moléculaires individuelles de chaque patient. Dans ce sens, la thérapie anticancéreuse dite 'ciblée' qui viserait à identifier les changements spécifiques dans l'ADN des cellules cancéreuses du patient, permettrait de les cibler spécifiquement sans nuire aux cellules et tissus normaux, minimisant ainsi les effets secondaires des traitements et augmentant leur efficacité. Les altérations spécifiques des mécanismes de réparation des dommages à l'ADN, notamment des CDB représentent des nouvelles cibles pour une thérapie anticancéreuse personnalisée. Comme on l'a décrit précédemment, dans les cellules humaines 'normales', les deux mécanismes majeurs de réparation des CDB sont la RH et le NHEJ : Le NHEJ est la voie majeure dans les cellules qui ne se divisent pas, la RH principalement dans les cellules en prolifération. Le NHEJ alternatif (Alt-EJ) dépendant de PARP1 est un mécanisme de sauvegarde dans le cas où le NHEJ est altéré. De même, le SSA dépendant de RAD52 peut servir de voie alternative en cas d'une déficience de la RH (Karanam K et al. 2012). Dans les deux cas, ces voies génèrent des altérations du génome et sont sources d'instabilité génétique. La déficience de l'une des voies principales de réparation est très fréquente dans les cellules cancéreuses, et dans ce cas, la survie des cellules dépend entièrement de voie(s) alternative(s), ainsi leur inactivation provoque la mort cellulaire. Cibler la voie alternative peut représenter une bonne approche thérapeutique pour éradiquer spécifiquement les cellules cancéreuses, avec un faible risque pour les cellules normales. La létalité synthétique est la létalité engendrée par la perte simultanée de deux fonctions/voies sans que l'inactivation individuelle de l'une ou l'autre n'affecte autant la viabilité cellulaire (Kaelin Wg 2005). Elle a été mentionnée pour la première fois comme un outil potentiel de thérapie anticancéreuse en 1997 par Leland H. Hartwell, lauréat du prix Nobel (Hartwell Lh et al. 1997). Près de 20 ans plus tard, l'inhibiteur de PARP1, Olaparib (PARPi), est devenu le premier traitement en monothérapie des patientes atteintes d'un cancer de l'ovaire ou du sein associés à un déficit de BRCA (Kim G et al. 2015). Alors que les cellules normales traitées avec les inhibiteurs de PARP1 sont capables de réparer efficacement les CDB en utilisant la RH médiée par BRCA1/2, les cellules cancéreuses porteuses de défauts de RH accumulent des niveaux élevés de lésions toxiques qui conduisent à l'apoptose et à la létalité synthétique (Farmer H et al. 2005). Trois autres inhibiteurs de PARP1 : le rucaparib, le niraparib et le talazoparib, ont également obtenu l'approbation de la FDA (Food and Drug Administration), et de nombreux autres composés sont à divers stades d'essais cliniques en monothérapie et en association avec d'autres de chimio - ou - radiothérapie (Toma M, T, and T 2019). Bien qu'actuellement, l'interaction létale synthétique entre l'inactivation de BRCA1/2 et l'inhibition de PARP1 soit la seule qui ait trouvé une application en médecine, la sensibilité des tumeurs portant d'autres altérations de la réparation de l'ADN, à PARPi et à de nouveaux inhibiteurs contre de nouvelles cibles de létalité synthétique sont en cours (Mateo J et al. 2015). L'une des raisons de la recherche de nouvelles voies synthétiques létales est que l'effet des inhibiteurs de PARP1 est généralement de courte durée. Dans de nombreux cas, les cellules tumorales deviennent résistantes au traitement en raison de divers mécanismes, y compris des mutations secondaires rétablissant la fonction de BRCA1/2 (Lord Cj and A 2013). De plus, la perte de mutations fonctionnelles dans 53BP1 peut

conduire à une restauration partielle de la RH et par la suite, à l'émergence d'une résistance aux inhibiteurs de PARP1 (Clements Ke et al. 2018; Bouwman et al. 2010, 1). D'autres voies alternatives restent cependant actives dans les cellules déficientes en BRCA, les protégeant de l'effet létal synthétique de PARPi. Le rôle de RAD52 apparaissant comme important dans les cellules déficientes en BRCA en particulier, cibler RAD52 pourrait constituer une approche thérapeutique anticancéreuse attractive (Cramer-Morales K et al. 2013; Kumar A, S, and Nk 2016). On comprend ici en quoi les études sur les mécanismes moléculaires de réparation sont cruciales pour avancer sur les stratégies thérapeutiques en cancérologie, notamment au travers l'augmentation de l'efficacité de ces inhibiteurs, et l'éradication plus rapide et plus robuste des cellules tumorales pour limiter l'émergence de clones résistants aux PARPi.

II. LE MECANISME MOLÉCULAIRE DE RECOMBINAISON HOMOLOGUE ET SA REGULATION

A. Mécanisme général et ses différentes voies

Le mécanisme de RH met en jeu plusieurs étapes : dans les étapes présynaptiques, il y a reconnaissance de la cassure puis formation d'ADN simple brin (sb). L'étape centrale, synaptique, est la formation de la 'synapse', pendant laquelle un contact est établi entre les ADN homologues par un processus d'invasion et d'échange de brin. Dans les étapes post-synaptiques, la structure synaptique peut être prise en charge par différentes machineries impliquant resolvases, hélicases et nucléases et résolue dans différentes voies. Ces étapes sont assurées par un certain nombre d'acteurs dont les protéines du groupe Rad (Rad51, Rad52...). Ce groupe est constitué des protéines dont les gènes mutés sont hypersensibles aux agents génotoxiques endommageant l'ADN (d'où la nomenclature « Rad » pour Radiosensitive). Ces gènes ont été classés dans un groupe appelé « épistasie Rad52 » qui comprend : *RAD50*, *RAD51*, *RAD52*, *RAD54*, *RAD57*, *RAD59*, *MRE11*, *XRS2* et *RADH54/TID1* (Patrick Sung and Klein 2006). Une mutation dans l'un de ces gènes provoque également une déficience du mécanisme de RH.

- 1) Etapes présynaptiques : reconnaissance du dommage et résection puis assemblage du nucléofilament présynaptique
 - a) *Formation de l'ADNsb*

La formation d'ADNsb est la première étape et la condition pour initier la RH. Il y a d'abord reconnaissance de la cassure par le complexe hétérotrimérique MRX chez *Saccharomyces cerevisiae* (Mre11, Rad50 et Xrs2), MRN chez l'Homme (Mre11, Rad50 et Nbs1), capable de se lier à l'ADN et de maintenir les deux extrémités de la cassure proches. Cette reconnaissance des cassures est essentielle à la fois pour l'initiation de la réparation, mais aussi pour la signalisation du dommage. Chez la levure, les mutants des gènes codant pour les trois protéines Mre11, Rad50, Xrs2 du complexe présentent une forte sensibilité aux agents mutagènes, notamment à l'irradiation gamma, responsable de la formation de CDB. L'endonucléase Sae2 est ensuite recrutée et initie la résection 5'-3' (digestion progressive de l'un des deux brins d'une molécule d'ADN), ce qui élimine environ 100 nt de l'extrémité 5' des

cassures (Figure 3). L'extrémité simple brin formée devient alors le substrat préférentiel de l'exonucléase Exo1 ou du couple Sgs1 (hélicase RecQ)/exonucléase DNA2. Il existe potentiellement 5 homologues de Sgs1 chez l'Homme : RECQ1, BLM, WRN, RECQ4 et RECQ5 (Bizard and Hickson 2014). BLM est l'orthologue humain de Sgs1, basé en grande partie sur le fait qu'elle interagit avec DNA2 pour favoriser l'étape de résection mais aussi avec la topoisomérase IIIa, RMI1 et RMI2 pour favoriser la dissolution des dJHs (Nimonkar et al. 2008; Wu and Hickson 2003). L'exonucléase Exo1 ou le couple Sgs1 (hélicase RecQ)/exonucléase DNA2 réalisent la deuxième étape de résection appelée « résection processive ou extensive » aboutissant à la production d'un long ADNsb 3' sortant pouvant aller jusqu'à plusieurs kilobases (Rass et al. 2012). Les régions simples brins produites lors de cette résection ou les brèches d'ADNsb générées au cours de la réplication sont d'abord protégées par une protéine de liaison à l'ADNsb (protéine SSB pour Single Strand DNA Binding) appelée RPA (Replication Protein A).

b) Assemblage du nucléofilament présynaptique

La recherche d'homologie et l'invasion de brin constituent le point central de la RH, ces réactions sont catalysées par les recombinaisons (RecA chez les bactéries, Rad51 chez les eucaryotes). Ces dernières sont des protéines ATP-dépendantes qui s'assemblent sur l'ADNsb et forment un filament hélicoïdal. Cette structure est très conservée dans l'évolution. Au sein du filament, le brin d'ADN s'organise en un enchaînement de segments de 3 nucléotides espacés les uns des autres, ce qui entraîne son étirement d'environ 150 % par rapport à l'ADN de forme B. Un monomère se lie à 3 nucléotides d'ADNsb, il y a 6 monomères par tour d'hélice (A. Stasiak and Egelman 1994). La forme active du filament RecA/RAD51 nécessite la liaison à l'ATP, le pas est alors de 9,5 nm (bien que polymorphe). Un filament inactif plus condensé est formé en présence d'ADP (pas de 6,5 nm).

L'assemblage du filament s'effectue en deux étapes : la nucléation des recombinaisons sur l'ADNsb couvert et protégé par des protéines de liaison à l'ADNsb (Ssb chez les bactéries, RPA chez les eucaryotes), puis l'élongation du filament par polymérisation coopérative des recombinaisons le long de l'ADN (Bell et al. 2012; Candelli et al. 2014). La nucléation sur l'ADN implique 2-3 monomères de RAD51 (Kowalczykowski 2015b).

c) Régulation du nucléofilament

Dans le mécanisme de RH, le filament présynaptique représente un complexe nucléoprotéique central, extrêmement actif et dynamique. L'efficacité du processus de RH réside dans la formation, la stabilité et l'activité contrôlée de ce filament présynaptique, c'est donc un complexe finement régulé. Il existe des facteurs protéiques, les protéines médiatrices de la recombinaison (RMP) qui influencent directement l'assemblage et la stabilité du filament. Tout d'abord, les protéines SSB telles que RPA recouvrent et protègent l'ADNsb, le rendant dans un premier temps inaccessible aux recombinaisons. Les protéines RMP telles que RecFOR chez les bactéries, Rad52 chez la levure ou encore BRCA2 chez les eucaryotes ont la fonction commune de permettre le recrutement et la nucléation des recombinaisons sur

l'ADNsb nécessaires à l'assemblage du nucléofilament présynaptique (voir section II.B.3) (Eggler, Inman, and Cox 2002; Sugiyama, Zaitseva, and Kowalczykowski 1997). Il existe une autre catégorie de protéines RMP qui ont pour rôle de favoriser la stabilité du filament, en empêchant la dissociation des recombinaisons de l'ADN.

D'autre part, le désassemblage du nucléofilament est nécessaire au bon fonctionnement de la RH. Il peut avoir lieu précocement, afin d'empêcher la formation de filaments inactifs ou 'toxiques' pour la cellule, mais également pour éviter un excès de nucléofilament. Cette régulation précoce de la RH est exercée en majorité par des hélicases telles que Srs2 (*S. cerevisiae*), UvrD (*E. coli*), PcrA (*B. subtilis*) qui, en transloquant le long de l'ADN peuvent déplacer de protéines, ici les recombinaisons (Veaute et al. 2003; Krejci L et al. 2003; Anand et al. 2007). Cette fonction est donc conservée dans l'évolution.

- 2) Etapes synaptiques : recherche d'homologie, invasion de brin et formation de la D-loop
 - a) *Recherche et reconnaissance de l'homologie, formation du complexe synaptique*

Durant la recombinaison, le nucléofilament formé est capable de trouver une séquence homologue dans tout le génome en quelques minutes. La plupart du temps elle se situe à proximité sur la chromatide sœur, notamment lors de la réplication, où les chromatides sont maintenus proches par la fourche de réplication et les cohésines. Cependant, même lorsque les séquences homologues sont plus éloignées comme par exemple en phase G, il semble que la recherche d'homologie n'est jamais l'étape limitante de la RH. Chez la levure, il a été montré que l'efficacité de la recherche d'homologie est facilitée par l'augmentation de la mobilité de la région chromatinienne contenant la cassure, mais également des autres chromosomes (Miné-Hattab et al. 2017). Cependant, dans les cellules humaines, le mouvement des extrémités de la CDB pendant la recherche d'homologie est controversé. Dans certains cas, une immobilité des deux extrémités a plutôt été observée, décrite comme importante pour empêcher des fusions anormales et préserver la stabilité du génome (Soutoglou et al. 2007)(Soutoglou and Misteli 2007). Dans d'autres cas, les mouvements des CDB ont été caractérisés au travers le regroupement de domaines chromosomiques (Aten et al. 2004; Krawczyk et al. 2012). Les CDB présentent également une mobilité accrue au niveau des télomères, ce qui entraîne une recombinaison télomère-télomère (Cho et al. 2014). Ainsi, l'architecture nucléaire influence fortement l'efficacité de la RH en fonction du contexte cellulaire et de la région chromatinienne où se situe la lésion.

Le mécanisme moléculaire de recherche d'homologie est longtemps resté énigmatique, de récentes études du laboratoire et de molécules uniques ont permis d'avancer dans la compréhension de ce processus et de confirmer certaines hypothèses notamment que la présence de microhomologie (≥ 8 nt) permet de former des complexes synaptiques stables (Qi et al. 2015; Crickard Jb et al. 2020). La recherche s'effectue par contacts du nucléofilament présynaptique avec l'ADN donneur au niveau de séquences hétérologues, puis glisse le long de ces ADN jusqu'à créer des interactions plus stables au niveau de bases complémentaires (figure 10). Le nucléofilament forme ainsi des réseaux mixtes ou co-agrégats avec l'ADNdb

maintenus par de multiples contacts faibles, non spécifiques laissant la structure extrêmement dynamique. L'appariement homologue nécessite une séquence homologue d'au moins huit nucléotides (nt) (Qi et al. 2015). Une fois que l'homologie a été trouvée, le nucléofilament forme avec l'ADNdb donneur un complexe synaptique composée de trois brins maintenus ensemble par les recombinases, également appelé 'joint paranémique', au sein duquel trois brins sont entrelacés en triple-hélice coaxiale. Le brin envahissant se positionne dans un des sillons de l'ADNdb (Howard-Flanders P, Sc, and A 1984). Cette triple-hélice est donc stabilisée par RAD51 mais également par des liaisons de Hogsteen (non Watson-Crick) entre les bases des trois brins (Rao Bj, M, and Cm 1991).

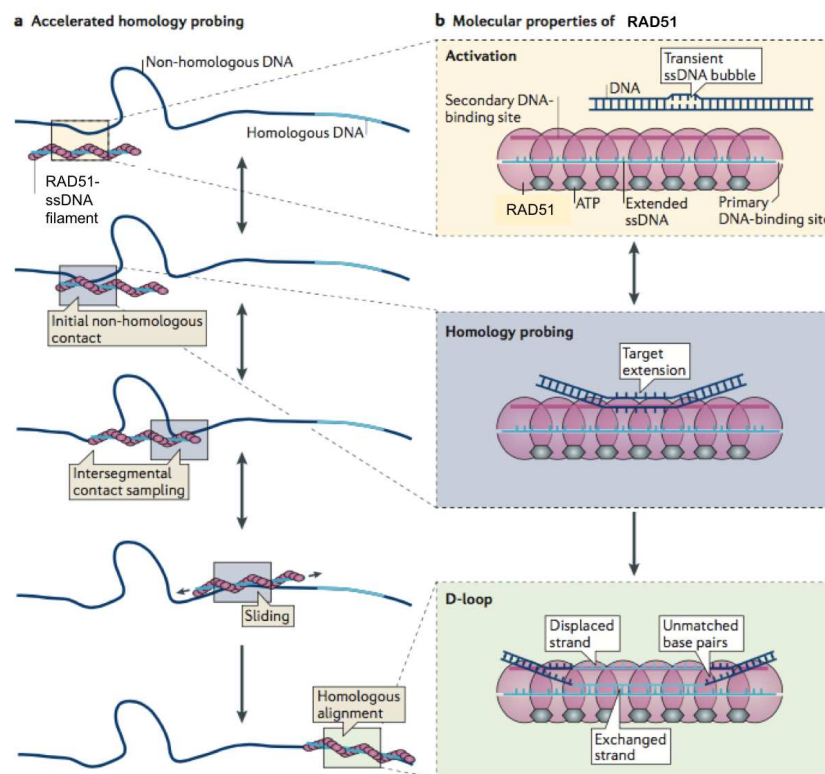


Figure 10 : Les différentes étapes de la recherche d'homologie. Adapté depuis (Renkawitz, Lademann, and Jentsch 2014)

b) Formation de la D-loop

Une fois l'homologie trouvée, l'alignement et l'appariement des séquences homologues au sein du complexe synaptique entraînent le déplacement du brin complémentaire initial aboutissant à la structure de D-loop (Displacement-loop) dans laquelle s'initie la synthèse. Le nouvel ADNdb formé par appariement de l'ADNsb endommagé avec le brin complémentaire de l'ADN donneur est nommé hétéroduplex.

En biochimie, ces étapes mécanistiques sont étudiées dans le test de D-loop mimant l'invasion d'un plasmide superenroulé par un nucléofilament formé sur un substrat d'ADNsb de séquence homologue d'une portion du plasmide, ou dans la réaction d'échange de brin entre un ADNsb circulaire et un double brin linéaire complètement homologue. En 1985, Riddles et Lehman avaient distingué deux sortes de molécules jointes dans un essai D-loop catalysé par RecA (Riddles and Lehman 1985). L'une était sensible à la déprotéinisation, l'autre résistante, ils ont été nommés respectivement joints paranémiques et plectonémiques. Les joints paranémiques sont les complexes synaptiques stabilisés par RecA, les joints plectonémiques résulte de l'entrelacement des brins par appariement des bases complémentaires impliquant des liaisons Watson-Crick et formant ainsi l'hétéroduplex. La microscopie électronique a très tôt été utilisée pour visualiser les intermédiaires d'échange de brins formés par RecA *in vitro* (Christiansen G and J 1986). Puis Ristic *et al.* ont révélé l'architecture des molécules jointes formées en présence de RAD51 humaine en utilisant la microscopie à force atomique (Ristic D, R, and C 2011). Si RecA seule catalyse la formation de D-loop, Rad51 de levure fonctionne uniquement avec son partenaire Rad54 dans cette réaction (Petukhova G, S, and P 1998), même si Rad51 est capable d'effectuer un échange de brins entre un long ADNsb circulaire et un ADNdb linéaire sans Rad54 (P. Sung 1994). Cependant il a été montré récemment au laboratoire qu'en l'absence de Rad54, le filament Rad51 n'établit aucun contact avec l'ADN homologue, Rad54 est donc absolument requise pour cette étape de recherche d'homologie par « probing » (Tavares Em et al. 2019). Nous avons montré en MET que RAD51 humaine favorise la formation de D-loop seule mais en présence de calcium, et cette activité est stimulée par RAD54 (Bugreev Dv and Av 2004). Puis des études récentes en microscopie de fluorescence TIRF (Total Internal Reflexion Fluorescence) dans lesquelles des 'rideaux' d'ADN (longues molécules d'ADN peignées et fixées aux deux extrémités) sont mis en présence des protéines d'intérêt marquées par des fluorophores permettent de caractériser la dynamique en temps réel de ces protéines sur l'ADN ainsi que la formation de molécules jointes (Qi Z and Ec 2016). Cette approche a permis de montrer que Rad54 forme avec Rad51 une unité fonctionnelle qui facilite la recherche d'homologie. Rad54 agit comme un moteur moléculaire durant la recherche d'homologie et elle permet de défaire les structures qui ne sont pas suffisamment stabilisé par des liaisons Watson-Crick. Ainsi elle promeut la formation de la D-loop en retirant Rad51 de l'ADN une fois l'homologie trouvée (Qi et al. 2015; Crickard Jb et al. 2020)(voir « C) Recherche d'homologie, invasion de brin, résolution de la synapse et rôle de RAD54 »).

c) *Initiation de la synthèse*

L'initiation de la synthèse est une étape clé car elle représente le point de départ du transfert de l'information génétique. Au sein de la D-loop formée par RAD51, l'extrémité 3'-OH de l'ADNsb envahissant est utilisée comme amorce par les polymérases pour démarrer la synthèse. Chez *S. cerevisiae*, il a été démontré que Rad54 contrôle l'accès des polymérases à cette extrémité, probablement en enlevant Rad51 de l'hétéroduplex (Bhowmick, Minocherhomji, and Hickson 2016). Ce rôle n'est pas confirmé chez l'homme et les mécanismes précis par lesquels la synthèse de l'ADN a lieu pendant la RH ne sont que partiellement compris. La RH répare/recopie avec une grande fidélité, on pourrait donc

s'attendre à ce que la Pol ϵ ou la Pol δ répliquative effectue la synthèse, d'ailleurs les preuves génétiques chez *S. cerevisiae* soutiennent cette hypothèse (Sotiriou Sk et al. 2016). Chez l'homme, il a été démontré que les polymérases δ , η et κ sont capables d'étendre une structure de D-loop, et un certain nombre d'arguments soutiennent l'idée que différentes polymérases pourraient être impliquées (Malacaria E et al. 2019; Malacaria et al. 2020; Schlacher et al. 2011, 2). D'une part, Pol δ est capable d'effectuer une synthèse efficace et processive au sein des D-loop formées par RAD51, de façon dépendante de PCNA/RFC et fortement stimulée par RPA (Hashimoto Y et al. 2010). D'autre part, il a été démontré que les BRCA2 et PALB2 stimulent la synthèse par Pol η dans la RH au niveau des fourches de réplication bloquées, et ce, indépendamment du PCNA/RFC (Kolinjivadi Am et al. 2017). Mais le recrutement des polymérases et l'initiation de la synthèse en présence de RAD51, RPA et RAD54 restent énigmatiques.

3) Etapes post-synaptiques : dissolution ou stabilisation de la D-loop puis résolution

La stabilisation et l'extension de la D-loop sont déterminantes car elles influencent directement la nature de l'échange génétique et des produits de RH. Dans ce sens, on a vu que la D-loop peut être résolue dans deux voies distinctes, aboutissant à des produits de RH différents : le SDSA est une voie sans CO impliquant un mécanisme de dissolution de la D-loop, alors que la voie DSBR peut aboutir à un processus de conversion génique et à la production de CO en mettant en jeu la capture du deuxième brin puis la formation d'une double jonction de Holliday.

a) Dissolution de la D-loop

Il a été montré que BLM, WRN et RECQ1 sont capables in vitro de démanteler des molécules jointes dépourvues de RAD51 (Bachrati, Borts, and Hickson 2006; Popuri et al. 2008), cette activité de BLM est même inhibée lorsque RAD51 est liée à l'ADN (Nimonkar et al. 2008). RAD54 est une translocase capable de déplacer RAD51 de l'ADNdb, ainsi elle pourrait permettre à BLM d'agir sur la D-loop, une fois RAD51. D'autre part, l'hélicase FANCM est un bon candidat pour jouer ce rôle, en effet il a été montré qu'elle diminue le pourcentage de CO dans la RH au cours de la méiose (Girard et al. 2015) et son orthologue de levure Mph1 est capable de dissoudre les D-loop (Prakash et al. 2009). RTEL fonctionnent spécifiquement pendant le désassemblage de la D-loop (Simandlova et al. 2013b).

b) Capture du deuxième brin

Une étape encore mal connue est la capture du deuxième brin (appariement du brin déplacé de la D-loop avec l'ADNsb de l'autre côté de la cassure) qui, après ligation des extrémités, aboutit à un intermédiaire stable à 2 jonctions quatre branches (ou jonctions de Holliday). Il a été suggéré que RAD52 utilise son activité d'hybridation des brins complémentaires (single strand annealing - SSA) pour permettre la capture du deuxième brin (Nimonkar et al. PNAS 2009). Cependant, cette fonction reste à préciser.

c) Formation de la double jonction de Holliday, migration de branches et résolution

La synthèse suivie de la capture du deuxième brin et de la ligation aboutit à la formation d'une structure à ' branches : les jonctions de Holliday (JH). Au cours de la méiose, les JH sont clivées par des endonucléases pour générer des CO qui sont essentiels au brassage génétique et à la bonne ségrégation des chromosomes (Matos J et al. 2011; Zakharyevich K et al. 2012). Dans les cellules somatiques, les CO peuvent provoquer des mutations délétères et sont supprimés par BLM (Wu and Hickson 2003). La capture du second brin entraîne la formation d'une double jonction de Holliday (djH) (figure 11). Cet intermédiaire est résolu soit par un mécanisme de résolution ou de dissolution, produisant un crossing over (CO) (Jasin and Rothstein 2013) ou non (Blanco et al. 2014). Dans un processus dans lequel les topoisomérases sont également impliquées (Cejka P et al. 2010; Chen Sh et al. 2014), BLM catalyse la migration d'une double jonction de Holliday, la réduisant en une structure appelé « hemicatenane » (Mankouri Hw and Id 2007). Cet intermédiaire est résolu par la topoisomérase III α (TopoIII α) en générant des produits sans crossing-over (Wu and Hickson 2003). BLM et TopoIII α travaillent dans le cadre d'un hétéro-complexe nommé résolvasome (Mankouri Hw and Id 2007) qui inclut également les «facteurs d'instabilité médiés par RecQ», RMI1 et RMI2 (Singh Tr et al. 2008). L'interaction et les activités concertées du complexe BLM et TopoIII α sont suffisantes pour entraîner la dissolution de la djH mais RMI1 s'est avérée stimuler cette réaction (Raynard S, W, and P 2006; Wu L et al. 2006). D'autres voies permettent de résoudre ces structures complexes formées lors de la synthèse et de la ligation notamment la voie qui fait intervenir GEN1, orthologue de Yen1 (levure), qui conduit à une résolution symétrique des brins et donne un produit avec crossing-over (Ip et al. 2008). Enfin, une voie donnant des produits sans crossing-over met en place une résolution asymétrique en faisant intervenir les endonucléases MUS81-EME1 et SLX1-SLX4. MUS81 a été identifié comme une enzyme qui coupe les JHs dans les cellules humaines (X. B. Chen et al. 2001). MUS81-EME1 interagit également avec RAD54 de manière spécifique. Le système humain possède également des orthologues de SLX1-SLX4, qui interviennent également dans le clivage des JHs (Fekairi et al. 2009; Wyatt et al. 2013). SLX1-SLX4 se lie à MUS81-EME1 pour former un complexe hétéro-tétramérique. Le clivage par ce complexe est plus efficace que par SLX1-SLX4 ou MUS81-EME1 seul et les produits sont symétriques (Wyatt et al. 2013).

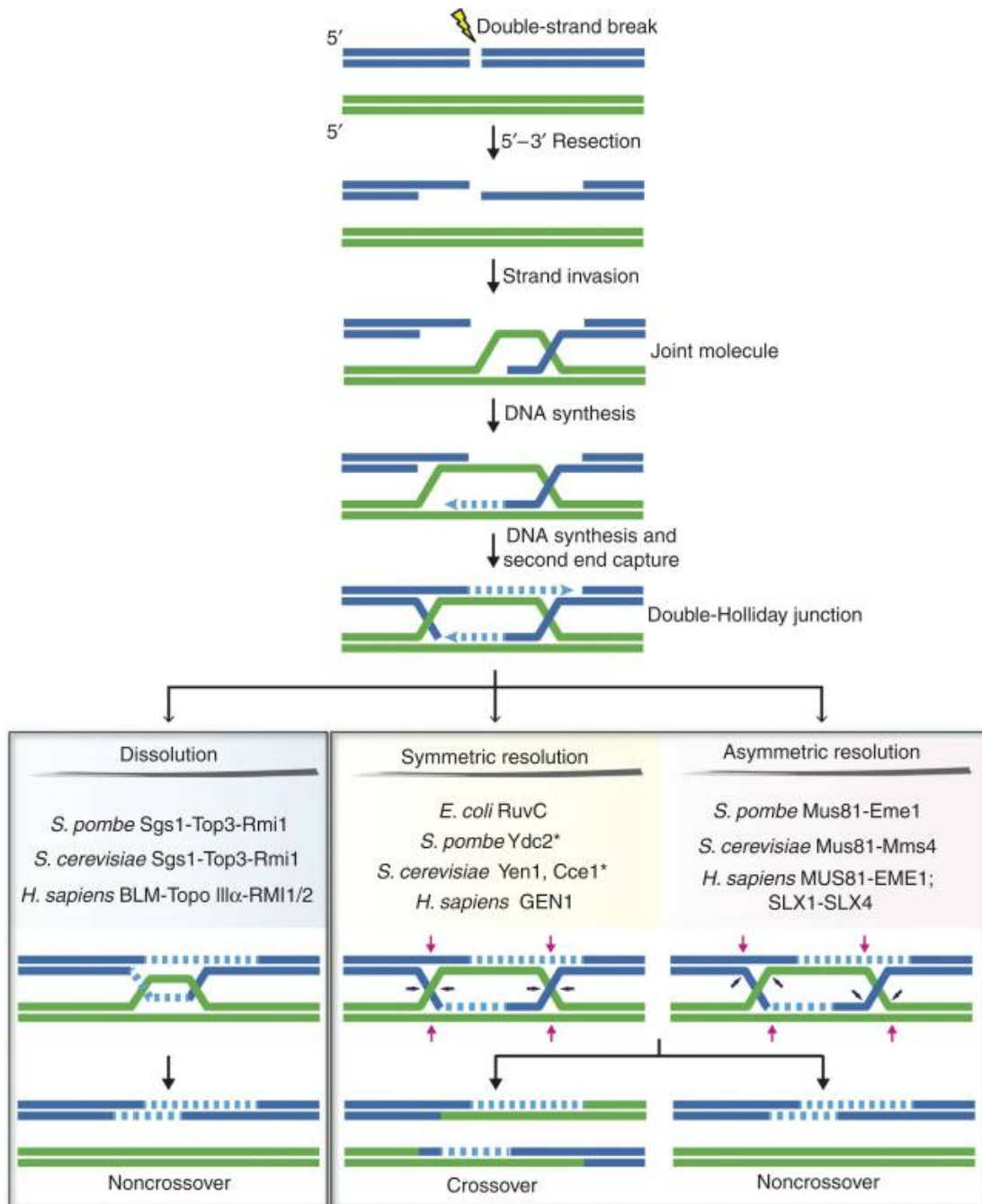


Figure 11 : Résolution des jonctions de Holliday dans différentes voies (Wyatt and West 2014)

B. Formation du nucléofilament actif humain : RAD51 et ses partenaires

1) RAD51 facteur clé de la recombinaison homologue

Rad51 peut être considérée comme la protéine la plus importante du mécanisme de RH. L'identification de Rad51 fait suite aux travaux menés sur RecA, recombinaison bactérienne.

Rad51 est la recombinase intervenant dans la RH des eucaryotes et a notamment été isolée via des études biochimiques et génétiques réalisées chez *S. cerevisiae*. Il s'agit d'une protéine hautement conservée chez les eucaryotes, partageant des homologies structurales (30%) et fonctionnelles avec son homologue bactérienne RecA (Baumann and West 1998). Cette protéine hexamérique comporte un domaine capable de lier et hydrolyser l'ATP, ainsi qu'un domaine de liaison à l'ADN (figure 12A). Rad51 intervient dans chacune des trois étapes de la RH. La formation du filament Rad51 se fait en deux étapes : la nucléation de quelques monomères sur l'ADN suivie de l'étape d'élongation par polymérisation coopérative. Il y a alors formation d'un filament hélicoïdal constitué de six monomères par tour d'hélice avec un pas de 130 Å, soit un monomère lié à trois nucléotides (Conway et al. 2004). Au sein de cette structure filamenteuse l'ADN est étiré d'environ 50% par rapport à sa conformation en double hélice, ce qui est nécessaire à une recherche d'homologie rapide et efficace. Cette étape nécessite la fixation d'une molécule d'ATP. Malgré le fait que Rad51 soit capable d'hydrolyser l'ATP, ceci n'est pas nécessaire à l'assemblage du filament présynaptique mais contribue à la dissociation de Rad51. Des études en cryo-microscopie électronique (Cryo-MET) ont permis de préciser les caractéristiques structurales des nucléofilaments RAD51 (figure 12) et de leurs activités de recherche d'homologie et d'échange de brin (Xu J et al. 2017; Ito et al. 2020). Dans l'ensemble, la conformation et l'interaction entre les monomères de RAD51 sont similaires entre le filament présynaptique et post-synaptique, c'est-à-dire, assemblé sur un ADNsb ou un ADNdb respectivement. En concordance avec l'homologie de séquence entre les différentes recombinases, la structure de filament actif de RAD51 est similaire à ce qui a été décrit précédemment chez Rad51 de levure et RadA chez les archées (Wu Y et al. 2004; Conway et al. 2004). Les monomères de RAD51 s'assemblent sous forme d'hélice via trois interfaces : (1) une molécule d'ATP qui se trouvent entre 2 motifs de Walker A de deux RAD51 adjacentes, (2) un court brin β (résidues 85-GFTT-88), (3) le résidu Y54 situé dans le domaine N-ter et le résidu F195 du domaine ATPase d'un monomère RAD51 adjacent.

Dans le filament présynaptique, un monomère de RAD51 se lie à trois nucléotides et l'ADNsb est étiré d'un facteur 1,5 fois par rapport à l'ADNdb de forme B. Mais en fait l'étirement n'est pas uniforme, il résulte d'un espace entre chaque monomère de RAD51 adjacents et donc d'un étirement entre chaque triplet de nucléotides (figure 12D) (appelé espace/étirement inter-triplet). Chaque triplet de nucléotides liés par RAD51 conserve la conformation de type B. 2 sites de liaison de RAD51 à l'ADN ont été identifiés, les sites I et II. Le site I se lie à l'ADNsb pour former le filament présynaptique, tandis que le site II permet la capture de l'ADNdb donneur au cours de la recherche d'homologie. Ainsi, il est proposé que la recherche d'homologie implique le site II tandis que le brin complémentaire de l'ADNdb donneur est incorporé dans le site I pour former le nouvel hétéroduplex (Kowalczykowski 2015a; De Vlaminck et al. 2012). Dans le site I, deux domaines sont impliqués et jouent un rôle primordial dans l'échange de brin, il s'agit de L1 (L pour Loop) et L2. En L2, V273 s'insère dans les espaces inter-triplets de l'ADNsb, stabilisant ainsi l'allongement asymétrique de l'ADN. V273 s'insère également dans les espaces inter-triplets de l'ADNdb, suggérant que L2 stabilise le produit (l'hétéroduplex) pendant la réaction d'échange de brins. En outre, R235 de L1 s'insère dans les espaces inter-triplets et interagit avec le squelette phosphate d'un brin de l'ADNdb (figure 12C). Il a été proposé que le filament présynaptique entre en contact de

manière transitoire et non séquentielle avec l'ADNdb donneur, sans nécessité d'homologie via le site II pour former un complexe synaptique à trois brins. Si une homologie suffisante est trouvée, le brin complémentaire de l'ADNdb donneur est transféré au brin du filament présynaptique, pour former l'hétéroduplex. Une étude récente utilisant un système de FRET (transfert d'énergie entre molécules fluorescentes) a permis de tester des mutations ponctuelles de Rad51 de *S. Pombe* au niveau de résidus conservés dans les domaines L1, L2 et dans le site II de liaison à l'ADN (correspondants aux mutations R235A, V273A et R303A/K313A de RAD51 humaine, respectivement) (Ito et al. 2020). Un modèle d'échange de brins a été proposé impliquant la formation de deux intermédiaires distincts, les complexes synaptiques à trois brins C1 et C2 : C1 contient l'ADNdb intact du donneur, tandis que dans C2, l'hétéroduplex est nouvellement formé. L1 semble être impliquée dans la formation de C1, tandis que L2 assure la transition C1-C2, produisant ainsi l'hétéroduplex. Le site II est impliqué à la fois dans la formation du filament RAD51, ainsi que dans l'incorporation de l'ADNdb du donneur. C'est d'ailleurs au niveau de ce site II que les 3 résidus conservés R130, R303 et K313 ont été identifiés comme étant impliqués dans 'l'activité enzymatique' ou d'échange de brins de RAD51, mais pas dans la formation du nucléofilament. Les mutations simultanées de ces 3 résidus sont connues sous le nom de mutant II3A. Ce mutant est intéressant car il permet de dissocier les fonctions de RAD51 de protection de la fourche contre la résection (non affectée dans ce mutant) d'une part, et d'échange de brin d'autre part (Mason et al. 2019).

Pour finir, chez la levure, un motif acide conservé important pour l'interaction avec divers partenaires (Rad52, Rad54 et Rad55-57) a été identifié et joue à lui seul un rôle crucial pour faciliter l'interaction avec les facteurs auxiliaires, essentiels pour la RH. Chez l'Homme il s'agit des deux résidus D184 D187 (Afshar et al. 2021).

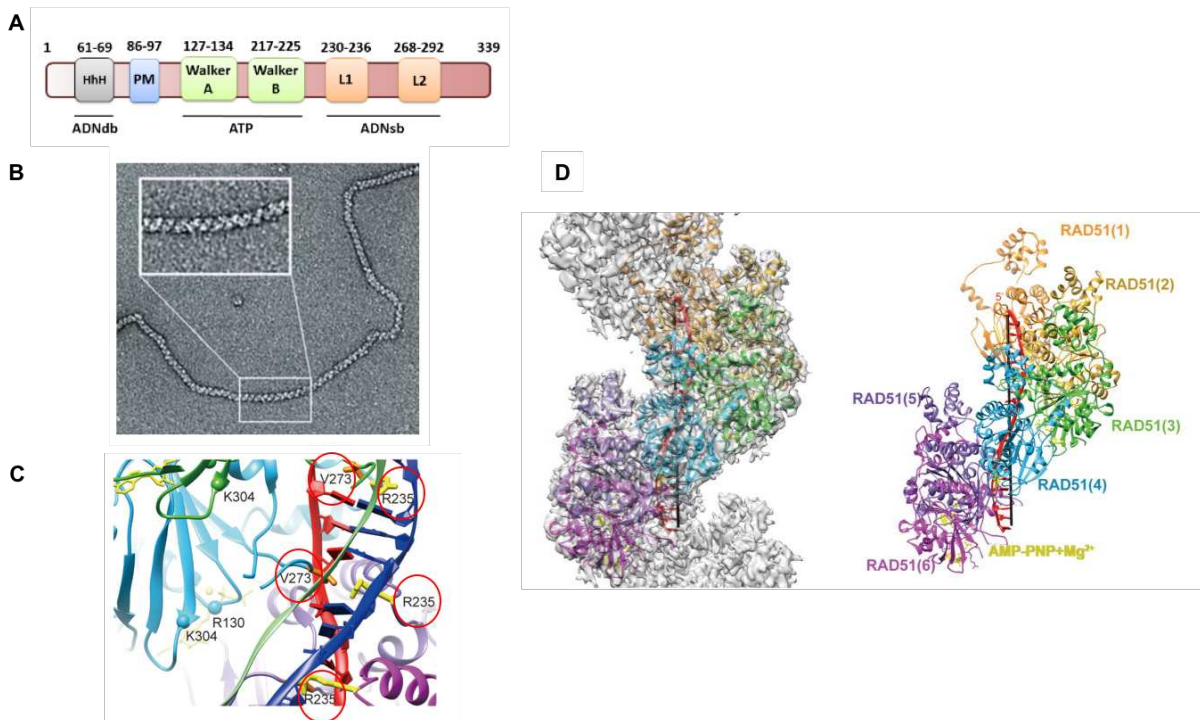


Figure 12 : Structure du filament présynaptique RAD51 (Xu J et al. 2017) :

(A) Domaines de liaisons de RAD51 et position des motifs Walker, **(B)** Structure du filament RAD51 en coloration négative en MET (Baumann and West 1998), **(C)** Les résidus entourés en rouge sont impliqués dans la capture et la stabilisation de l'ADNdb, **(D)** Structure du filament RAD51 en CryoEM, les différentes couleurs permettent de distinguer les différents monomères de RAD51 (Xu J et al. 2017).

2) RPA

RPA est une protéine SSB avec une forte affinité pour l'ADNsb (K_d de 10^{-10} M) (Patrick Sung and Klein 2006; Wold 1997) impliquée dans toutes les voies du métabolisme de l'ADN (Wold 1997). Au cours de la réparation des CDB, elle joue plusieurs rôles comme protéger l'ADNsb en empêchant sa dégradation par les nucléases, supprimer les structures secondaires de l'ADNsb (Venkitaraman 2001) et coordonner le recrutement et l'assemblage d'autres protéines au niveau de l'ADNsb (Dubrana et al. 2007; Choi et al. 2010). Si l'on parle de la protéine RPA, il s'agit en fait d'un hétérotrimère composé des trois sous-unités RPA70, RPA32 et RPA14 (figure 13) ayant six domaines de liaison à l'ADN (OB-fold domains) (Flynn RI and L 2010).

Quatre de ceux-ci (70A, 70B, 70C, 32D) agissent comme des domaines de liaison à l'ADNsb (figure 1A). RPA32D, RPA70C et RPA14 aident à assembler le trimère tandis que RPA70N agit comme un domaine d'interaction entre protéiques. En plus de ces domaines d'interaction à l'ADN, la partie C-terminal de RPA32 (RPA32C) forme un domaine en hélice qui est impliqué dans la médiation des interactions protéine-protéine. RPA interagit et forme un complexe stable avec 28-30 nucléotides d'ADNsb (Kim C, Bf, and Ms 1994). Deux des quatre domaines de liaison à l'ADN 70A et 70B agissent comme une seule unité et se lient à 8-10 nucléotides (Arunkumar Ai et al. 2003), alors que les deux autres domaines de liaison à l'ADN, RPA70C et RPA32D, engagent l'ADNsb avec des affinités inférieures (Bochkareva E et al. 2002). Au moins 20 nucléotides sont nécessaires pour occuper tous les domaines de liaison. Bien que très affine, l'interaction de RPA avec l'ADNsb est très dynamique et ce, grâce à l'architecture de son domaine modulaire (B et al. 2014). RPA peut diffuser le long de l'ADNsb, conduisant à l'ouverture des structures secondaires, allant même jusqu'à déstabiliser de courtes régions d'ADNdb (Nguyen B et al. 2014; Chen R et al. 2016).

La liaison de RPA à l'ADNsb est polaire, dans le sens 5'-3', ce qui facilite l'assemblage de certains complexes protéiques de réparation (Wl et al. 1998). RPA interagit avec un grand nombre de protéines de réplication et de réparation avec une forme de compétition entre elles puisque beaucoup occupent les mêmes surfaces d'interaction RPA70N et RPA32C (figure 13). Par exemple, le domaine 70N interagit à la fois avec la sous-unité ATRIP de ATR (Zou L and Sj 2003; Ball HI, Js, and D 2005) et avec RAD9, MRE11, p53, PRIMPOL et ETAA1 (Xu X et al. 2008; Bochkareva E et al. 2005; Guillian Ta et al. 2017; Bass Te et al. 2016). Le domaine 32C se lie à plusieurs protéines dont ETAA1, SMARCAL / HARP, UNG2, XPA et RAD52 (Bass Te et al. 2016; Bansbach Ce et al. 2009; Ciccio A et al. 2009; Mer G et al. 2000). Ces interactions sont indépendantes de la liaison à l'ADN et sont de faible affinité (de l'ordre du micromolaire) et donc transitoires. Ainsi, les protéines RPA, solubles ou liées à l'ADN, interagissent et échangent constamment de partenaires de liaison. Des assemblages plus importants de

protéines peuvent se former sur l'ADN dans certaines circonstances pour stabiliser des complexes spécifiques. C'est d'ailleurs cet aspect dynamique qui permet à RPA de remplir de multiples fonctions au niveau des fourches de réplication, notamment pour éviter l'effondrement de la fourche (Toledo Li et al. 2013) : en supprimant les structures secondaires sur le brin retardé (Sugiyama T, Jh, and Sc 1998), en favorisant l'activité de réamorçage (Melendy T and B 1993) et en tant que plate-forme d'assemblage de protéines de checkpoint ou de nombreuses autres protéines de réparation de la fourche (Saldivar Jc, D, and Ka 2017).

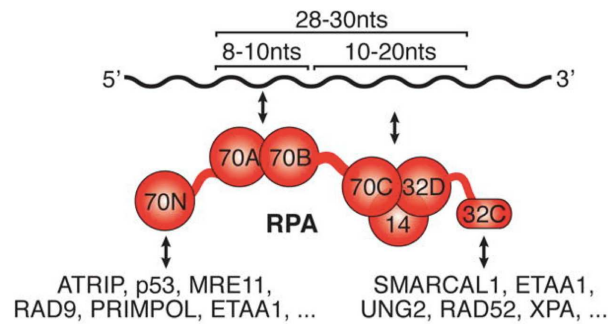


Figure 13 : Représentation des sous-unités de RPA (Bhat Kp and D 2018)

3) Les protéines médiatrices de la RH

a) Généralités : les différentes catégories de protéine RMP

Cette fonction médiatrice a d'abord été identifiée chez les bactéries et la levure, comme participant au bon fonctionnement de la RH au travers la régulation positive du nucléofilament présynaptique. Parmi ces protéines, chez la levure, Rad52 facilite l'installation du nucléofilament Rad51 : elle recrute Rad51 sur l'ADNsb recouvert de RPA et lui permet de former des points de nucléation. Rad52 s'oligomérisise en formant des structures en anneaux, capables d'interagir avec Rad51 et possédant des sites de liaisons à l'ADN (A. Z. Stasiak et al. 2000) (Figure 14). Des travaux effectués sur cette interaction ont permis de proposer un mécanisme dans lequel la formation du complexe Rad52-Rad51 permet en fait de déplacer les protéines RPA de l'ADNsb (Patrick Sung and Klein 2006). Cependant, d'autres études suggèrent que le déplacement de RPA n'est pas dû à son interaction directe avec le complexe Rad52-Rad51 mais plutôt à sa diffusion le long de l'ADNsb et à la polymérisation et l'élongation du nucléofilament Rad51 (Krejci et al. 2012).

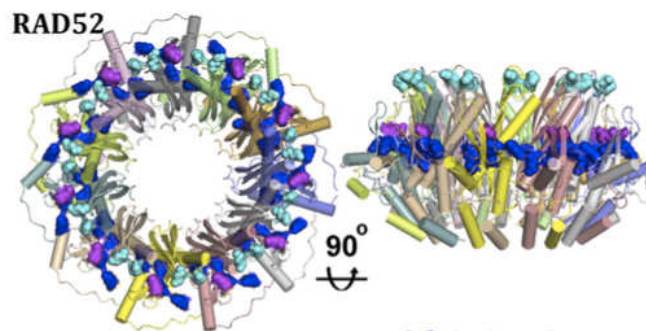


Figure 14 : Structure de Rad52 (Korolev 2017): Représentation « cartoon ». Les chaînes latérales se liant à l'ADN sont représentées en bleu, magenta et cyan. Les résidus Cyan sont ceux impliqués dans la liaison de la seconde molécule d'ADNsb dans un complexe tertiaire de Rad52 avec l'ADNsb et l'ADNdb.

Chez la levure, les paralogues de Rad51, Rad55 et Rad57 jouent également un rôle médiateur. Rad55 et Rad57 forment un hétérodimère et Rad55 interagit directement avec Rad51 (Hays, Firmenich, and Berg 1995). Tout comme Rad51, l'hétérodimère Rad55-57 possède une activité ATPase, et peut se lier à l'ADN. De plus, il favorise la réaction d'échange de brins catalysée par Rad51 *in vitro*. En interagissant avec Rad51, Rad55-57 favorise son recrutement sur l'ADNsb couvert de RPA et peut également former un filament mixte avec Rad51 aboutissant à la formation d'un nucléofilament plus résistant à l'activité de l'antirecombinase Srs2 (Krejci et al. 2012). Cependant, dans un récent papier, l'équipe d'E Greene montre un mécanisme dynamique dans lequel Rad55-57 contrecarre l'activité antirecombinase de Srs2 en favorisant le rechargement de Rad51 immédiatement après le passage de la translocase pour reformer des filaments (Roy et al. 2021).

Pour finir, le complexe Shu, composé de Shu1, Psy3, SH2 et Csm2 semble également jouer un rôle en tant que médiateur de la RH et du filament Rad51 (Krejci et al. 2012). Shu interagit avec Rad55-7 via Csm2 (Xu et al. 2013).

Cette fonction de protéines RMP est conservée chez les mammifères (figure 15). Et pourtant, une délétion du gène *RAD52* n'a montré aucun phénotype fort quant à la réparation de l'ADN ou à la RH. Cette même délétion est synthétiquement létale avec des mutations dans plusieurs autres gènes impliqués dans la formation du filament RAD51, y compris BRCA1 et BRCA2. Ces nouvelles découvertes indiquent une organisation plus complexe de la machinerie de RH chez les mammifères, avec un rôle important de RAD52 dans la RH lorsque BRCA2 n'est pas disponible (Rijkers et al. 1998; B. H. Lok et al. 2013b; Benjamin H. Lok and Powell 2012; Feng et al. 2011b).

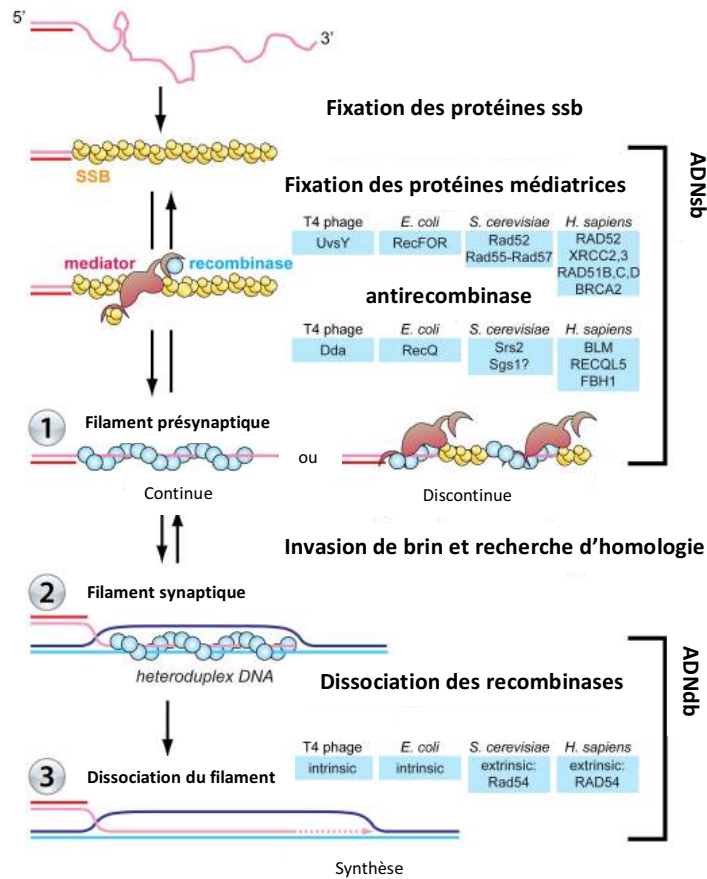


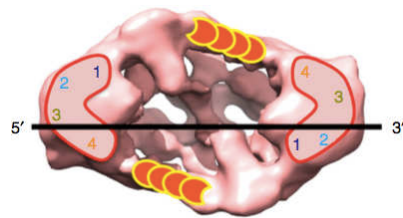
Figure 15 : Les protéines médiatrices de la RH (J. Liu, Ehmsen, et al. 2011)

b) BRCA2

L'équivalent du médiateur du filament RAD51 chez l'Homme est BRCA2. Le gène *BRCA2* fut le second gène de susceptibilité au cancer du sein identifié : une mutation de *BRCA2* confère un risque de 55% de développer un cancer du sein et 16,5% de développer un cancer des ovaires avant l'âge de 70 ans (Mavaddat et al. 2013). Le transport et la localisation de RAD51 dans le noyau cellulaire sont altérés dans les cellules cancéreuses portant une mutation de *BRCA2* (Venkitaraman 2001). D'autre part, une mutation de *BRCA2* entraîne une instabilité au niveau des fourches de réplication et des aberrations chromosomiques, mettant en évidence son rôle dans la RH. *BRCA2* interagit avec RAD51 au travers les motif « BRC », séquences consensus, et également via son domaine C-terminal « TR2 ». *BRCA2* possède 8 motifs BRC. Les motifs TR2 et BRC agissent de façon coordonnée pour interagir avec RAD51 et pour garantir l'assemblage du filament nucléoprotéique. D'un côté, les motifs BRC effectuent des dépôts de 6 à 8 monomères de RAD51 sur l'ADNsb couvert de RPA tandis que le domaine TR2 recrute un oligomère de RAD51 afin de permettre sa polymérisation et la propagation du filament le long de l'ADN (Figure 16) (Shahid et al. 2014). *In vitro*, *BRCA2* joue le rôle de médiateur en catalysant l'assemblage du filament RAD51 sur l'ADNsb recouvert par RPA sans pour autant interagir avec RPA (Jensen, Carreira, and Kowalczykowski 2010a; J. Liu et al.

2010a). Le modèle proposé est que BRCA2 crée un point de nucléation de RAD51 sur l'ADNsb et déplace les protéines RPA de l'ADNsb. Ainsi, la protéine humaine BRCA2 est un important régulateur de RAD51 et il a été montré qu'une surexpression des motifs BRC entraîne une hypersensibilité aux rayons gamma et une incapacité à former des foyers RAD51, suggérant une réduction de l'interaction BRCA2-RAD51 (C.-F. Chen et al. 1999). D'un autre côté, il est proposé que la partie C-ter de BRCA2 s'associe avec le nucléofilament et contrecarre cet effet négatif des domaines BRC (Esashi F et al. 2007). BRCA2 est phosphorylée dans le domaine C-ter en l'absence de lésions d'ADN, sa déphosphorylation en présence de CDB conduit au recrutement de RAD51 à la chromatine et à la formation de filaments actifs dans la RH (Esashi F et al. 2007). Les fonctions de ces différents domaines de la protéine permettent de rendre compte des phénotypes associés aux mutations du gène *BRCA2*. En effet, le cancer des ovaires lié à une forte instabilité génétique est souvent associé à l'expression d'une protéine BRCA2 tronquée dans sa partie C-ter, entraînant un défaut de régulation du filament RAD51. Des mutations dans les motifs BRC sont responsables de fortes prédispositions à certains types de cancer.

A



B

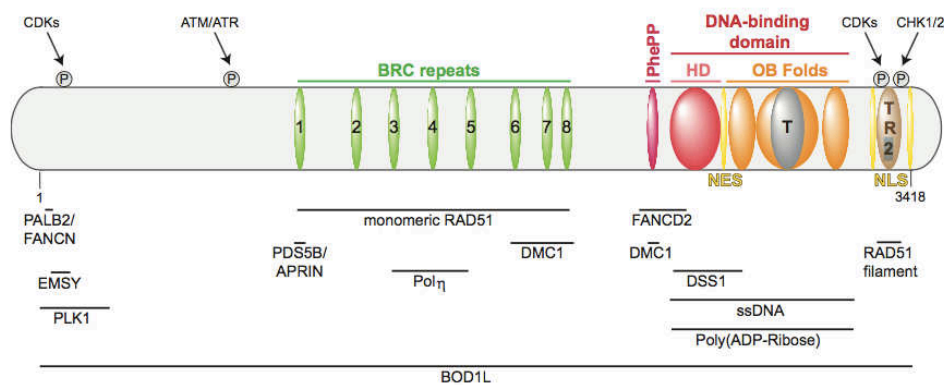


Figure 16 : Structure de BRCA2 : (A) Représentation 3D de BRCA2, les motifs orange représentent les monomères de RAD51 fixés sur les motifs de répétitions BRC et les chiffres 1 à 4, les domaines de liaisons à l'ADN (Shahid et al. 2014), (B) Domaines structuraux et partenaires d'interactions de BRCA2 (Fradet-Turcotte et al. 2016)

Les répétitions BRC ne sont pas identiques dans leur séquence et n'ont pas la même fonction, elles se divisent en deux groupes: d'une part, BRC 1, 2, 3 et 4 qui se lient étroitement

à RAD51, d'autre part BRC 5, 6, 7 et 8 qui se lient de préférence au filament RAD51 (Carreira et al. 2009; Carreira and Kowalczykowski 2011). Les répétitions BRC 1-4 bloquent l'hydrolyse de l'ATP par RAD51, ce qui maintient RAD51 dans sa forme liée à l'ATP actif et inhibe la dissociation de RAD51 de l'ADNsb. Cette répartition du travail suggère un mécanisme dans lequel une protéine BRCA2 délivre quatre molécules de RAD51 à l'ADNsb pour former un point de nucléation et initier l'assemblage du filament RAD51, alors stabilisé sur l'ADN. BRCA2 purifiée existe principalement sous forme de dimères qui se lient à RAD51 et à l'ADNsb sans se dissocier. BRCA2 a d'ailleurs une affinité élevée pour l'ADNsb et une affinité réduite pour l'ADNdb (Thorslund et al. 2010).

La reconstruction 3D de la structure de BRCA2 (full-length) obtenue en MET en coloration négative montre qu'un dimère de BRCA2 recrute deux ensembles de molécules RAD51 disposées dans des orientations opposées (Shahid et al. 2014). Il est également montré que BRCA2 augmente la fréquence des points de nucléations de RAD51, sans pour autant affecter la longueur des filaments. Son rôle serait plutôt de favoriser la croissance unidirectionnelle des filaments, dans le sens 3' → 5' à partir de chaque site de nucléation.

Le recrutement de BRCA2 nécessite l'intervention de PALB2, une protéine identifiée comme partenaire nucléaire de BRCA2. L'intervention de cette protéine est primordiale pour les fonctions de BRCA2 corrélées à la réparation de l'ADN et à l'activation du checkpoint de réparation. En effet, PALB2 contrôle la localisation de BRCA2 à la chromatine. PALB2 interagit avec BRCA1 et BRCA2 (Buisson et al. 2010; Dray et al. 2010). Elle pourrait donc jouer également un rôle important au cours de la RH.

c) RAD52

I. Rôle de RAD52 dans la voie SSA

Comme on l'a vu au chapitre I-2, la formation des extrémités simple brin lors de la résection est une étape décisive quant au choix de la voie de réparation, entre RH et NHEJ d'une part, mais également entre RH et SSA, en fonction du contexte cellulaire (Stark Jm et al. 2004). L'activation du SSA nécessite une résection assez longue pour révéler les séquences répétées et est dépendante de RAD52. La protéine RAD52 humaine, comme celle de levure, est capable de catalyser le SSA par appariement de deux ADNsb complémentaires recouverts par RPA (Jensen, Carreira, and Kowalczykowski 2010a). 53BP1 active la voie NHEJ et supprime la résection médiée par BRCA1. Il a été montré que l'absence de 53BP1 conduit à une résection excessive des CDB en phase G2/S, ce qui modifie la balance et entraîne le passage d'une réparation par RH, sans erreur à une réparation par SSA, mutagène. RAD52 est essentielle dans les cellules dépourvues de BRCA1 et 53BP1 pour réparer les CDB (Ochs F et al. 2016). Dans le SSA, la résection 5' → 3' des extrémités expose environ 25 nt d'ADNsb. RAD52 interagit avec ces extrémités sb couvertes de RPA et aligne les régions complémentaires. Une fois l'homologie finale obtenue, le complexe endonucléasique ERCC1/XPF, en coopération avec RAD52, coupe les extrémités 3' sortantes (Flap), puis la ligase lie les brins. Le SSA aboutit souvent à des délétions ou à des translocations (Sallmyr and Tomkinson 2018).

II. Rôle de RAD52 dans la RH

Les conséquences phénotypiques de la suppression de RAD52 chez l'Homme sont réduites, elles sont révélées dans les cellules déficientes en BRCA2 (Feng et al. 2011b). RAD52 humaine est incapable de promouvoir la formation du filament RAD51 sur l'ADNsb et n'est donc pas une protéine médiatrice du filament (Jensen, Carreira, and Kowalczykowski 2010a). Cependant, il a été montré qu'en l'absence de RPA, RAD52 peut stimuler l'échange de brin d'ADN catalysé par RAD51 lorsque la concentration de RAD51 est faible (Benson, Baumann, and West 1998). RAD52, par son activité d'hybridation de brins complémentaires, est suspectée d'être impliquée dans l'assemblage de la D-loop. Les souris *RAD52* $-/-$ sont viables, fertiles et ne présentent qu'une légère diminution de l'activité de la RH (Rijkers et al. 1998). Cependant, la surexpression de RAD52 dans les cellules de mammifères améliore leur résistance aux rayonnements ionisants, suggérant un rôle de RAD52 dans la réponse aux dommages à l'ADN par RH (Park Ms 1995). En l'absence de BRCA1 ou BRCA2 fonctionnel, la viabilité cellulaire est dépendante de RAD52, ainsi, dans les cellules de mammifères, la RH pourrait fonctionner avec au moins deux sous-voies alternatives : l'une dépendante de BRCA1/2 (probablement le mécanisme canonique), et l'autre dépendante de RAD52 (B. H. Lok et al. 2013b).

III. Rôle de RAD52 dans le BIR.

Il a été montré que RAD52 joue un rôle important dans les processus de réparation associés au stress de réplication et, contrairement à la RH, son implication dans ces voies semble être indépendante de RAD51 et de BRCA2 (Murfun et al. 2013; Verma et al. 2019). Aux fourches bloquées, RAD52 maintient l'équilibre de la fourche en empêchant une réversion excessive de cette dernière et en la stabilisant. Il est proposé qu'elle convertisse la fourche bloquée en une conformation compacte, la rendant moins accessible aux acteurs de la réversion de fourche (Malacaria E et al. 2019). Dans un contexte déficient en CHK1, RAD52 peut convertir des fourches révertées en une structure qui est clivée par MUS81 et réparée par le mécanisme BIR (réplication induite par cassure) (Murfun et al. 2013). Semblable à la RH, le BIR est initié par la résection des CDB, la formation du filament RAD51 et l'invasion de brin, mais l'invasion peut être suivie d'une migration de la D-loop qui se traduit par une synthèse asynchrone du brin principal et du brin retardé (Sakofsky and Malkova 2017). Le BIR est engagé lorsqu'une seule extrémité de cassure est disponible, c'est probablement la voie utilisée préférentiellement pour réparer les CDB générées au niveau des fourches de réplication. Chez la levure mais aussi dans les cellules humaines, le BIR requiert RAD51 ou RAD52 (Sakofsky and Malkova 2017), cependant, RAD52 humaine s'est récemment révélée critique pour la réparation par BIR des fourches effondrées dans les cellules déficientes en BRCA2 (Lemaçon D et al. 2017). Ainsi, RAD52 serait capable de promouvoir le redémarrage des fourches de réplication effondrées.

IV. RAD52 et R-loop

Une R-loop est une structure à trois brins formée lorsqu'un brin d'ARN envahit un ADNdb, formant un hétéroduplex hybride ADN-ARN et déplaçant l'un des brins d'ADN. Physiologiquement, cette structure est le plus souvent formée lors de la transcription lorsque l'ARN polymérase II déroule l'ADNdb, déplaçant le brin codant, l'ARN néosynthétisé formant un hétéroduplex ADN-ARN avec le brin matrice homologue (Aguilera and Gómez-González 2017; Crossley, Bocek, and Cimprich 2019).

Les R-loop sont généralement stabilisées au niveau de séquences avec des motifs répétés et/ou un taux de GC élevé, car le brin d'ADN déplacé est capable de former des structures secondaires telles que les G-quadruplexes (Aguilera and García-Muse 2012).

Chez *S. pombe*, il a été montré que la formation et la résolution des R-loop au niveau des CDB sont nécessaires pour une réparation efficace par RH. Il a également été démontré que la transcription influence directement le choix de la voie de réparation des CDB chez l'Homme, comme le montrent les données de ChIP-seq indiquant que les gènes transcriptionnellement actifs recrutent préférentiellement les facteurs de la RH par rapport aux gènes non transcrits (Aymard et al. 2014). Ces études indiquent que les R-loop peuvent jouer un rôle sur le recrutement des protéines de la réparation. Une nouvelle voie de réparation nommée Recombinaison Homologue Couplée à la Transcription (RH-CT) a été identifiée en montrant que les R-loop formées lors de la transcription entraîne une cascade de signalisation (Teng et al. 2018) : les R-loop se lient d'abord à la protéine du syndrome de Cockayne B (CSB), qui recrute ensuite RAD52, puis RAD51, définissant ainsi le RH-CT comme un mécanisme RAD52-dépendant et indépendant de BRCA1/BRCA2 (Teng et al. 2018). Cette étude ayant été réalisée dans des neurones ou dans des cellules U2OS non proliférantes où l'une des chromatides sœurs n'est pas disponible, l'hypothèse formulée est la réparation s'effectue par un mécanisme similaire à la RH en utilisant l'ARN comme modèle, ainsi la RH-CT pourrait être un mécanisme de réparation en G0/G1 (figure 1) (Wei et al. 2015; Teng et al. 2018). Cependant, on ne sait pas si l'ARN est directement utilisé comme modèle ou simplement comme plateforme de recrutement des protéines. Une voie similaire, appelée réparation par RH associée à la transcription (TA-HRR) a été mise en évidence, impliquant également des R-loop et RAD52 dans la réparation des CDB dans les gènes activement transcrits. Dans ce processus, RAD52 est nécessaire pour le recrutement de XPG, qui clive les R-loop formant un substrat d'ADN possédant une extrémité 3', similaire à une extrémité néoformée par résection, qui peut ensuite être traitée par la RH (Yasuhara et al. 2018b). (Yasuhara et al. 2018a). Il est proposé que RAD52 recrute les facteurs de la RH, mais il est également possible que ce soit la structure laissée par le clivage XPG qui soit reconnue par la machinerie de la RH. Contrairement à la voie RH-CT, qui est active en phase G0/G1 et indépendante de BRCA, la voie TA-HRR impliquerait BRCA1 et se produirait en S/G2. Alors que la RH-CT et le TA-HRR démontrent l'implication de RAD52 aux R-loop, les preuves qu'elle s'y fixe spécifiquement proviennent d'études *in vitro* (Wei et al. 2015; Yasuhara et al. 2018b). Étant donné que RAD52 a une affinité pour une variété de substrats d'acide nucléique, elle pourrait interagir avec la R-loop de l'une des trois manières suivantes : au niveau du brin ADN 3' déplacé, de l'ARN néosynthétisé ou de l'hybride ARN/ADN. En outre, en raison de son

rôle de partenaire de RAD51, il est possible que RAD52 favorise la formation de R-loop au niveau des CDB par échange de brin médié par RAD51.

d) *Les paralogues de RAD51*

Les paralogues de RAD51 (RAD51B, RAD51C, RAD51D, XRCC2, XRCC3 et SWSAP1) ont été identifiés pour la première fois il y a 30 ans en recherchant dans les banques de séquences d'ADNc, des gènes partageant des similarités de séquence avec RAD51 (Jones, Cox, and Thacker 1987) (Albala et al. 1997). Par la suite, il a été montré que la mutation de ces gènes entraînait une instabilité génétique, une hypersensibilité aux agents endommageant l'ADN et des défauts de recombinaison, phénotypes supprimés par la surexpression de RAD51, suggérant fortement que ces paralogues soient des médiateurs de RAD51 et du nucléofilament (Masson, Tarsounas, et al. 2001; Sigurdsson et al. 2001). Comme *BRCA2*, *RAD51B*, *RAD51C* et *RAD51D* sont des gènes suppresseurs de tumeurs, liés au cancer du sein et de l'ovaire (Meindl et al. 2010; Somyajit, Subramanya, and Nagaraju 2010; Loveday et al. 2011). De plus, les paralogues de RAD51 sont associés à l'anémie de Fanconi (*RAD51C* est également nommé *FANCO*, et *XRCC2*, *FANCU*), pathologie également associée à une prédisposition au cancer (Moldovan and D'Andrea 2009). Les modèles de souris dans lesquelles les cinq paralogues de RAD51 ont été délétés présentent une létalité embryonnaire (Hakem, de la Pompa, and Mak 1998).

Les protéines identifiées comme paralogues de RAD51 partagent une identité de séquence en acides aminés entre 20 et 30% avec elle, centrée en particulier autour des motifs de Walker A et B (Thacker 1999). La protéine SWSAP1 plus récemment identifiée est un cas particulier, plus divergent qui partage une homologie de séquence plus proche avec RadA (~ 24%), qui est également une recombinase et contient des motifs Walker A et B (T. Liu et al. 2011). Les paralogues de RAD51 s'assemblent en sous-complexes *in vivo* (Figure 17): l'hétérotétramère BCDX2 (*RAD51B*, *RAD51C*, *RAD51D* et *XRCC2*), et les hétérodimères CX3 (*RAD51C* et *XRCC3*), Shu (*SWSAP1* et *SWS1*) ou encore *RAD51B-RAD51C* et *RAD51D-XRCC2* (Masson, Tarsounas, et al. 2001). Différents complexes pourraient être recrutés pour favoriser la RH selon le contexte et la nature de la lésion, comme cela a été montré pour Shu (Godin et al. 2016; Abreu et al. 2018). Les modes d'actions des paralogues de RAD51 et la façon dont ils contribuent et régulent l'assemblage du filament RAD51 sont encore énigmatiques. Il est proposé qu'ils s'intercalent dans le filament, favorisent l'étape d'élongation du filament après la nucléation médiée par *BRCA2*, et qu'ils puissent former des filaments mixtes avec RAD51. D'ailleurs, DX2 et CX3 forment également des sortes de structures en filaments sur l'ADNsb, bien que ces structures soient différentes du filament RAD51 (Kurumizaka et al. 2002). Les paralogues de RAD51 pourraient également empêcher le désassemblage du filament RAD51, comme Rad55/57 chez la levure (T. Liu et al. 2011). Une étude sur *RAD51B-RAD51C* a prouvé sa capacité à atténuer l'inhibition imposée par RPA sur l'assemblage et la fonction du filament RAD51 (Masson, Tarsounas, et al. 2001). Il a également été proposé que les paralogues stabilisent et remodelent le filament pré-synaptique en coiffant l'extrémité 5' et ce, de façon dépendante de la liaison à l'ADN et non de l'hydrolyse de l'ATP (Taylor et al. 2015; 2016). *RAD51C* interagit directement avec *PALB2* qui agit comme une plateforme pour lier simultanément *RAD51*, *RAD51C* et *BRCA2* (Park et al. 2014). Comme évoqué précédemment,

PALB2 est un partenaire de BRCA2, nécessaire pour son recrutement aux sites de dommages à l'ADN (Xia et al. 2006). De façon intéressante, on observe une augmentation des foyers BRCA2 et RAD51 (et donc probablement de l'assemblage des nucléofilaments présynaptiques), associée à une diminution des foyers CX3/BCDX2 chez des mutants PALB2 dont l'interaction avec RAD51C est altérée. CX3 présente une affinité pour l'ADNsb indépendante de l'ATP et interagit également avec l'ADNdb et d'autres substrats ADN (Masson, Stasiak, et al. 2001; Kurumizaka et al. 2001). Le complexe RAD51D-XRCC2 interagit avec l'hélicase BLM, stimulant la résolution des jonctions de Holliday (Braybrooke et al. 2003). Les paralogues de RAD51 jouent également des rôles critiques sur les fourches de réplication endommagées (Somyajit et al. 2015). Pour finir, un rôle de SWSAP1 et son partenaire de liaison SWS1 dans la méiose a été mis en évidence (les souris knockout sont viables mais stériles), avec des défauts de recombinaison méiotique médiée par RAD51 par DMC1 (Abreu et al. 2018).

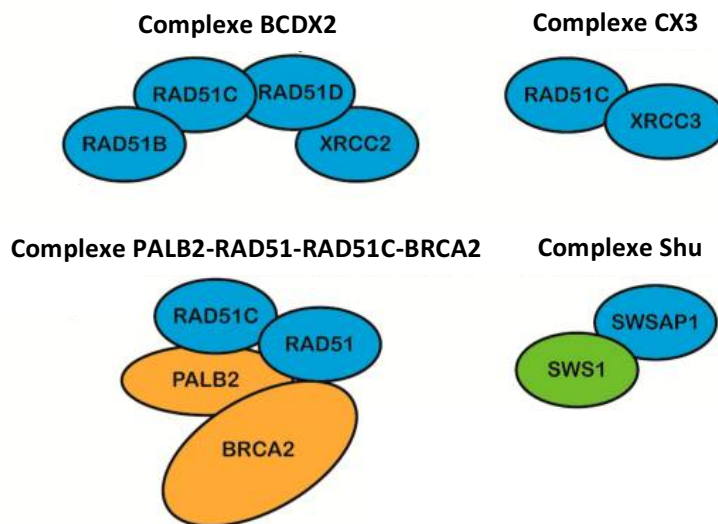


Figure 17 : Représentation des complexes formés par les paralogues de RAD51 (Sullivan and Bernstein 2018)

4) Les antirecombinases

Même si la RH assure des fonctions biologiques cruciales pour le bon développement de l'organisme, la régulation du mécanisme est essentielle pour empêcher les événements de RH inappropriés et la formation d'intermédiaires toxiques. Il a été montré qu'au cours d'événements de recombinaison mal contrôlés, des intermédiaires nucléoprotéiques dépendant de RAD51 pouvaient provoquer des réarrangements chromosomiques et, dans certains cas, causer la mort cellulaire. Des études menées sur des modèles eucaryotes comme *S. cerevisiae* ont notamment montré que la formation d'intermédiaires toxiques peut être à l'origine d'une activation prolongée des points de contrôle, suivie de l'arrêt du cycle cellulaire et de la mort cellulaire (Patrick Sung and Klein 2006). Il existe un premier niveau précoce de régulation de la RH, à l'étape de la formation du filament Rad51. Les recombinaisons sont des protéines capables de réguler négativement le nucléofilament présynaptique, en provoquant sa dissociation. Elles permettent également d'enlever RAD51 de l'ADNdb de l'hétéroduplex

pour permettre l'initiation de la synthèse. La D-loop est également sujette à régulation notamment pour promouvoir la voie SDSA. Ces différents mécanismes impliquent plusieurs types de protéines, en particulier des hélicases et des translocases. Chez les mammifères, un certain nombre d'antirecombinases ont été identifiées telles que des membres de la famille RecQ (BLM, WRN, et RECQL5) ou de la famille Srs2/UvrD (RTEL1, FBH1 et PARI) (Mankouri, Chu, and Hickson 2012; Moldovan et al. 2012b; Schwendener et al. 2010).

a) *PARI*

Notre laboratoire a mené plusieurs études sur l'antirecombinase Srs2 de levure (Veaute et al. 2003, 2; Dupaigne, Le Breton, et al. 2008, 2; Ma E et al. 2018). Srs2 est une hélicase, c'est à dire un moteur moléculaire capable d'ouvrir la double hélice d'ADN, possédant des homologies structurales et fonctionnelles avec l'hélicase bactérienne UvrD. Il a été montré que Srs2 utilise sa fonction de translocation c'est à dire de déplacement le long de l'ADNsb pour démanteler le nucléofilament Rad51 et ainsi inhiber très tôt le processus de RH (Veaute et al. 2003). Srs2 interagit avec Rad51, elle se fixe d'abord sur le filament Rad51 puis active l'hydrolyse de l'ATP entraînant la dissociation de Rad51 de l'ADNsb. Des études en molécule unique sur un rideau d'ADN ont montré que Srs2 transloque à une vitesse de ~140 nucléotides (nt)/secondes (s), correspondant à l'élimination de ~50 monomères Rad51/s, et qu'elle est capable de se déplacer sur des milliers de nucléotides avant de s'arrêter (Kaniecki et al. 2017). De plus, Srs2 exerce sa fonction d'anti-recombinase au niveau de la fourche de réplication en interagissant directement avec PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen, facteur de processivité de la polymérase réplivative). La protéine humaine PARI (pour PCNA-Associated Recombination Inhibitor) présente des homologies de séquences et de fonction avec Srs2, sa découverte fait d'ailleurs suites aux recherches d'un homologue de Srs2 chez l'homme (Krejci et al. 2012). Tout comme Srs2, PARI possède un domaine UvrD et peut interagir avec PCNA grâce à un domaine connu sous le nom de PIP-box ainsi qu'avec SUMO via son domaine SIM (Sumo Interacting Motif). Une inactivation de PARI entraîne un phénotype hyper recombinant, mettant en évidence son rôle dans la régulation de la RH. Puis, des tests biochimiques ont mis en évidence son activité anti-recombinase (Moldovan et al. 2012a). PARI contient un domaine d'UvrD, mais n'a pas les motifs Walker A et B et n'hydrolyse pas l'ATP, elle n'a donc pas d'activité translocase. PARI interagit de manière stoechiométrique avec RAD51 et entraîne le désassemblage des filaments RAD51 lorsqu'ils hydrolysent l'ATP. On ne sait pas si PARI déstabilise le filament ou bloque son réassemblage après dissociation. Pour finir, un rôle de PARI au cours de la réplication a été caractérisé, notamment en réponse à un stress répliatif, dans lequel elle agit précocement dans le remodelage des fourches de réplication bloquées (Mochizuki et al. 2017). PARI est donc un modulateur physiologique du filament RAD51.

b) *BLM, RTEL, RECQL5, FANCI, FBH1...*

Les hélicases sont présentes dans toutes les étapes du processus de RH, de la résection à la résolution des dHJ, en passant par la formation et la prise en charge de la D-loop (figure 18). Les hélicases jouent également un rôle important dans la régulation du nucléofilament

RAD51, chez l'Homme, il existe un certain nombre d'hélicases jouant ce rôle d'antirecombinase identifiées dans différents contextes. BLM est une hélicase de la famille RECQ qui est capable de dissocier le nucléofilament RAD51 *in vitro*, cette activité jouant un rôle dans la régulation de la RH *in vivo* (Bugreev et al. 2007; Patel et al. 2017). En effet, la perte d'une protéine BLM fonctionnelle entraîne un phénotype hyper recombinogène, tout comme une déficience de l'autre hélicase de la même famille RECQL5, qui elle aussi a une activité de déplacement de RAD51 (Hu et al. 2007; Schwendener et al. 2010). L'hélicase de la Superfamille 2, FANCI (Fanconi Anemia Complementation group J), aussi est capable de dissocier les filaments RAD51 et ce, de façon dépendante de l'hydrolyse de l'ATP, elle inhibe également la réaction d'échange de brins *in vitro* (Sommers et al. 2009). La régulation négative de la RH par FBH1 (F-box DNA Helicase 1) a été montrée chez *S. pombe* (Lorenz et al. 2009; Osman et al. 2005), puis l'activité antirecombinase de FBH1 a été confirmée chez les vertébrés, y compris dans les cellules humaines (Fugger et al. 2009; Simandlova et al. 2013a). Comme pour le FANCI, sa capacité à déplacer le RAD51 implique son activité translocase le long de l'ADNsb, elle-même dépendante de l'hydrolyse de l'ATP. FBH1 participe également à un complexe SCF impliqué dans l'ubiquitylation de RAD51, ce qui conduit à la dissociation du filament (Chu et al. 2015).

RTEL1 (Regulator of telomerase Elongation Helicase 1) a été identifié pour la première fois à l'aide d'un crible génétique chez *C. elegans*. Les cellules humaines déficiente pour RTEL1 partagent un phénotype proche du mutant *srs2* de levure (hyper-recombinogène, hypersensible aux agents génotoxiques), définissant RTEL1 comme un autre homologue fonctionnel de *Srs2*. RTEL1 est également une hélicase et les mutations de RTEL1 sont associées un large éventail de maladies, dont certains gliomes. Bien que *Srs2* et RTEL1 partagent des similarités fonctionnelles, elles présentent une faible homologie de séquence et si RTEL1 inhibe la formation d'intermédiaires de recombinaison, aucun effet sur la stabilité des filaments RAD51 n'a été démontré (Barber et al. 2008).

D'autres protéines telles que HELQ et FIGL1 ont été attribuées à une fonction antirecombinase et de régulation précoce du recrutement de RAD51/DMC1, sans pour autant qu'une activité translocase et de dissociation du filament ne soient prouvés. Ainsi, il se pourrait que d'autres activités enzymatiques régulent négativement le nucléofilament présynaptique.

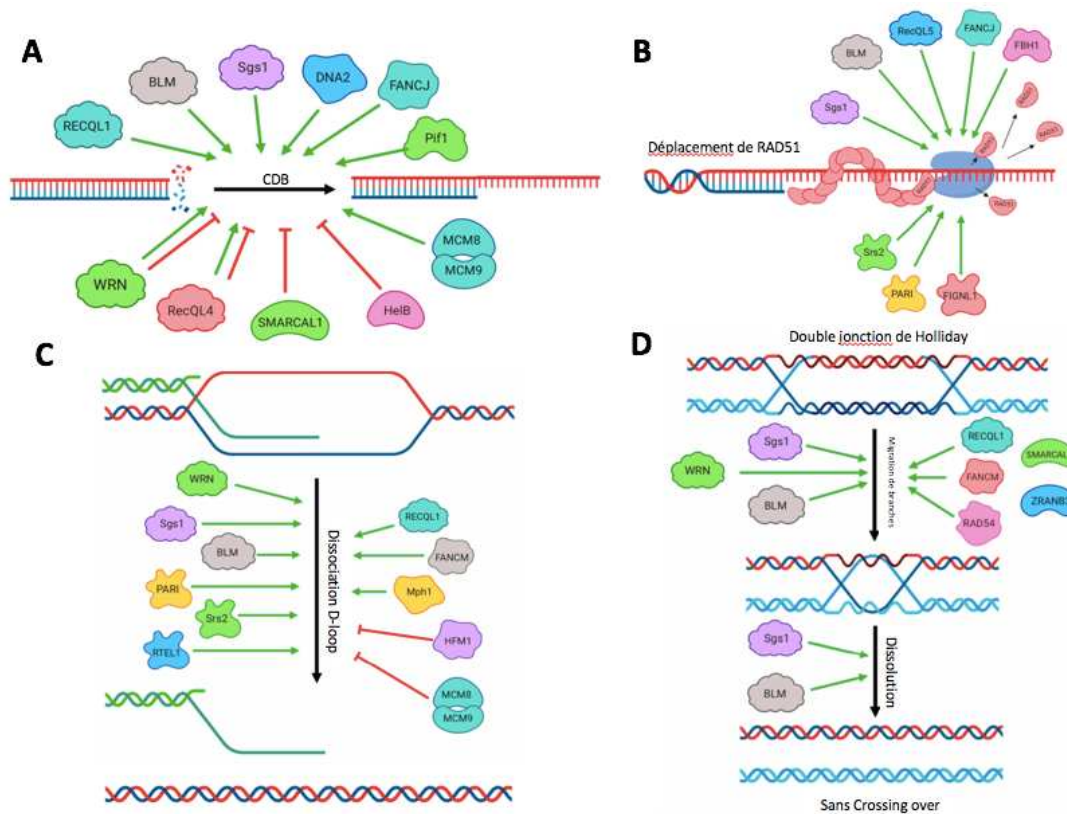


Figure 18 : L'action des hélicases dans les différentes étapes de la RH (Huselid and Bunting 2020) ;

(A) Action des hélicases la résection, **(B)** sur la mise en place du filament, **(C)** sur la D-loop, **(D)** sur la double jonction de Holliday.

c) Fonction antirecombinase de RAD54

RAD54 est une protéine de la famille Swi-Snf appartenant à la superfamille 2 des hélicases. Chez la levure, il a été montré que Rad54 transloque sur l'ADNdb avec une vitesse de 300 pb/s, déstabilise Rad51 de l'ADNdb, mais stabilise les filaments formés sur l'ADNsb (Amitani, Baskin, and Kowalczykowski 2006). RAD54 humaine est également capable de déplacer RAD51 de l'ADNdb, ce qui joue un rôle important dans le remodelage des intermédiaires de RH, notamment en permettant l'accès des polymérase pour initier la synthèse au sein de la D-loop (Mason et al. 2015).

C) Recherche d'homologie, invasion de brin, résolution de la synapse et rôle de RAD54

Les expériences de molécules uniques type rideaux d'ADN ont permis de préciser les bases moléculaires du mécanisme de recherche d'homologie chez la levure. Il est montré que Rad51 procède par 'sondage' (sampling) de l'ADNdb donneur en effectuant des contacts

labiles par patch de 8 nt en se dissociant rapidement de toutes les séquences non homologues sur au moins 8 nt consécutifs. En effet, le filament Rad51 ne capture pas de manière stable l'ADNdb qui comporte moins de 7 nt d'homologie (Qi et al. 2015). Cette étape de la réaction est caractérisée par une dépense d'énergie considérable car Rad51 explore rapidement une grande quantité de séquences. La présence d'un patch de 8 nt de microhomologie permet de capturer l'ADNdb, permettant à Rad51 de sonder l'ADNdb pour une complémentarité supplémentaire. Si l'appariement avec un 9ème nt est réussi, alors les intermédiaires résultants deviennent beaucoup plus stables grâce à un appariement Watson-Crick plus étendu par triplet et si le seuil des 15 nt est franchi alors les complexes synaptiques deviennent beaucoup moins sensibles à une dissociation spontanée. Si la capture (c'est à dire la liaison plus stable et prolongée) de l'ADNdb par le filament n'a lieu qu'en cas de contact avec un patch de 8 nt homologues les contacts transitoires et instables avec un grand nombre de séquences d'ADNdb doit quand même avoir lieu. Il est aussi probable que des enzymes interviennent pour défaire les appariements non homologues, notamment des hélicases/translocases et d'autres protéines comme Mph1, Srs2, Sgs1, Rdh54 et/ou Rad54 (Crickard and Greene 2019). Récemment, d'autres travaux ont souligné l'importance de Rad54 dans la recherche d'homologie chez la levure dans laquelle elle fonctionne comme un vrai moteur moléculaire de la machinerie de la recherche d'homologie (Crickard Jb et al. 2020). Rad54 interagit avec les extrémités du nucléofilament Rad51 et forme un complexe qui migre et transloque le long de l'ADNdb en ouvrant localement la double hélice. En formant des sortes de bulles dans lesquelles l'ADN est transitoirement ouvert, Rad54 peut ainsi faciliter la recherche d'homologie (Figure 19). D'autre part, dans une étude en MET réalisée au laboratoire, l'architecture des intermédiaires synaptiques formés en présence de Rad54 a été caractérisée et a permis de proposer un mécanisme dans lequel Rad54 interagit avec la Rad51 dans le filament présynaptique, ce qui favorise les contacts avec l'ADNdb homologue et utilise ensuite son activité d'hydrolyse ATP pour se déplacer dans la zone de contact (activité de translocation) pour retirer Rad51 de l'ADN et simultanément promouvoir l'appariement homologue. Cette activité permet également de dissocier les molécules jointes formées par l'invasion d'un ADN hétérologue. Rad54 favorise la translocation du filament Rad51 le long de l'ADNdb donneur, en même temps induit son ouverture locale formant une structure en bulle stabilisée par RPA, qui permet au brin de "scanner" l'ADNdb et de trouver efficacement des séquences homologues. Ainsi, à *Saccharomyces cerevisiae*, Rad54 forme une sorte d'unité fonctionnelle avec Rad51 pour la recherche d'homologie et la formation d'une D-loop. Chez l'Homme, RAD51 peut former des D-loop seul, mais uniquement en présence de calcium, et cette activité est fortement stimulée par le RAD54 humain (Mazina and Mazin 2004; Bugreev Dv and Av 2004). Ainsi, RAD51 et RAD54 ne forment pas cette unité fonctionnelle. Pour autant, le mécanisme d'action de RAD54 reste à préciser, notamment si, comme Rad54 (Sc), elle induit la formation de complexes synaptiques, si elle entraîne l'enlèvement de RAD51 de la zone de contact et si son activité ATPase est requise pour favoriser l'alignement de séquence et l'appariement homologue. D'autre part, la caractérisation de l'architecture des intermédiaires synaptiques formés par RAD51 seule permettrait d'avancer dans la compréhension du mécanisme de recherche d'homologie chez l'Homme.

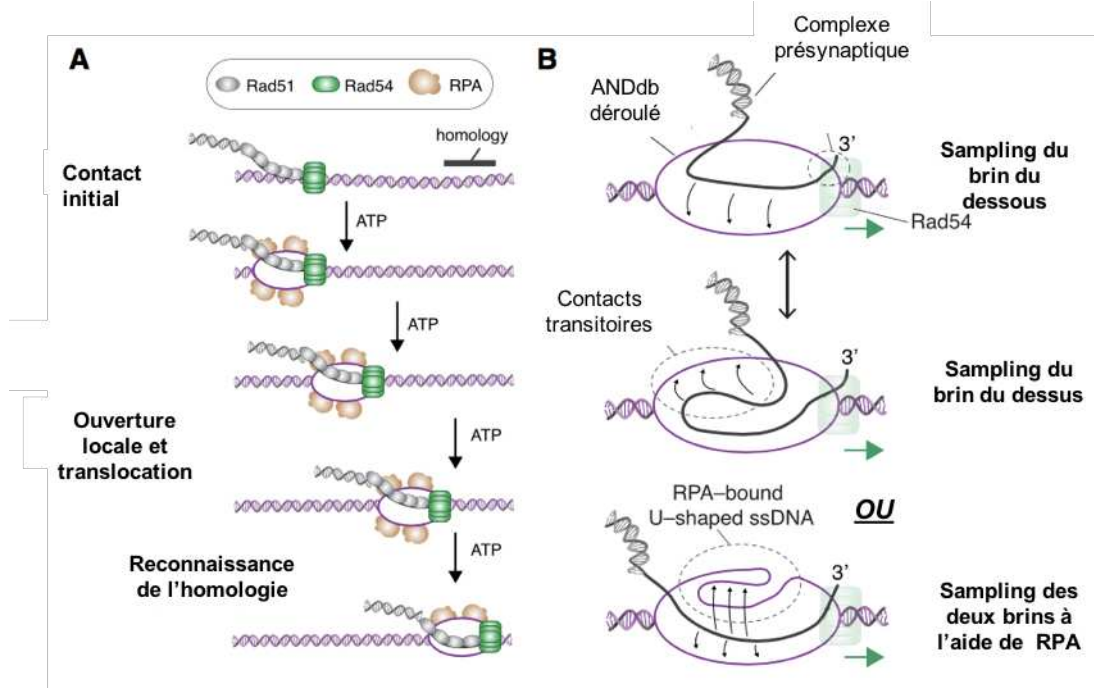


Figure 19 : Modèle d'action de Rad54 :

(A) schéma d'un complexe synaptique formé en présence de Rad54, **(B)** modèles concernant les différents mécanismes de recherche de l'homologie possible en présence de RAD54 et également de RPA (Crickard Jb et al. 2020).

III. PROBLÉMATIQUES ET OBJECTIFS DE LA THÈSE

La RH met en jeu un processus d'échange d'information génétique, entre des molécules d'ADN similaires qui se caractérise au niveau moléculaire par la formation d'intermédiaires synaptiques qu'il faut absolument contrôler pour éviter des réarrangements délétères. Mon travail de thèse porte sur la régulation des étapes précoces de la RH chez l'Homme, avec un point de vu moléculaire sur l'assemblage, l'architecture et la régulation du nucléofilament présynaptique ainsi que sur la formation et la structure des intermédiaires synaptiques. Je m'intéresse en particulier aux rôles de BRCA2 et RAD52 et à la façon dont ils se coordonnent dans ces différentes étapes.

Le laboratoire dans lequel j'effectue ma thèse est rattaché à l'UMR9019 intitulée 'Intégrité du génome et cancers'. Les thématiques de recherches de l'équipe sont axées sur la réparation des cassures double brin par NHEJ et par RH ainsi que la réparation des lésions de l'ADN au cours de la réplication. De nombreux travaux ont été effectuée notamment dans le système levure sur les recombinases comme Rad51, Rad52 et Rad54 (Ma E et al. 2018; Tavares Em et al. 2019; Dupaigne, Lavelle, et al. 2008). Comme nous l'avons vu précédemment, le mécanisme de RH et les rôles des différents acteurs diffèrent dans le système humain.

La fonction de RAD52 humaine reste encore très énigmatique. Contrairement à chez la levure, les effets d'une délétion du gène *RAD52* chez la souris sont minimes (Wang H et al. 2001). De plus, RAD52 ne joue pas ce rôle de médiateur de l'assemblage du filament RAD51 (Jensen, Carreira, and Kowalczykowski 2010a). Cependant, RAD52 semble avoir une activité liée au mécanisme de RH. RAD52 partage de nombreuses caractéristiques biochimiques avec son homologue de la levure, notamment la formation de structures annulaires et catalyse de l'hybridation de brins complémentaires (SSA pour single strand annealing) (Brouwer I et al. 2017; Rothenberg E et al. 2008). Le(s) rôle(s) exact(s) du RAD52 humaine dans la RH reste(nt) largement imprécis et ouvert(s) à l'investigation. Si la fonction médiatrice de BRCA2 est largement établie, la façon dont RAD52 et BRCA2 se répartissent les autres fonctions dans la RH est inconnue.

Le nucléofilament procède à la recherche d'homologie par un mécanisme de 'sampling', en établissant des contacts très transitoires avec l'ADNdb donneur. Mon équipe a montré que chez la levure, ce processus de recherche d'homologie est dépendant de Rad54 (Tavares Em et al. 2019). De façon différente, RAD51 humaine seule peut former des D-loop, bien que la réaction soit stimulée en présence de RAD54 (Mazina and Mazin 2004, 2; Spies J et al. 2016). Les étapes de recherche d'homologie, formation du complexe synaptique et formation de la D-loop ainsi que l'architecture de ces intermédiaires restent à préciser dans un contexte sans ou avec RAD54.

Chez *S. cerevisiae*, il a été démontré que Rad54 permettait de dissocier les monomères de Rad51 de l'extrémité 3'-OH après l'invasion de brins pour permettre aux polymérase d'amorcer la synthèse (Li X and Wd 2009). Ce rôle n'est pas confirmé chez l'Homme et les mécanismes précis par lesquels la synthèse de l'ADN se met en place ne sont pas entièrement compris. Est-ce que la synthèse peut être initiée à partir du complexe synaptique ou la structure de D-loop est-elle requise ? Deuxièmement, la capture du brin déplacé par hybridation avec l'ADNsb complémentaire provenant de l'autre extrémité d'ADNsb joue

également un rôle important dans la dynamique et la résolution de la D-loop, processus qui est catalysé par Rad52 chez la levure (Nimonkar, Sica, and Kowalczykowski 2009). Le rôle de RAD52 humaine et sa capacité à utiliser son activité d'hybridation d'ADNsb pour jouer ce rôle (McIlwraith Mj and Sc 2008), y compris son interaction potentielle avec RAD51, et la structure en D-loop dans ce processus doivent être déterminés.

Les questions que je me suis posées et qui ont articulé les 5 grands axes de mon travail de doctorat (chapitres V à IX) sont :

1- Concernant l'installation du nucléofilament RAD51 et le jeu entre RAD52 et BRCA2 : Existe-t-il une hiérarchie entre les protéines pour l'installation du filament ? Forment-elles des filaments mixtes avec RAD51 ?

2- Sur l'activité de ces filaments dans la recherche d'homologie et la formation des complexes synaptiques : Quelles sont les architectures des complexes synaptiques et de la D-loop formés avec RAD51 humaine ? RAD52 et/ou BRCA2 jouent-elles un rôle dans la formation de ces intermédiaires ?

3- Quelles peuvent être les conséquences de la formation de filaments inactifs : Etude *in vitro* d'une protéine RAD51SM chimérique et conséquences *in vivo*

4- L'effet de RAD51 sur les autres voies de réparations comme le SSA : Comment se fait le choix de la voie de réparation après l'étape de résection entre la RH et le SSA ? Quelle est la conséquence de la présence de RAD51 sur le SSA ?

5- Concernant la stabilisation de la D-loop : Quelle est l'architecture de la D-loop après capture du deuxième brin ? Qu'en est-il du rôle de RAD52 ? Peut-on mettre en place une réaction pour tester l'initiation de la synthèse dans la D-loop ?

Pour répondre à ces questions, j'ai utilisé les outils de microcopie moléculaire développés par mon équipe, que j'ai combiné avec des tests biochimiques mis en place et calibrés par mes soins.

IV. METHODOLOGIE - ETUDE MOLECULAIRE DE LA RH

A. Généralité sur les interactions ADN-Protéine

La double hélice d'ADN et ses deux chaînes sucres-phosphate antiparallèles lui confère des propriétés poly-anioniques de par la présence des groupements phosphates. Ce squelette contribue aux interactions électrostatiques, impliquées dans la formation des complexes nucléoprotéiques de manière non-spécifique par attraction des domaines protéiques chargés positivement.

La spécificité des interactions met en jeu les sites donneurs et accepteurs des liaisons hydrogènes entre les bases et les acides aminés concernés. La reconnaissance et la discrimination d'une séquence d'ADN passe par l'accessibilité des bases par le grand ou le petit sillon. Cette discrimination entre AT, TA, CG et GC se réalise au sein du grand sillon alors que les groupements fonctionnels accessibles par le petit sillon permettent seulement une discrimination AT et CG et pas de discrimination entre GC et CG ou entre AT et TA. De par sa taille et la spécificité proposée, le grand sillon est le lieu d'une grande partie des interactions avec de nombreuses protéines, alors que le petit sillon limite l'accessibilité aux plus petites protéines avec une spécificité moindre. En plus de la séquence nucléotidique, les propriétés

conformationnelles de l'ADN jouent un rôle déterminant dans l'ouverture ou la fermeture des grands et petits sillons et donc la formation et la stabilité des complexes nucléoprotéiques. Ces propriétés de conformation sont reliées aux contraintes et énergies d'empilement des paires de bases. Ce sont ces énergies d'empilement qui sont principalement à l'origine de la stabilité de la double hélice, bien plus que les liaisons Watson-Crick des paires de bases.

Ainsi, les propriétés physico-chimiques de l'ADN résultent de la séquence nucléotidique, mais aussi des énergies d'empilement qui déterminent sa conformation. Pour conserver uniquement l'information nucléotidique, il faut rompre les énergies d'empilement, ce que font les recombinaisons en étirant l'ADN.

Ainsi, certaines protéines telles que les facteurs de transcription reconnaissent une séquence d'ADN spécifique avec une affinité différentielle en fonction de la conformation locale de l'ADN.

D'autres acteurs protéiques reconnaissent uniquement des spécificités structurales dont des altérations de l'ADN comme les cassures simple brin pour la PARP1, les cassures doubles brin comme Ku, les mésappariements comme les DNA glycosylases, APE1 et d'une manière plus générale les acteurs des différentes voies du DNA repair (BER, NER, NHEJ...). D'autres acteurs sont spécifiques du simple brin comme ssb/RPA, ou les recombinaisons RecA/Rad51. Enfin les moteurs moléculaires comme les polymérase, les hélicases/translocases procèdent indépendamment des séquences avec des différences de processivité liées aux conformations de l'ADN.

Ces protéines de liaison à l'ADN ont des repliements communs connus sous le nom de motifs de liaison à l'ADN ou qui confère à la structuration des domaines, comme les motifs hélice-tour-hélice, les doigts de zinc, les « leucine zipper » ou les OB fold pour les protéines de liaison simple brin telles que les SSB ou RPA.

En solution, les protéines font une recherche trois dimensionnelles pour trouver des cibles spécifiques à l'ADN. Des modèles de diffusion de protéines facilitée, non spécifique sur l'ADN, combinant la diffusion 3D (sauts) en solution et 1D en glissant le long de l'ADN (glissant le long le squelette de l'ADN) ont été proposés : la diffusion 3D inclut le transfert de protéines entre 2 segments d'ADN ou par contact avec l'ADN superenroulé, qui constitue une méthode efficace de recherche d'ADN par la protéine, par des sauts (avec des interactions de courtes ou de longues portées) (Brackley, Cates, and Marenduzzo 2013).

La spécificité des interactions est dépendante de la force ionique et de la nature des contre-ions qui la gouverne, monovalents (Na^+ , K^+) et divalents (Mg^{2+} , Ca^{2+}), permettant de neutraliser les charges électrostatiques de la chaîne sucre phosphate au profit des interactions plus spécifiques avec les bases, lesquelles mettant en jeu des liaisons hydrogènes, de Van Der Waals et même parfois hydrophobes (Cherstvy, Kolomeisky, and Kornyshev 2008).

L'affinité est définie par le K_d qui met en les concentrations des différentes espèces présentes en solution :

$$K_d = \frac{K_{off}}{K_{on}} = \frac{[ADN][Proteine]}{[complexe]}$$

K_d est la constante de dissociation qui détermine les propriétés relatives à l'affinité d'une protéine pour l'ADN. Le K_d résulte des vitesses d'association (K_{on}) et de sa stabilité ou temps de résidence, et donc de sa dissociation (K_{off}). Elle se définit en Molaire (ou M est la concentration molaire) et plus cette valeur est faible plus l'affinité de la protéine grande.

B. Méthodologie pour l'étude des interactions ADN-protéines en MET

1) La Microscopie Electronique (ME)

Dans le cadre de ma thèse, j'ai utilisé la microscopie électronique à transmission (MET) pour analyser les nucléofilaments RAD51 ainsi que les différentes structures mise en place lors de la RH.

La MET permet de caractériser des particules isolées (ADN, virus, protéines) avec une bonne résolution nanométrique. Différentes méthodes de préparation et d'imagerie sont utilisées en fonction de la nature des échantillons.

La coloration négative est la méthode la plus courante et permet une caractérisation des protéines ou d'assemblage protéiques, des virus, de liposomes, d'exosomes, ou d'autres nanoparticules. Le mode d'observation est alors le champ clair. Elle permet d'obtenir des informations structurales à moyenne résolution.

L'observation de l'ADN et des complexes ADN-protéines est plus rare et a nécessité de développer des méthodologies spécifiques adaptées à leurs études. Le laboratoire d'accueil a mis en place des outils uniques permettant l'adsorption directe des molécules d'ADN sur le support de carbone, en conservant ses propriétés conformationnelles, et topologiques. Cette méthode dite de coloration positive associée à une observation en fond noir ou champ sombre permet aussi la caractérisation des interactions ADN-protéines. L'analyse quantitative des populations de complexes figés via l'étalement à un instant donné apporte une information sur l'évolution du système en fonction des conditions d'équilibre. On peut également obtenir des informations sur les changements d'états de l'ADN, l'assemblage ou le désassemblage des complexes au cours du temps. La microscopie permet de visualiser l'interaction de protéines avec des structures ou des séquences particulières, la conformation de l'ADN et son éventuelle modification par la fixation d'une protéine. Des études quantitatives sont nécessaires pour caractériser la conformation des complexes et ainsi caractériser les interactions.

a) *Principe de la microscopie électronique*

La microscopie électronique consiste à générer un faisceau d'électrons incidents à haute tension et d'analyser le comportement de ces électrons en fonction de la matière rencontrée dans l'échantillon analysé. Plusieurs phénomènes se produisent, qui sont résumés dans la figure 20. L'échantillon peut être opaque ou rendu opaque (non transmis) et alors les électrons sont renvoyés, comme les électrons rétrodiffusés, Auger, activant aussi des électrons secondaires, ou à l'origine des rayons X. L'analyse de ces particules détermine le champ de la Microscopie à balayage.

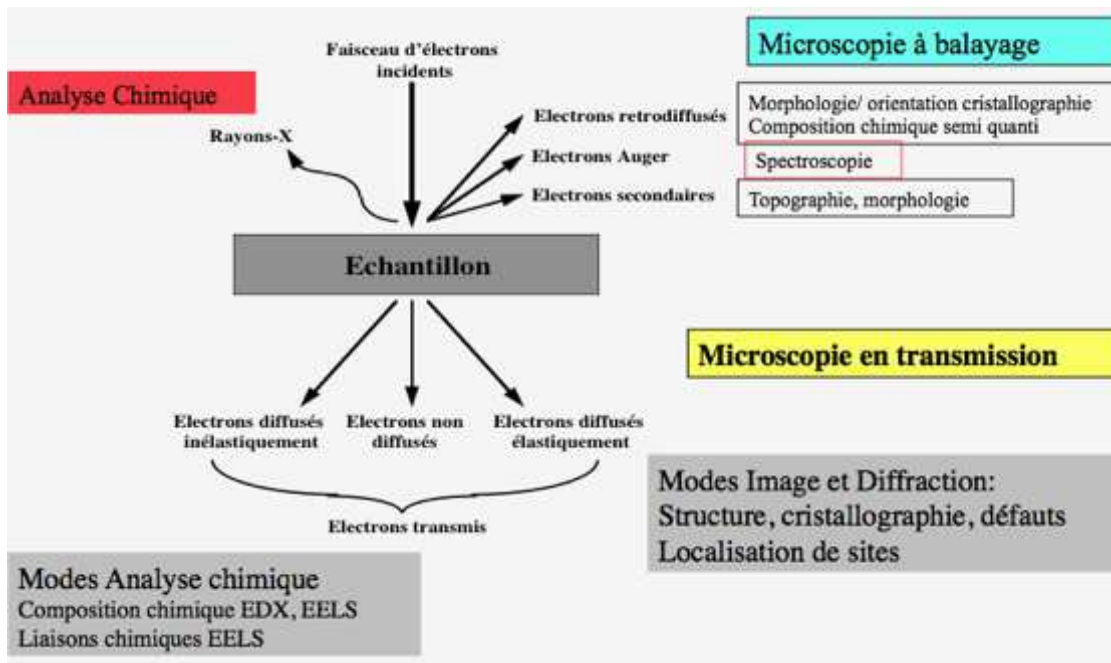


Figure 20 : Les signaux après interaction du faisceau d'électrons avec les atomes de l'échantillon

Si les électrons traversent l'objet, on parle d'électrons transmis et leur analyse est dans le champ de la microscopie à transmission que nous utilisons dans notre domaine d'activité pour caractériser l'ADN, les protéines et les complexes nucléoprotéiques.

b) La microscopie électronique à transmission

Le microscope électronique à transmission se compose d'un canon à électrons (source d'électrons et accélérateur), d'un système d'éclairage qui comprend des condenseurs qui focalisent le faisceau d'électrons incident, qui assurent le transfert du faisceau d'électrons de la source à un échantillon et qui contrôlent l'illumination de l'échantillon en fonction de la taille et de l'intensité du faisceau (figure 21). Enfin, il comprend un objectif et un jeu de lentilles qui prennent l'image formée par l'objectif pour la projeter sur l'écran d'observation ou sur les détecteurs. La lentille objectif fournit une image intermédiaire correspondant à la première image agrandie de l'objet dans son plan d'image. Cette image est traitée par un jeu de lentilles grossissantes (lentilles intermédiaires et de projection) pour donner une image finale agrandie. La résolution de l'image dépend de la spécificité atomique de cet objectif et des propriétés du microscope. La lentille intermédiaire forme une image de diffraction, si le plan objet coïncide avec le plan focal de la lentille de l'objectif, ou une image agrandie, si son plan objet coïncide avec le plan image de la lentille. En changeant la distance focale des lentilles intermédiaires (en pratique en faisant varier le courant dans les bobines intermédiaires), on passe alors d'un mode de diffraction à un mode image. Les lentilles intermédiaires agrandissent l'image intermédiaire et les lentilles de projection projettent

l'image finale agrandie sur un détecteur, qui peut être un écran fluorescent /scintillant ou à une caméra analogique ou digitale

En fonction du type d'imagerie définie, la MET utilise tous les électrons transmis et diffusés à travers l'échantillon ou spécifiquement certains d'entre eux pour former une image (figure 22). La transmission d'électrons à travers un échantillon dépend de la nature des atomes de l'échantillon et est inversement proportionnelle à son épaisseur. Par conséquent, les zones épaisses de l'échantillon auront moins d'électrons diffusés transmis et apparaîtront plus sombres, à l'inverse, les zones plus minces qui permettent la transmission des électrons.

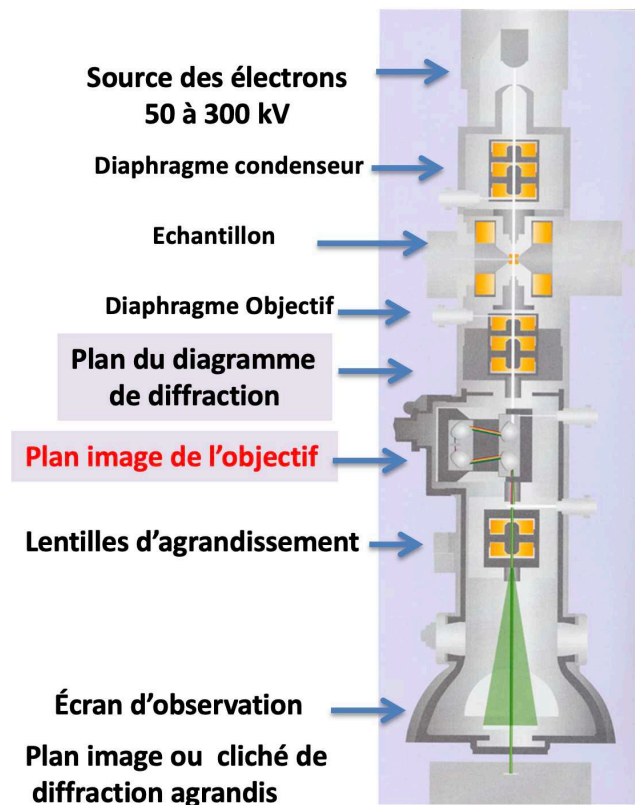


Figure 21 : Différents composants d'un microscope électronique

Selon la théorie d'Ernst Karl Abbe, la limite de résolution d'un microscope, c'est-à-dire la distance minimale en dessous de laquelle deux points voisins ne peuvent plus être distingués, dépend de la longueur d'onde d'illumination. Ainsi, la limite de résolution d'un microscope optique classique est d'environ 200 nm tandis que la limite de résolution d'un microscope électronique à transmission est environ 600 fois plus petite (0,3 nm à 100 keV) en moyenne.

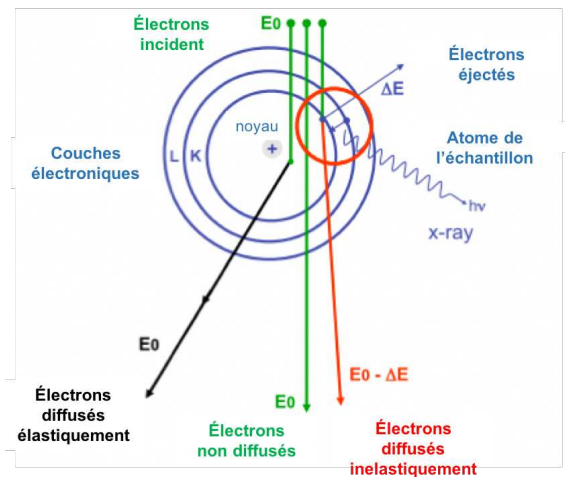


Figure 22 : Interaction des électrons avec les atomes des échantillons.

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

Certains des électrons incidents n'interagissent pas avec les atomes de l'échantillon, ils sont transmis directement sans variation de leur trajectoire et de leur énergie. Les électrons qui interagissent avec les atomes de l'échantillon sont diffusés élastiquement ou inélastiquement. Dans le cas de la diffusion élastique, leur trajectoire est déviée en passant près du noyau (souvent d'un élément lourd comme U, Pt, Os, W,) mais leur énergie cinétique et leur vitesse restent constantes. Dans le cas de la diffusion inélastique, les électrons peuvent légèrement modifier leur trajectoire mais surtout perdent une quantité considérable de leur énergie cinétique. Cette perte d'énergie est caractéristique de l'élément atomique. Ces électrons dispersés inélastiquement peuvent être utilisés dans la spectroscopie de perte d'énergie électronique (EELS pour Electron Energy Loss Spectroscopy), qui peut nous donner la composition élémentaire de l'échantillon. Ces électrons peuvent aussi être filtrés pour augmenter le contraste comme nous le faisons au laboratoire.

Le modèle de microscope Zeiss EM 902, l'un des deux microscopes de notre groupe de recherche, a été lancé par Carl Zeiss en 1984. Le microscope Zeiss EM 902 a été le premier système intégrant dans la colonne un filtre de perte d'énergie dans la colonne (EELS). Il possède un canon à électrons haute tension de 80 kV utilisant un filament tungstène ou de type LAB6.

Selon le type d'électrons utilisés pour former l'image, il existe deux modes d'observation, l'observation en champ sombre et l'observation en champ clair. Ainsi, selon le type d'analyse, la structure et l'épaisseur de l'échantillon, deux types différents de préparation et de coloration des échantillons sont effectués pour permettre leur étude par MET. La coloration permet de protéger les échantillons et aussi d'augmenter le contraste. Les observations ont été réalisées avec une caméra Veleta (Olympus Soft Imaging Solution) et les images ont été analysées avec le logiciel ITEM (Olympus Soft Imaging Solution).

2) Les techniques de préparations des échantillons

Les techniques de préparation et d'observation des échantillons dépendent du type d'objet biologique et du type d'étude menée. La coloration négative des macromolécules biologiques et l'observation en champ clair nous donnent accès à des informations sur la structure 2D et 3D de ces macromolécules. La coloration positive et l'observation en champ sombre nous permettent d'analyser finement des molécules d'ADN uniques ou des complexes ADN-protéines. Dans les deux approches, l'échantillon est certes étalé sur un film de carbone et traité avec le contrastant, l'acétate d'uranyle, mais la fonctionnalisation des carbones est radicalement différente, ce qui entraîne que l'échantillon baigne dans le colorant en coloration négative alors que l'échantillon est directement marqué par le colorant (coloration positive) sans que celui-ci se répande sur le carbone.

a) Grilles de MET et étalement de l'ADN

Les grilles de MET sont de fines grilles en cuivre (600 mesh dans nos applications en coloration positive). Pour permettre l'adsorption des particules, un fin film de carbone est déposé sur ces grilles. Les films de carbone sont préparés puis déposés sur la surface d'un mica en utilisant un évaporateur de type Balzers Baltech MED10. Les grilles MET sont déposées côte à côte sur un support plan dans l'eau et le film de carbone est décollé à l'interface eau-air puis l'eau est vidée de telle sorte que le film de carbone vient recouvrir les grilles (Figure 23).

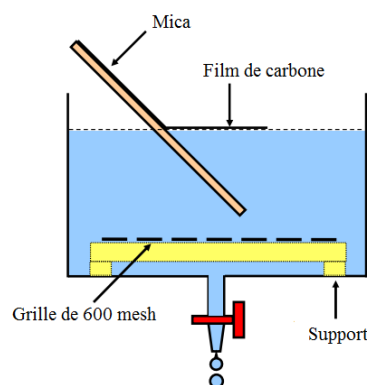


Figure 23 : Dépôt de film de carbone sur les grilles MET

Les grilles sont fonctionnalisées à l'aide d'un plasma de pentylamine formé sous vide et sous haute tension (figure 24). Des charges positives (groupement NH_3^+) vont être déposées sur la surface de carbone à l'aide d'un appareil dédié (cf figure) afin que l'ADN, chargé négativement, puisse se fixer au film de carbone de façon spontanée.

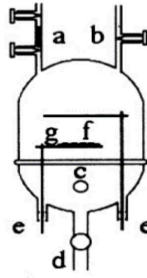


Figure 24 : Appareil à fonctionnaliser les grilles :

(a) réservoir à pentylamine ; **(b)** entrée d'air ; **(c)** Cloche Dubochet ; **(d)** valve pour contrôler le vide ; **(e)** électrodes ; **(f)** et **(g)** plaques métalliques servant de support pour poser les grilles

5 μ L de l'échantillon sont ensuite déposés sur la grille pendant 1 min puis elle est rincée par deux gouttes d'acétate d'uranyle à 2% et séchée sur un papier filtre. L'acétate d'uranyle va permettre de marquer l'ADN et d'augmenter le contraste en MET.

b) Coloration positive et une observation en champ sombre

La coloration positive est une technique développée au laboratoire utilisée pour l'analyse de molécules d'ADN individuelles ou de complexes ADN-protéines en TEM. Une des étapes clés est le contrôle de l'adsorption des molécules sur le support de carbone. J. Dubochet a développé une technique pour adsorber des molécules d'ADN sur un support chargé positivement en utilisant la pentylamine sur un film de carbone, suivie d'une coloration positive avec de l'acétate d'uranyle (Dubochet J et al. 1971). Le laboratoire a développé un système d'ionisation permettant le dépôt de pentylamine de manière contrôlée, ce qui permet le contrôle du déploiement de l'ADN sur la surface et la décoration de l'ADN avec l'acétate d'uranyle. Les groupements uranyle interagissent avec les groupements phosphate de l'ADN, qui crée ainsi des groupes uranyle le long de l'ADN. Cette méthode permet la préservation des propriétés conformationnelles de l'ADN (2D-et 3D) ou des complexes ADN-protéine (Muzard et al.1990). La courbure et la flexibilité locale de l'ADN peuvent être quantifiées par des méthodes d'analyse statistique d'images développées en laboratoire (Cognet Ja et al. 1999). Par conséquent, le laboratoire est en mesure de caractériser et de quantifier les changements de conformation de l'ADN par les protéines (Le Cam E et al. 1994; Beloin C et al. 2003). Des études cinétiques, des analyses d'assemblage et de remodelage des complexes peuvent également être effectuées (Veaute X et al. 2005). L'analyse statistique des observations permet la quantification des paramètres examinés (conformation de l'ADN, cinétique de réaction, assemblage et remodelage).

Le mode d'observation en fond noir peut être obtenu en inclinant (en tiltant) le faisceau d'électrons via une bobine spécifique située dans le condenseur, assurant ainsi un éclairage incliné de l'échantillon. Le faisceau d'électrons direct est arrêté par le diaphragme objectif et l'image est formée par les électrons diffusés à de grands angles par les atomes

lourds. Un autre moyen d'acquisition d'une image en fond noir consiste en l'éclairage de l'échantillon avec un faisceau d'électrons conique obtenu à travers un diaphragme annulaire au niveau du condenseur. Le contraste obtenu est plus important car il arrête les électrons directs, et ne laisse passer que les électrons diffusés et sélectionnés par le diaphragme objectif dont la taille doit être choisie pour que les électrons directs soient totalement arrêtés (40 μm dans notre microscope). Dans les deux méthodes permettant d'obtenir un fond noir, un diaphragme objectif contenant une couche mince en or est installé de manière à réduire l'astigmatisme présent dans l'image résultante.

c) Coloration négative et une observation en champ clair

La technique a été développée par Brenner et Horne en 1959 pour étudier la forme externe et la structure des virus (Brenner S and Rw 1959). Elle est utilisée depuis pour analyser la structure des macromolécules composées d'atomes légers (C, H, O, N et P), en particulier, les protéines et les assemblages protéiques, les virus, ou certaines structures vésiculaires comme les liposomes, les microvésicules ou les exosomes (Booth Ds, A, and Y 2011).

L'utilisation de contrastants (métaux lourds) est nécessaire pour protéger l'échantillon du faisceau d'électrons et augmenter le contraste de l'image (figure 25). En coloration négative, l'échantillon est baigné dans l'agent contrastant. Pour cela l'échantillon est adsorbé sur un film de carbone ou de collodion-carbone (Horne Rw and Ip 1974), préalablement rendu hydrophile par une activation de « glow discharge » dans un faible vide et coloré par l'agent contrastant de manière à y être enveloppé. L'acétate d'uranyle (1% ou 2% poids/volume) est le plus classiquement utilisé mais en fonction de la nature de l'échantillons et de la solution tampon utilisée, d'autres contrastants peuvent être choisis comme l'acide phosphotungstique ou l'acide phosphomolybdique. L'étape critique est la réalisation de la couche d'enrobage de contraste qui doit inclure les échantillons. Après dépôt, le contrastant est absorbée manuellement par capillarité à l'aide d'un papier filtre. Les molécules doivent être complètement recouvertes par le colorant, et si le séchage est trop long, les molécules peuvent s'aplatir ou se déformer. Après reconstructions topographiques des images obtenues la résolution est nanométrique. Malgré ces divers inconvénients, la coloration négative reste une méthode largement utilisée en microscopie électronique. Souvent cela permet d'obtenir un premier volume à basse résolution.

L'image formée utilise l'ensemble des électrons élastiques aux petits angles, inélastiques et non diffusés. Le diaphragme objectif (90 μm pour notre microscope) est placé dans le plan focal pour sélectionner majoritairement le faisceau transmis (faisceau non ou peu dévié) de l'échantillon, seuls les électrons non déviés formeront l'image sur l'écran. Dans nos applications, les inélastiques sont filtrées, ce qui augmente le contraste.

Par conséquent, les zones de l'échantillon qui diffractent fortement le faisceau apparaissent plus sombres, tandis que les zones qui ne diffractent pas l'échantillon transmettent toute la lumière et apparaissent plus claires.

Le contraste de l'image dépend alors du numéro atomique des particules de l'échantillon. Les atomes lourds apparaissent comme des objets sombres et les objets légers apparaissent plus clairs. En général, on introduit un grand diaphragme objectif (90 μm) qui

permet le passage du faisceau direct et peu ou pas de faisceaux diffractés. Ces conditions conduisent à une image en fond clair contrastée qui est souvent appelée fond clair, d'où le nom : « Brightfield » (figure ci-dessous).

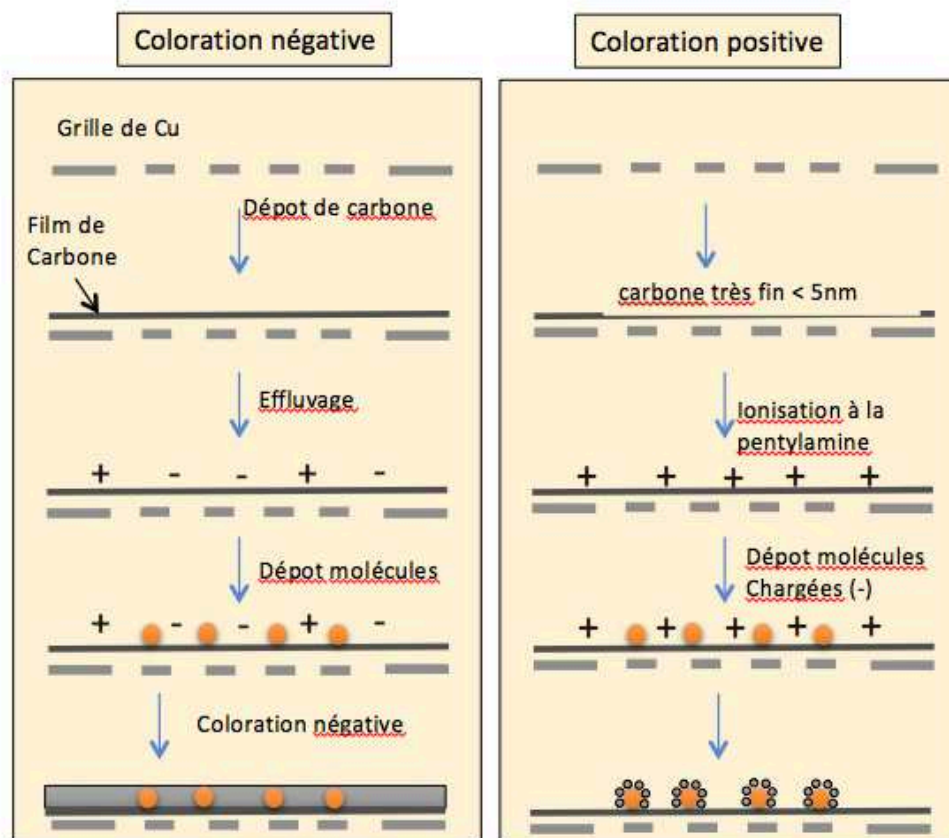


Figure 25 : Préparation des grilles de MET en fonction de la coloration

C. Caractérisation des intermédiaires de recombinaison en biochimie, apport de l'imagerie moléculaire

Pour démontrer l'activité du filament RAD51, il existe principalement 2 essais biochimiques *in vitro* : le test de D-loop et la réaction d'échange de brin. Ces essais sont très souvent utilisés pour étudier les rôles de différentes protéines, comme les recombinases, les antirecombinases, les médiateurs du filament présynaptique ainsi que d'autres régulateurs. Des variations dans les conditions expérimentales (stoechiométrie des protéines, temps et température d'incubation, conditions saline : force ionique et présence de cations divalents, addition d'ATP ou d'analogues) permettent de mettre en évidence des propriétés importantes des complexes nucléoprotéiques formés dans ces réactions. Les produits de ces essais peuvent être analysés en gel d'électrophorèse après déprotéinisation (gel d'agarose), et en parallèle, les complexes ADN-protéine et les intermédiaires formés au cours de la réaction sont caractérisés par microscopie électronique.

Dans l'essai D-loop, un filament RAD51 est formé sur le substrat contenant la zone d'ADNsb, puis un ADNdb superenroulé négativement qui possède une région homologue est ajouté dans la réaction. L'invasion de l'ADNdb superenroulé donneur par le filament RAD51 entraîne la formation de complexes synaptiques. En gel, seules les D-loop dans lesquelles l'alignement des séquences homologues a formé l'hétéroduplex sont stables après déprotéinisation, on peut donc quantifier cette population. En MET, on est capable de quantifier et caractériser toutes les populations formées, notamment les molécules jointes formées par un simple contact entre le filament et l'ADNdb donneur.

Dans la réaction d'échange de brin, le filament RAD51 est formé sur un ADNsb circulaire de longue taille (comme par exemple le virion phiX174 de 5kb). On ajoute ensuite l'ADNdb homologue linéaire (par exemple le phiX174 coupé par une enzyme de restriction). L'échange de brin conduit alors à la production d'une molécule jointe, puis l'échange de brin aboutit aux produits finaux qui sont un ADNdb circulaire contenant un 'nick' (interruption d'un des brin) et l'ADNsb linéaire homologue. De la même façon, les intermédiaires formés dans cette réaction sont analysés en gel après déprotéinisation. Ainsi, l'utilisation de la MET permet ici aussi d'identifier les différentes populations d'intermédiaires, mais également de mettre en évidence des complexes transitoires et métastables. On peut d'une part localiser les protéines d'intérêt (si besoin par immunomarquage), caractériser les tailles des molécules et des zones de contact et enfin réaliser des statistiques sur les différentes populations de molécules. Ainsi la MET permet une description mécanistique précise des intermédiaires formés dans les réactions.

La purification des protéines et des substrats ADN est un pré requis pour les études en MET.

1) Substrat d'ADN

Dans le but de tester l'activité du filament RAD51 *in vitro*, j'ai utilisé un substrat d'ADN hybride composé d'une partie double brin qui possède une extrémité 3' simple brin sortante. Il mime l'extrémité de la CDB après l'étape de la résection (figure 26). L'utilisation de ce substrat présente des avantages: Tout d'abord, il a été montré qu'il forme des D-loop plus stables que celles formées avec des oligonucléotides sb plus petit (Wright Wd and Wd 2014). De plus, ce substrat est plus facilement détectable en MET grâce à la présence de la partie db qui est clairement identifiable dans les molécules jointes.

1^{ère} étape: Purification de grands fragments d'ADNs**b**

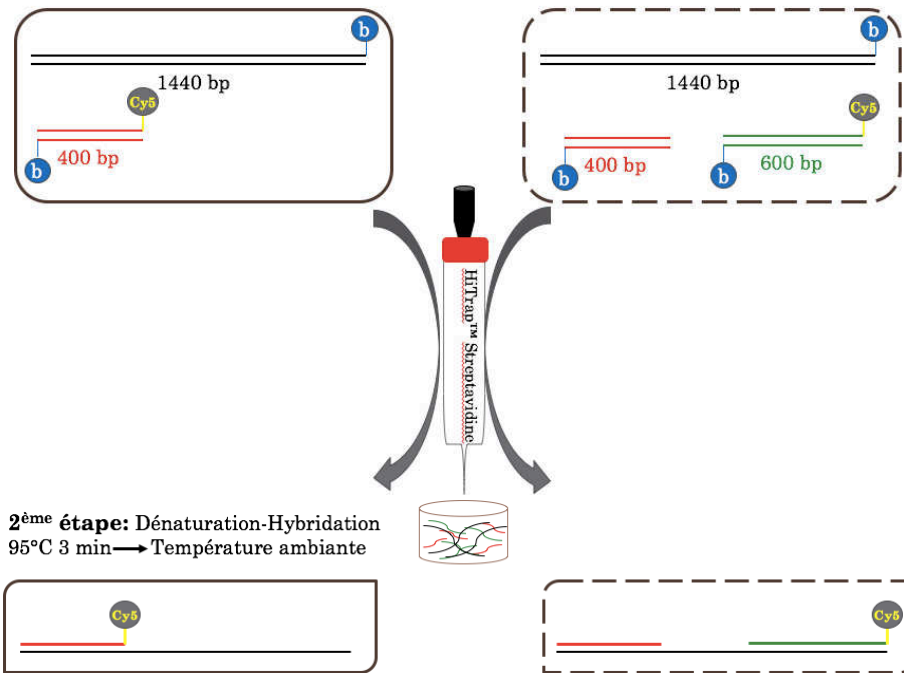


Figure 26 : Schéma des constructions d'ADN mimant les intermédiaires de recombinaison homologue

a) *Amplification des fragments d'ADN par PCR (Polymerase Chain Reaction)*

Le substrat hybride a été réalisé à l'aide de deux fragments d'ADN double brin de tailles différentes (400 bp et 1440 bp), biotinylés en 5' et marqués à la Cyanine 5 (Cy5) en 5' pour le 400 bp. Pour obtenir ces fragments j'ai utilisé le plasmide pBR322 (4361 bp) comme matrice et j'ai amplifié chaque séquence par PCR à l'aide d'amorces biotinylées et marquées au Cy5 entre les positions 2574 et 4014 pour le 1440 bp, 2574 et 2974 pour le 400 bp et 3413 et 4014 pour le 600 bp.

L'amplification par PCR se déroule en 34 cycles selon le programme suivant :

| ETAPE | | TEMPS (S) | TEMPERATURE(°C) |
|-----------------------|--------------|-----------|-----------------|
| Dénaturation initiale | | 300 | 95 |
| 34 Cycles | Dénaturation | 20 | 95 |
| | Hybridation | 30 | 53 |
| | Elongation | 90 | 68 |
| Elongation finale | | 300 | 68 |

Tableau 1 : Programme PCR utilisé pour amplifier les substrats d'ADN

| Matrice | Position | Séquences amorces 5'-3' | Brin | Tm°C | Fragment db |
|--------------------------|----------|--------------------------------|------|------|-------------|
| <i>pBR322</i> 4361 bp | 2574 | b-CGA CGC TCA AGT CAG AGG | + | 58,4 | b-400-Cy5 |
| | 2974 | Cy5-TTC TAG TGT AGC CGT AGT TA | - | 54,3 | |
| | 3413 | b-CAG TGC TGC AAT GAT ACC | + | 66,7 | b-600-Cy5 |
| | 4014 | Cy5-GGA TCT CAA CAG CGG TAA | - | 58,8 | |
| | 2574 | CGA CGC TCA AGT CAG AGG | + | 54 | 1440-b |
| | 4014 | b-GGA TCT CAA CAG CGG TAA | - | 53,8 | |

Tableau 2 : Amorces spécifiques utilisées pour l'amplification des substrats d'ADN

Les produits de PCR sont ensuite analysés par électrophorèse sur gel d'agarose 1.5%, TAE 0,5x et révélés par un marqueur de séquence aspécifique, le SYBR® Gold, fluorescent sous l'exposition aux rayons UV.

b) Purification des produits PCR par chromatographie FPLC (Fast Performance Liquid Chromatography)

Les produits des réactions PCR ont ensuite été purifiés en chromatographie à l'aide d'un système SMART® GE Healthcare en utilisant une colonne échangeuse d'anion MiniQ® afin d'éliminer les dNTPs, les amorces, la polymérase, la matrice et les contaminants de l'amplification. Les molécules chargées négativement (dont l'ADN) se fixent sur la résine qui est chargée positivement. L'éluion des fragments d'ADN se fait par un gradient de sel (NaCl) de 200 mM à 1000 mM d'une solution de Tris-HCl pH 7,5 permettant de purifier l'ADN selon sa taille.

c) Purification par HiTrap® Streptavidine

Pour pouvoir construire les substrats d'ADN, une étape importante consiste à préparer de longs fragments simple brin à partir des fragments double brin obtenus par PCR afin de pouvoir hybrider 2 simples brins de taille différente ensemble. Nous avons chargé un mélange stœchiométrique de produits de PCR sur la résine d'affinité HiTrap-Streptavidine équilibrée en Tris-HCl 10 mM (pH 7,5), NaCl 50 mM (T10N50). Les fragments d'ADN biotinylés se fixent sur la matrice grâce aux liaisons biotine-streptavidine extrêmement fortes. La dénaturation de l'ADNdb est effectuée à l'aide d'une solution de NaOH à 200 mM : les fragments sb biotinylés restent accrochés sur la colonne, les fragments sb non biotinylés sont élués.

d) Hybridation des fragments d'ADN

Les fragments d'ADN simple brin complémentaires (fraction éluée) sont chauffés à 95°C pendant 3 minutes puis le mélange est refroidi lentement, en le laissant à température ambiante, afin de favoriser l'hybridation entre les brins complémentaires. On peut ensuite contrôler la qualité de la construction et son homogénéité par gel mais aussi par MET.

- 2) Test biochimique pour mimer les étapes de la RH *in vitro*
a) *Expérience de gel retard*

Les gels retard permettent de caractériser les interactions de protéines avec une séquence ou une structure particulière de l'ADN en termes de spécificité, d'affinité et de structure. La formation des complexes présynaptiques nucléoprotéiques ADN-Rad51 a été étudiée par cette technique. Pour cela, un ADNsb marqué au Cy5 est incubé avec Rad51 dans les bonnes conditions de polymérisation. Les complexes sont chargés sur gel. La fixation des protéines sur l'ADN induit un retard de la migration. Les conditions optimales pour la formation du nucléofilament Rad51 de levure étaient déjà maîtrisées au laboratoire d'accueil. J'ai mis au point les bonnes conditions pour former les nucléofilaments RAD51 avec le meilleur rendement possible. Ces conditions sont les suivantes : Tampon Tris éthanolamine 10 mM pH 7.5, NaCl 50 mM, Ca² mM, DTT 1 mM, 1,5 mM ATP, 15 µM (en nucléotide) d'ADN, 5 µM de RecA/Rad51/RAD51 (suivant le modèle) et 250 nM de SSB/RPA. Il faut respecter la stœchiométrie suivante : 1 molécule de Rad51 pour 3 nucléotides et incubé 5 min à 37°C. Ensuite ajouter 1 molécule de RPA pour 60 nucléotides et incubé à nouveau pendant 10 min. Ici RPA permet de défaire les structures secondaires, facilitant ainsi l'étape d'élongation des filaments. À la fin de l'expérience, on ajoute un agent crosslinkant (0.01% de glutaraldéhyde) qui permet de stabiliser les complexes et éviter la dissociation au cours de la migration qui est faite sur un gel d'agarose à 1%, TAE 0.5x, à 4°C pendant 35 min avec un voltage de 80V.

- b) *Test de D-loop*

Une fois les filaments formés, l'ADNdb homologue (le plasmide pUC19 superenroulé négativement) est introduit dans le mélange réactionnel. Les filaments actifs sont capables de chercher et trouver les séquences homologues. L'invasion de brin aboutit à la formation de molécules jointes stables. On procède ensuite à la déprotéinisation de la réaction (ajout d'un tampon « stop », composé d'EDTA à 0,5M et de SDS à 20%, puis de protéinase K). Les produits de la réaction sont chargés pour migrer sur gel (30 minutes, 70V Température ambiante) et on observe, par détection de la fluorescence Cy5, une bande qui traduit la formation de molécules jointes. Ce test permet de mettre en évidence les joints dits plectonémiques (Costes and Lambert 2012). En parallèle, l'expérience est visualisée en microscopie (sans l'étape de déprotéinisation), ce qui permet de mettre en évidence et quantifier les joints paranémiques. On pourra donc comparer les proportions de chaque type de molécules jointes.

V. CARACTERISATION DES FILAMENTS ACTIFS : JEU ENTRE BRCA2 ET RAD52

A. Introduction

L'assemblage du filament RAD51 se déroule en deux étapes : tout d'abord la nucléation de quelques monomères de RAD51 sur l'ADNsb recouvert de RPA, puis l'élongation du filament par polymérisation coopérative de RAD51 le long de l'ADN. Chez l'Homme, des partenaires de RAD51 sont impliqués dans la formation de filaments, leur architecture, mais aussi leur activité dans la recherche d'homologie et la formation de la D-loop. Les protéines médiatrices de la recombinaison (RMP) sont des protéines qui aident à l'assemblage et à la stabilisation des filaments soit en accélérant la nucléation de RAD51 sur l'ADNsb, soit en ralentissant sa dissociation de l'ADNsb. Chez l'Homme, il a été démontré que BRCA2 interagit avec l'ADNsb (Yang H et al. 2002) et avec RAD51 à l'aide des motifs répétés consensus 'BRC', il recrute et assemble des monomères de RAD51 sur l'ADNsb couvert par RPA, formant des points de nucléation, il joue ainsi le rôle de médiateur (Jensen, Carreira, and Kowalczykowski 2010b; J. Liu et al. 2010b). Il a également été montré qu'un autre domaine (TR2) de BRCA2 joue un rôle dans la propagation et la stabilisation du filament (San Filippo, Sung, and Klein 2008b). D'autre part, les paralogues de RAD51 sont capables de lier et remodeler les filaments présynaptiques pour former des structures plus stables et flexibles (Taylor et al. 2015).

A l'inverse, il existe des protéines dites 'anti-recombinases' qui régulent négativement le nucléofilament RAD51. Ainsi les hélicases BLM, PARI, FBH1, FANCI et RTEL1 sont capables d'enlever RAD51 de l'ADN et ainsi démanteler les filaments (Moldovan et al. 2012b). De façon intéressante, chez la levure *Sc*, la formation de filaments mixtes en présence de certains de ses partenaires (les paralogues Rad55-57 ou Rad52) ont permis de mettre en évidence un rôle de ces partenaires dans la résistance des filaments mixtes contre l'activité anti-recombinase de Srs2 (J. Liu, Renault, et al. 2011; Ma E et al. 2018).

La fonction de RAD52 humaine reste encore très énigmatique. Contrairement à chez la levure, les effets d'une délétion du gène *RAD52* chez la souris sont minimes (Wang H et al. 2001). Cependant, RAD52 semble avoir une activité liée au mécanisme de RH, d'ailleurs une délétion du gène *RAD52* est synthétiquement létale avec des mutations de plusieurs protéines de la RH, notamment BRCA2, et des paralogues de RAD51 (Feng et al. 2011a; B. H. Lok et al. 2013a). RAD52 partage de nombreuses caractéristiques biochimiques avec son homologue de la levure, notamment la formation de structures annulaires et catalyse de l'hybridation de brins complémentaires (SSA pour single strand annealing) (Brouwer I et al. 2017; Rothenberg E et al. 2008). Le(s) rôle(s) exact(s) du RAD52 humaine dans la RH reste(nt) largement imprécis et ouvert(s) à l'investigation.

B. Matériels & Méthodes

Purification de protéines

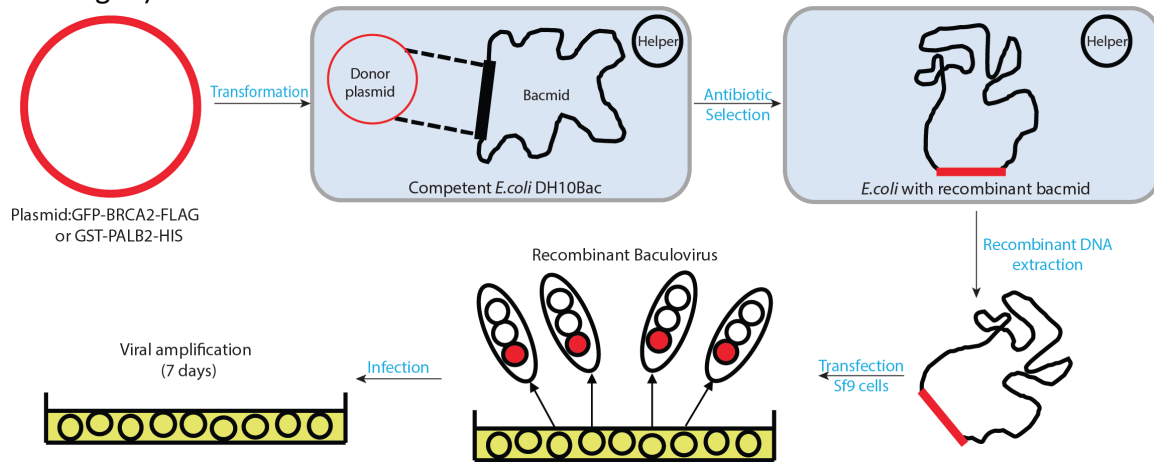
1) RAD51

RAD51 a été purifié par Xavier Veaute (CiGEX, CEA de Fontenay-aux-roses). Pour cela il a fallu transformer des cellules BLR(DE3) pLysS avec pCDF-Duet-6His-SUMO-RAD51 (don de Aura Carreira et de la plateforme Curie- SC0941 - PSC009/B10). Après la transformation, il a inoculé 50ml de TB (Terrific Broth) + Spectinomycine 50µg/ml avec une colonie puis laissé pousser la culture à 37°C durant toute la nuit. Ensuite, il a inoculé 3L de TB + Spectinomycine 50µg/ml avec la préculture pour être à DO=0,1 et ajouté de l'IPTG à la concentration finale de 0,5 sur la nuit à 20°C. Après centrifugation à 5000 rpm (F12 6x500) pour 15 min, le culot est repris dans 192 ml de tampon de lyse (32100/160 = 200,6) et gardé à - 20°C. (Tampon de lyse : PBS x1 ; 350mM NaCl ; 20 mM Imidazole ; 10% Glycerol ; 0,5 mg/ml Lysozyme ; Complete Protease Inhibiteur (Roche) ; 1 mM AEBSF). On procède ensuite à une décongélation des culots pour la purification. On récupère le surnageant, puis on effectue une filtration sur filtre 0,45µm (5 filtres GDX). On incube avec 5 ml de solution de résine NiNTA lavée avec 20mM Tris HCl pH 8@4°C; 500mM NaCl, puis 2h30 avec agitation (barreau magnétique). On transfère dans colonne BioRad (2,5cm de diamètre) et on resuspend dans 8ml TpW2. Sur les 8ml, on ajoute 40,8µl SUMO Protease à 4,11 mg/ml. La colonne est fermée et mise sur le roller mixer à 4°C over night. On récupère le FT1 (dans lequel se trouve hRAD51 sans le tag his-SUMO) et on ajoute 5 ml de TpW2 puis l'on resuspend la résine. La préparation est enfin passée sur HiTrap heparin 2x 1ml et concentrée sur Amicon ultra 4 10K MWCO à 4000rpm.



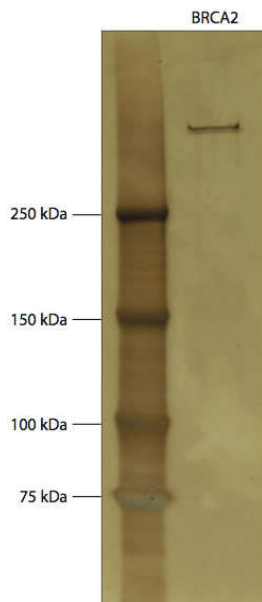
2) BRCA2

Les protéines BRCA2 et PALB2 a été purifiée dans le laboratoire de Jean Yves Masson (Université Laval, Québec). Des cellules d'insectes (Sf9) sont infectées par un virus GFP-BRCA2-FLAG ou GST-PALB2-His. Le protocole de production des virus est fait comme dans le schéma simplifié suivant (basé sur la technique Bac-to-Bac Baculovirus Expression Systems de Invitrogen) :



Une fois les virus obtenus, on infecte 500 mL de cellules d'insectes Sf9 en suspension à 2×10^6 cellules/mL pendant 3 jours à 27°C. Le ratio d'infection avec le virus est de 1/25 pour BRCA2. Après les jours d'incubation, on centrifuge et congèle les culots à -80°C pour purification.

Pour purifier la protéine BRCA2, le culot est resuspendu dans 40 mL de Flag buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1 mM DTT, 0,02% Triton X-100 et 10% glycérol) contenant des inhibiteurs de protéases (tablette Roche). La suspension est ensuite lysée avec un « Douncer » 15 fois, sonication 3x30 secondes puis incubé avec 15U/mL de benzonase et 1 mM de MgCl pendant 45 minutes à 4°C avec rotation. Le matériel insoluble est ensuite enlevé par centrifugation à 35 000 rpm à 4°C pendant 45 minutes. On ajoute ensuite le lysat obtenu à 500 µL de billes GFP faite maison et incubation pendant 3 heures à 4°C avec rotation. Les billes sont ensuite lavées 3 fois avec du Wash buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 250 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1 mM DTT, 0,02% Triton X-100 et 10% glycérol) et incubées 30 minutes à 4°C (rotation) avec du Wash buffer contenant 5 mM d'ATP et 15 mM de MgCl₂. Après trois autres lavages avec du Wash buffer, les billes sont resuspendues dans 1,5 mL de Flag buffer contenant 500 U de protéase TEV et incubées sur la nuit à 4°C avec rotation. Après élution à l'aide d'une colonne, le surnageant est incubé avec 500 µL de billes Flag (M2 Anti-Flag affinity gel d'Invitrogen) dans 3 mL de Flag buffer pendant 2 heures à 4°C avec rotation. Les billes sont ensuite lavées 3 fois avec du Wash buffer, puis 3 fois avec du Flag buffer. Les protéines sont ensuite éluées avec du Flag buffer contenant 500 µg/mL de 3X FLAG peptide (Invitrogen) pendant 2 heures à 4°C. Finalement, l'élution est dialysée dans du tampon de stockage (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 200 mM NaCl, 10% glycérol et 1 mM DTT).



Polymérisation des protéines sur le substrat hybride

La réaction contient 10 mM Tris-HCl pH7,5, 50 mM NaCl, 2 mM CaCl₂, 1,5 mM ATP, 1 mM DTT, 5,7 nM molécules (9 μM nt) de l'ADN sb-db marqué au Cy5. En fonction de l'expérimentation que l'on veut effectuer, l'ordre d'ajout des protéines change. Pour les tests sur la médiation RPA est ajouté en premier puis BRCA2/RAD52 et ensuite RAD51. Pour étudier l'architecture des filament RAD51 et ajouté en premier avec BRCA2/RAD52 puis on ajoute RPA. RPA a été introduite à une concentration finale de 0,3 μM (1 protéine pour 30 nucléotides) pendant 10 minutes à 37°C. L'expérience s'est poursuivie par l'ajout de RAD51 à une concentration finale de 3 μM (1 protéine pour 3 nucléotides) pendant 10 minutes supplémentaires. Pour le reste, RAD52 est ajoutée à une concentration finale de 100nM et BRCA2 a une concentration de 0,1 nM pour 5 minutes à 37°C. Ensuite 0,5 μL sont prélevés du volume réactionnel pour être dilué 25x dans le même tampon de réaction. Puis, on dépose 5 μL pour 1minute sur une grille de MET 600-mesh préalablement recouvert par un fin film de carbone et ionisée par un dispositif Dubochet par des charges positives provenant de l'amylamine comme décrit dans la section « Méthodologie ». On rince ensuite la grille par 2 gouttes d'acétate d'uranyl à 2%. On sèche à l'aide d'un papier filtre. La grille est alors analysable par MET Zeiss 902, en coloration positive et une observation en champ sombre. Les images sont prises à une magnification de 85 000x à l'aide d'une caméra Veleta CCD puis analyser avec le logiciel ITEM (Olympus Soft Imaging Solution).

Bandshift

La réaction contient 10 mM Tris-HCl pH7,5, 50 mM NaCl, 2 mM CaCl₂, 1,5 mM ATP, 1 mM DTT, 5,7 nM molécules (9 μM nt) de l'ADN sb-db marqué au Cy5. RPA a été introduite à une concentration finale de 0,3 μM (1 protéine pour 30 nucléotides) pendant 10 minutes à 37°C. L'expérience s'est poursuivie par l'ajout de RAD51 à une concentration finale de 3 μM

(1 protéine pour 3 nucléotides) pendant 10 minutes supplémentaires. Pour le reste, RAD52 est ajoutée à une concentration finale de 100nM et BRCA2 a une concentration de 0,1 nM pour 5 minutes à 37°C. On introduit ensuite 0,01% de glutaraldéhyde et on laisse reposer 5 min à température ambiante. On fait ensuite migrer la totalité du volume réactionnel dans un gel d'agarose 1% (poids/volume), TAE 0,5x pendant 35 min 80V à 4°C. Puis le gel est analysé, l'ADN marqué au Cy5 peut alors être détecté et la fluorescence émise est révélée à l'aide d'un Typhoon FLA 9500 (GE Healthcare Life Sciences).

Marquage immunologique couplé aux bille d'or des filaments présynaptiques

Le volume réactionnel contient 10 mM Tris-HCl pH7,5, 50 mM NaCl, 2 mM CaCl₂, 1,5 mM ATP, 1 mM DTT, 22,8 nM molécules (36 µM nt) de l'ADN sb-db marqué au Cy5. RAD51 est incubé pendant 10 minutes à 37°C à une concentration finale de 12 µM. 0,4 nM de RAD52 sont ajoutés à la réaction pendant 5 minutes supplémentaires. Ensuite RPA est ajouté à la réaction à une concentration finale de 0,12 µM pendant 10 minutes à 37°C. 0,5 µL de glutaraldéhyde sont ajoutés au mélange réactionnel et laissé à température ambiante pendant 5 minutes. On ajoute ensuite 4 µL d'un anticorps monoclonal Anti-RAD52 (Sigma SAB2702174) à température ambiante durant 10 minutes. On rajoute 2 µL de glutaraldéhyde (0,5%) et on laisse 5 minutes à température ambiante suivi de l'ajout de 5,5 µL d'une solution de billes d'or de 6 nm de diamètre. Après avoir laissé le mélange à température ambiante pendant 10 minutes, on passe la totalité de notre volume réactionnel sur une colonne superose. Le volume exclu d'intérêt est collectionné dans un tube puis étaler sur une grille de MET afin d'être analysé.

C. Résultats

1) Caractérisation en MET et par gel des constructions mimant les intermédiaires de RH

Pour mimer les étapes de la RH et ainsi pouvoir étudier le rôle des différentes protéines *in vitro*, la construction d'un substrat présentant une région simple brin sur 1040 nt et une région double brin sur 400 pb a été effectuée comme décrit dans la section « II. Matériel et Méthode ». Nous avons également construit un substrat mimant une brèche d'ADNsb qui pourrait s'être formée dans le contexte d'une fourche de réplication arrêtée, ce substrat se compose d'une région d'ADNsb de 440 nt entourée de deux régions d'ADN db de 400 et 600 pb. Ces constructions sont analysées en gel d'agarose 1,5% TAE 0,5x puis en MET (Figure 27). La partie double brin est facilement distinguable contrairement aux régions simple brin qui ne s'étalent pas bien sur la surface en raison de la formation de structures secondaires en présence de sel. Si le substrat est dilué dans l'eau, la partie simple brin s'étale partiellement. Dans le cas du substrat Gap, cette partie sb est encore mieux étalée et déroulée car elle entourée de deux régions d'ADNdb moins flexibles. La MET permet également de contrôler la qualité et la pureté des constructions.

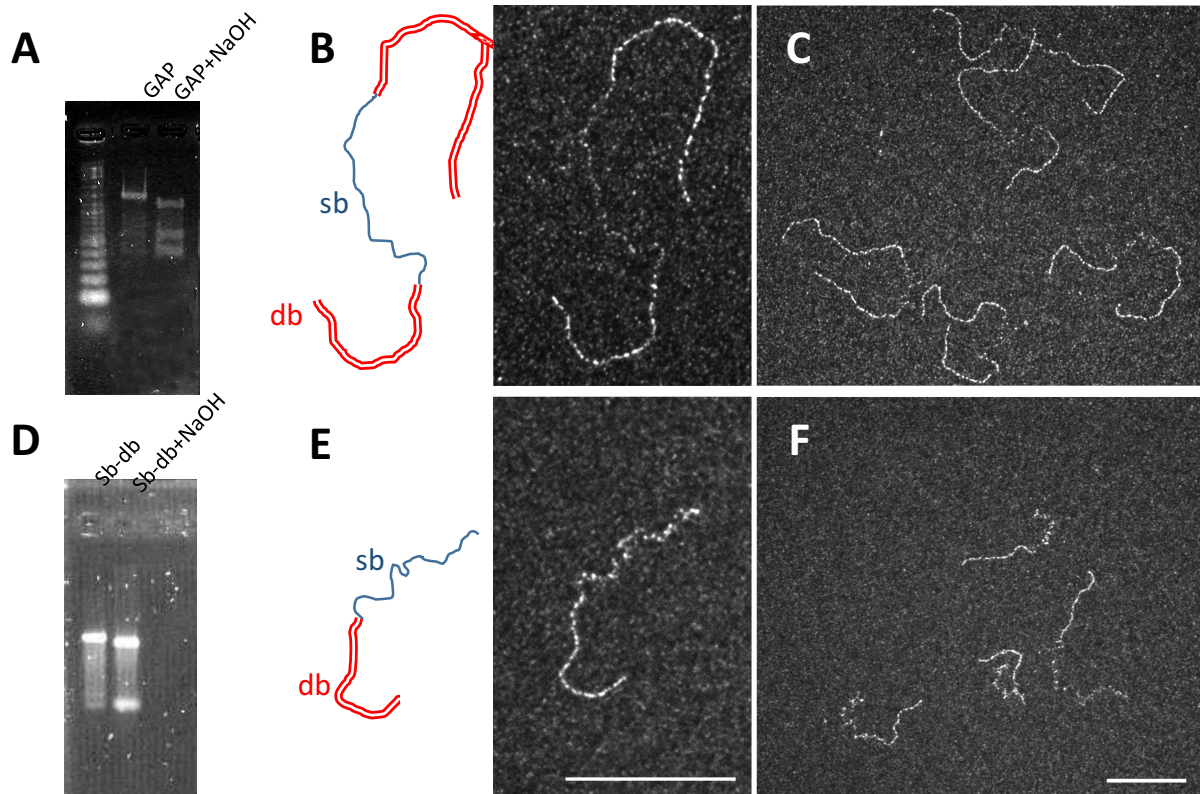


Figure 27 : Construction des substrats d'ADN et caractérisation en MET :

(A) et (D) Analyse en gel de l'intermédiaire sb-db et du substrat gap avec dénaturation, **(B) et (E)** Zoom des intermédiaires en MET, **(C) et (F)** champs MET représentant les intermédiaires sb-db et gap respectivement. La barre d'échelle représente 100nm.

2) Polymérisation de RPA et RAD51 sur les intermédiaires

RPA polymérise et recouvre l'ADN sb

Une incubation de ces intermédiaires avec RPA permet d'étaler l'ADNsb (figure 28A). En effet, RPA est une protéine SSB, se fixe sur l'ADNsb et défait les structures secondaires. En fonction de la quantité de protéines introduites, l'ADNsb est partiellement ou totalement recouvert par RPA (figure 28B). Nous avons observé qu'un recouvrement total de l'ADNsb est obtenu pour une concentration de $0,3 \mu\text{M}$, c'est à dire une protéine pour 30 nucléotides d'ADNsb, ce qui est cohérent avec le fait qu'un hétérotrimère de RPA recouvre environ 28 nucléotides. Des expériences récentes d'AFM (Microscopie à Force Atomique) à haute vitesse en milieu liquide réalisées au laboratoire ont permis d'établir qu'au sein de ces complexes, RPA a un temps de résidence très long sur l'ADNsb, même si elle est extrêmement dynamique et diffuse dans les deux directions (sans polarité).

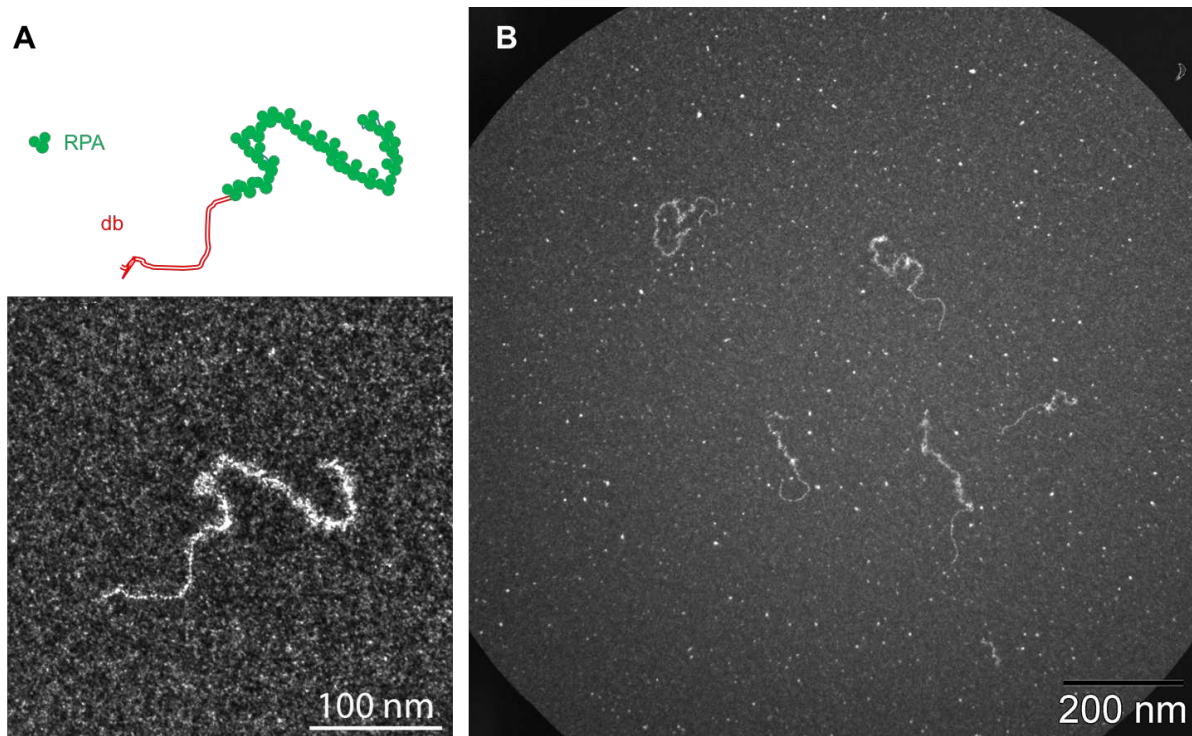


Figure 28 : Fixation de RPA sur l'intermédiaire sb-db

(A) et (B) Zoom et champ de molécules d'ADN sb-db recouverte par RPA

RAD51 polymérise sur l'ADN sb et db avec la même efficacité

Au laboratoire, il a été montré que Rad51 de levure a une plus grande affinité pour la partie sb de l'ADN que pour la partie db. En effet, lorsqu'une concentration limitante de Rad51, inférieure à 3,3 μM , concentration saturante permettant le recouvrement total des molécules, est incubée avec un substrat hybride sb-db (10 μM en nucléotides), elle polymérise en priorité sur l'ADNsb, l'ADNdb reste nu pour la plupart des molécules. Si l'on augmente la concentration de Rad51 (3,3 μM), elle couvre également la partie db et 100 % des molécules dont la partie db est partiellement couverte par Rad51 présentent également Rad51 sur l'ADNsb, suggérant que Rad51 nucléée en priorité sur l'ADNsb puis envahit l'ADNdb (Dupaigne P et al. Mol Cell 2008).

J'ai testé différentes concentrations de RAD51 et j'ai observé qu'introduite à de faibles concentrations (inférieure à 3,3 μM), RAD51 polymérise aussi bien sur la partie sb que sur la partie db (avec des molécules présentant une fixation soit au niveau de l'ADNdb, soit sur l'ADNsb, soit les deux). De plus, RAD51 est capable de polymériser sur des substrats d'ADNdb circulaires ou à extrémités franches, montrant qu'elle est capable de nucléer directement sur l'ADNdb et qu'elle ne nécessite pas une extrémité sb sortante. Cette propriété de RAD51 est importante et pose la question du rôle et des conséquences d'une polymérisation de RAD51 sur l'ADNdb (voir discussion).

RPA fixée sur l'ADNsb empêche la formation d'un filament RAD51

Lorsque le substrat est d'abord incubé avec des concentrations saturantes de RPA (une protéine pour 30 nucléotides, μM) pendant 10 minutes à 37°C, l'ajout de RAD51 entraîne la formation de filaments sur l'ADNdb mais pas sur la partie sb qui reste couverte par RPA. Ainsi, la présence de RPA empêche RAD51 de nucléer mais également de se propager sur la partie sb (figure 29).

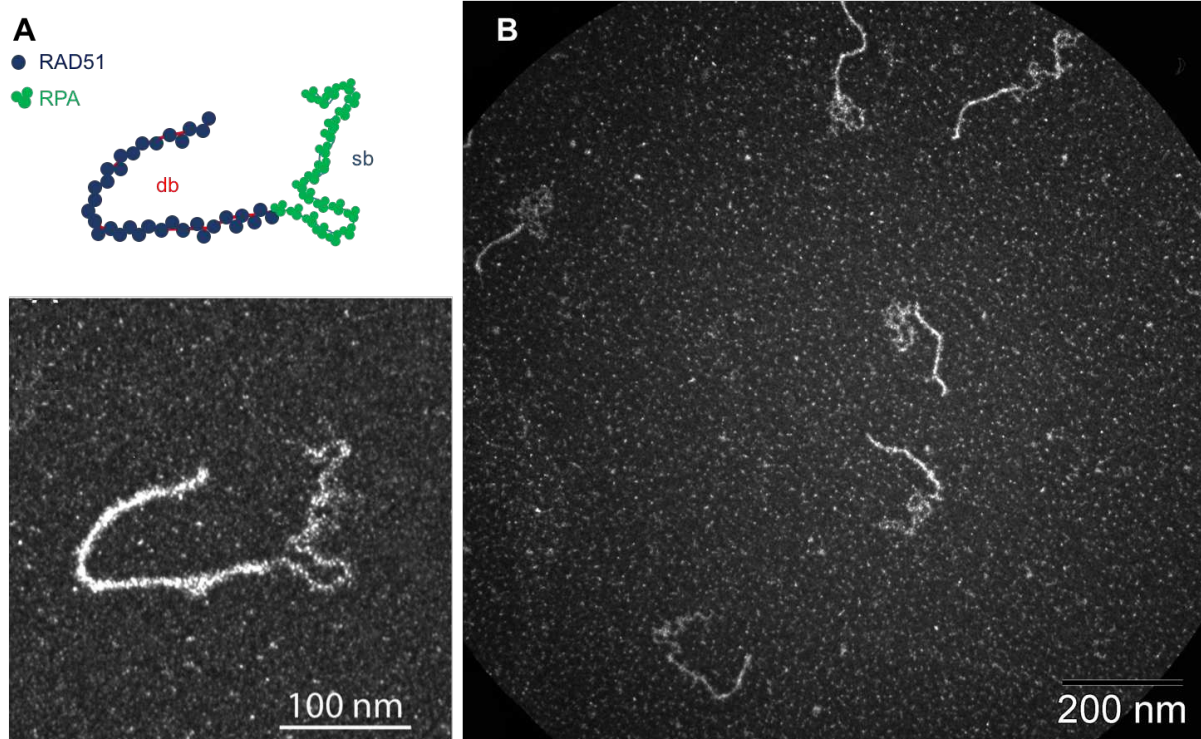


Figure 29 : Fixation de RAD51 sur l'intermédiaire sb-db en présence de RPA

(A) et (B) Zoom et champ de molécules d'ADN sb-db recouverte par RAD51 en présence de RPA

RPA représente alors une barrière physique à la fixation de RAD51 sur la partie sb et il est maintenant clairement établi que des protéines partenaires de RAD51 et médiatrices du filament jouent le rôle de faciliter la nucléation de RAD51 sur l'ADNsb en s'insérant dans le complexe ADNsb-RPA et en recrutant RAD51, voire même en déplaçant RPA de l'ADNsb.

- 3) Effet de BRCA2 et RAD52 sur la nucléation de RAD51 et l'installation du filament RAD51

BRCA2 joue le rôle de médiateur pour l'installation du nucléofilament

BRCA2 est l'homologue fonctionnel de Rad52 de levure, c'est-à-dire qu'elle favorise la nucléation et l'installation du filament RAD51. La protéine BRCA2 a été produite et purifiée par l'équipe de Jean-Yves Masson (Université Laval, Québec, voir Matériel et Méthodes) et obtenue à une concentration finale de 16 nM.

Dans un premier temps, nous avons testé la fixation de BRCA2 sur les substrats sb-db, en présence ou non de RPA. Pour cela, des complexes substrat db-sb-RPA sont préformés, puis BRCA2 est ajoutée dans la réaction à une concentration finale de 0,1 nM, ce qui correspond à une protéine pour une cinquantaine de substrats. Dans ces conditions, l'analyse en MET des complexes formés n'a pas permis de mettre en évidence une fixation de BRCA2. J'ai testé différentes concentrations de BRCA2, sans succès. Avec l'hypothèse que le temps de résidence de BRCA2 sur l'ADN est court et les complexes formés instables, j'ai également ajouté de la glutaraldéhyde (à 0,01% finale) qui est un agent crosslinkant fréquemment utilisé pour stabiliser les complexes ADN-protéine. Ici encore, je n'ai pas observé de complexes BRCA2-ADN.

Dans un deuxième temps, RAD51 a été ajouté au mélange afin de mettre en évidence l'activité médiatrice de BRCA2. L'ajout de 0,1 nM de BRCA2 entraîne une polymérisation totale de RAD51 sur l'ADN, tant sur la partie sb que sur la partie db (figure 30B et 30C). L'analyse quantitative montre un effet médiateur très significatif de la présence de BRCA2 sur la formation de filament RAD51. En effet, seuls 10% de filaments complets sont formés en l'absence de BRCA2, alors qu'on compte 70% de filaments formés en présence de BRCA2 (figure 30D). Ici encore, la fixation de BRCA2 aux filaments n'est pas observée.

Dans une expérience de gel retard, nous montrons également l'effet positif de BRCA2 sur la polymérisation de RAD51, avec l'apparition d'une bande retardée plus nette en présence de BRCA2 (figure 30A), ce qui traduit la présence majoritaire d'une même population qui migre plus lentement dans le gel, correspondant à des filaments plus complets formés en présence de BRCA2.

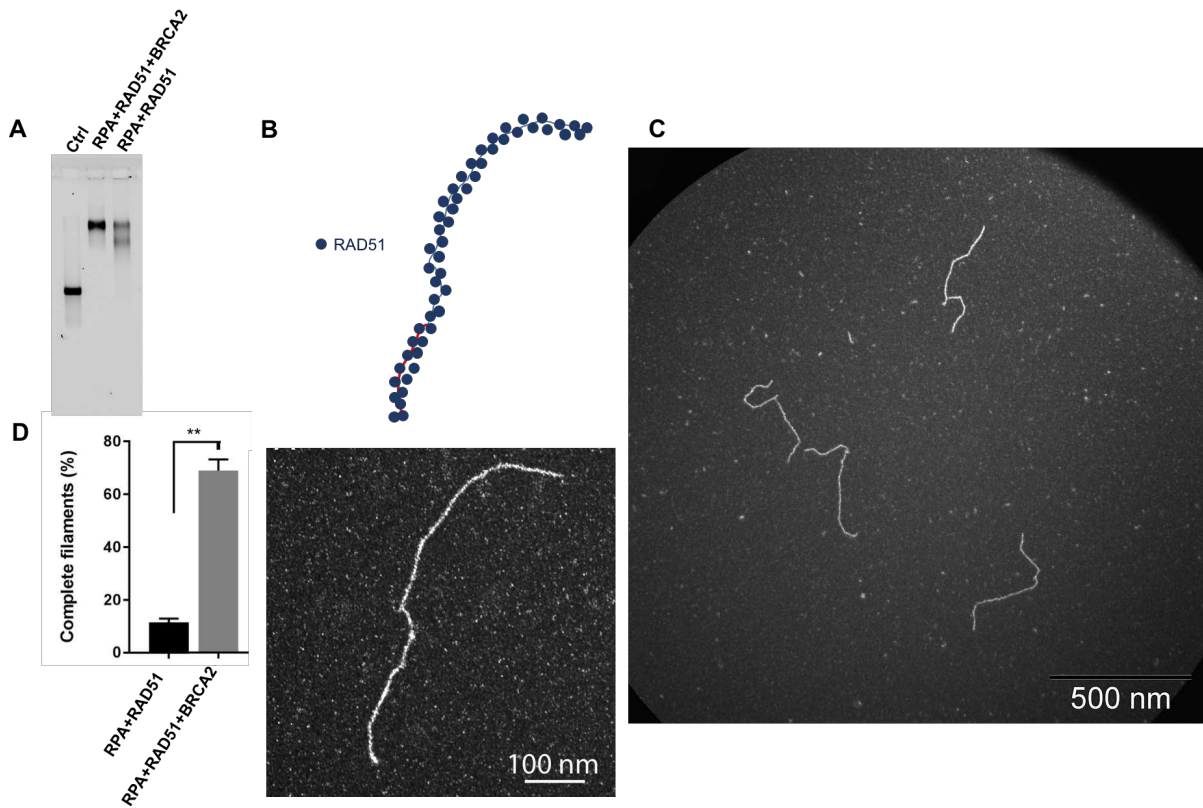


Figure 30 : Effet de BRCA2 sur la polymérisation de RAD51 sur l'intermédiaire sb-db

(A) Expérience de Gel retard RAD51 versus BRCA2, **(B)** et **(C)** Zoom et champ de molécules d'ADN sb-db recouverte par RAD51 en présence de BRCA2 et RPA, **(D)** Histogramme représentant le pourcentage de filaments complets formés en présence de RAD51 versus BRCA2

RAD52 n'a pas d'activité médiatrice sur la mise en place du nucléofilament

J'ai d'abord caractérisé la fixation de RAD52 aux substrats sb-db en présence ou non de RPA (figure 31). RAD52 interagit avec la partie sb et entraîne la formation d'agrégats par rapprochement des zones sb des substrats d'ADN. Ces agrégats impliquent des interactions protéines-protéines ou ADN-protéine-ADN, RAD52 ayant deux sites de liaison à l'ADN et ainsi une capacité à rapprocher des brins d'ADN, ce qui représente une propriété caractéristique des protéines RMP capables de SSA (comme RecFOR d'*E. coli*, DprA de *S.Pneumoniae* ou encore Rad52 de levure). De plus, RAD52 interagit avec l'ADNsb couvert de RPA et forme avec lui des complexes 'nucleosome like', où l'ADN est enroulé autour des oligomères de RAD52. Cette fixation s'accompagne d'une diminution significative de la taille de la zone sb couverte de RPA. Des données structurales ont mis en évidence que les anneaux heptamériques formés par RAD52 exposent des résidus chargés positivement vers l'extérieur qui permettent cet enroulement de l'ADN.

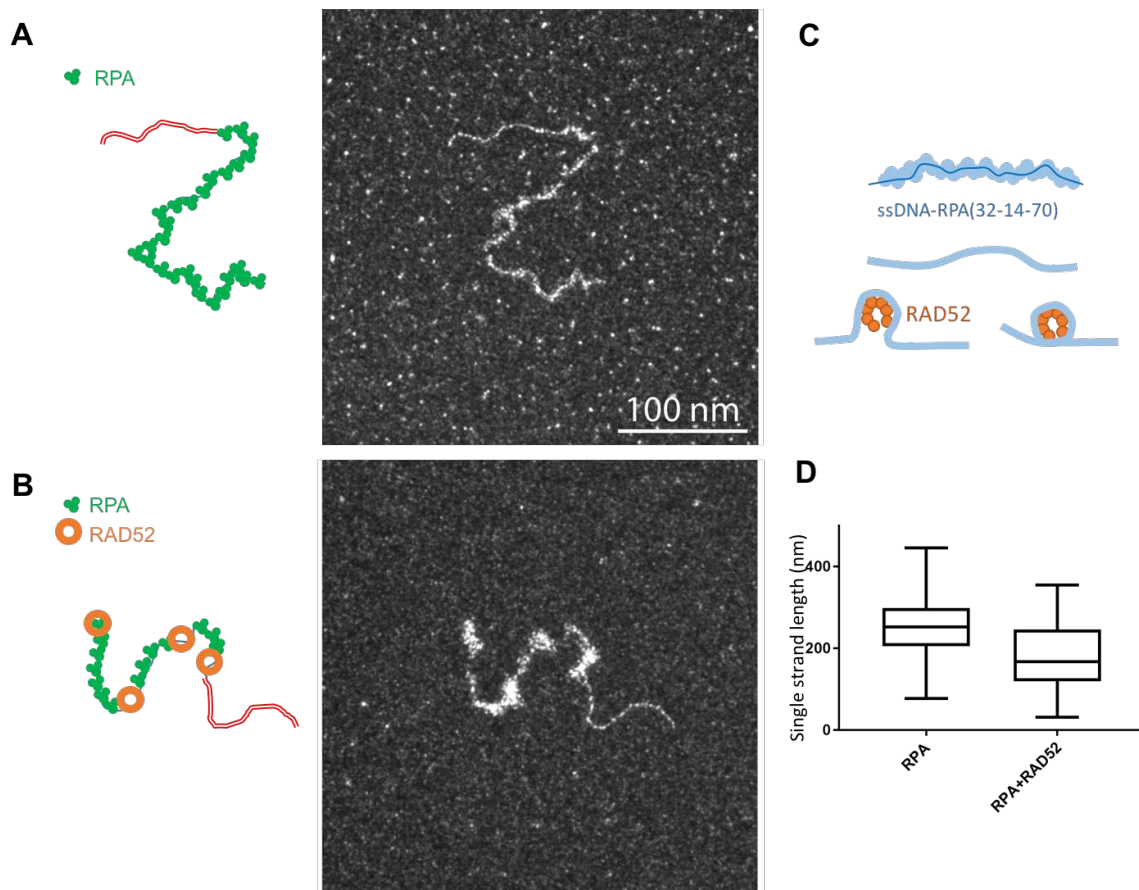


Figure 31 : Effet de la fixation de RAD52 sur l'ADNs

(A) Fixation de RPA sur une molécule d'ADN sb-db, **(B)** Fixation de RAD52 sur une molécule d'ADN sb-db en présence de RPA, **(C)** Schéma des conformations possible de l'ADNs à la suite de la fixation de RAD52 **(D)** Graphique représentant la taille de la région sb en absence ou présence de RAD52.

J'ai ensuite ajouté RAD51, et j'ai pu observer que la présence de RAD52 sur la partie sb ne facilite pas nucléation ni la polymérisation de RAD51 (figure 32). En effet, on constate que RAD51 polymérise essentiellement sur la partie db. Quelques filaments partiels et de petite taille sont parfois formés sur la partie sb. Après une analyse quantitative, aucun effet médiateur de RAD52 sur la polymérisation complète de RAD51 le long du substrat n'a pu être mis en évidence (figure 32E).

En gel retard, nous constatons que la présence de RAD52 entraîne l'apparition d'une bande qui reste dans le puit du gel et qui traduit la présence de complexes de haut poids moléculaire ou agrégats (figure 32B) constitués de plusieurs molécules, suggérant que RAD52 favorise les interactions entre molécules d'ADN couvertes de RAD51 (figure 32A).

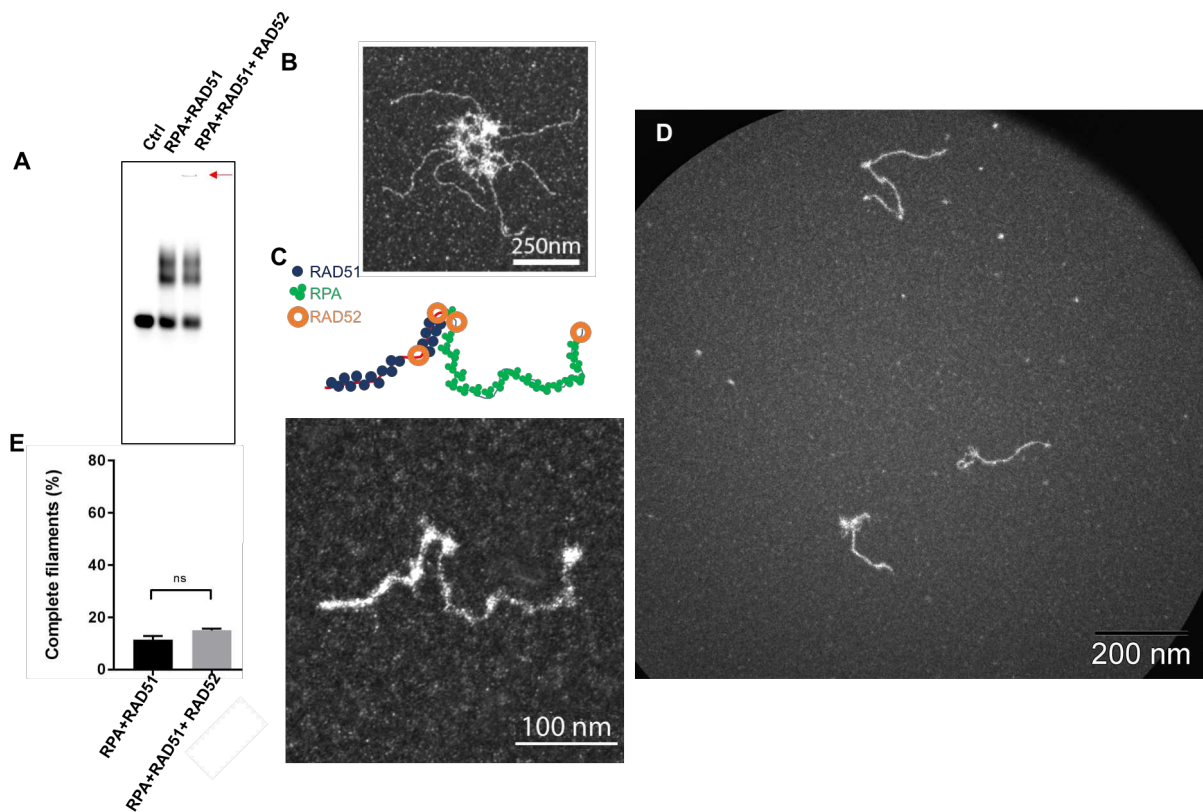


Figure 32 : Effet de RAD52 sur la fixation de RAD51 sur l'intermédiaire sb-db

(A) Expérience de Gel retard RAD51 versus RAD52, la flèche rouge indique la présence de molécules dans le puit du gel ce qui signifie qu'il y a des d'agrégats qui se sont formés et n'arrive pas à rentrer dans le gel **(B)** Formation d'agrégats de plusieurs molécules d'ADNsb-db en présence de RAD52, **(C) et (D)** Zoom et champ de molécules d'ADNsb-db recouverte par RAD51 en présence de RAD52 et RPA, **(E)** Histogramme représentant le pourcentage de filaments complets formés en présence de RAD51 versus RAD52,

RAD52 inhibe l'activité médiatrice de BRCA2

J'ai alors fait varier l'ordre d'ajout des protéines BRCA2 et RAD52 (figure 33). De façon surprenante, si RAD52 est ajoutée avant BRCA2, l'effet médiateur de BRCA2 diminue, le nombre de filaments complets formés n'est plus que de 35 %. Si on ajoute RAD52 après BRCA2, on constate également une diminution de l'effet médiateur de BRCA2, montrant que la fixation de RAD52 sur l'ADNsb couvert de RPA avant l'ajout de RAD51 empêche partiellement son recrutement et l'élongation du filament, même en présence de BRCA2. Ceci suggère que si elle est recrutée tôt, RAD52 forme une barrière à la fixation de RAD51 et pourrait jouer un rôle important quant au choix de la voie de réparation RH/SSA (voir discussion).

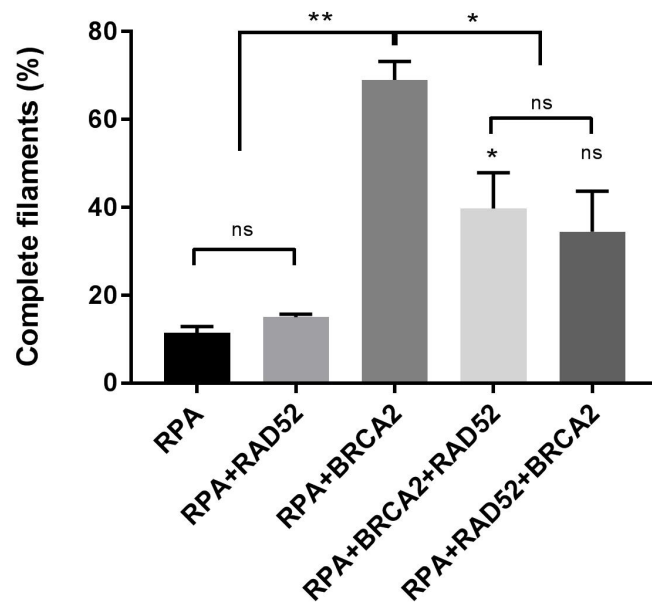


Figure 33 : Histogramme récapitulant la proportion de filaments complets formés en présence des différents acteurs de la RH

4) Architecture des filaments actifs

RAD52 forme des filaments mixtes avec RAD51, contrairement à BRCA2

Pour étudier l'architecture des filaments, les filaments RAD51 complets sont formés en présence des différents acteurs. Cette fois, RAD51 est introduite d'abord, puis quelques minutes après, RPA, en quantité non saturante. Ici, RAD51 nucléé sur l'ADNsb et RPA permet l'élongation complète du filament en défaisant les structures secondaires. Dans ces conditions, on obtient presque 100 % de filaments complets et continus comme sur la figure 34 A. La coloration négative permet d'analyser l'architecture du filament, son hélicité, sa régularité. RAD52 ou BRCA2 sont ajoutés dans la réaction après RAD51 et avant RPA. Les filaments formés en présence de BRCA2 sont semblables à ceux formés en présence de RAD51 seul et l'analyse en coloration négative ne met en évidence de différence d'organisation du filament. D'autre part, nous n'avons pas observé la fixation de BRCA2 au sein des filaments formés.

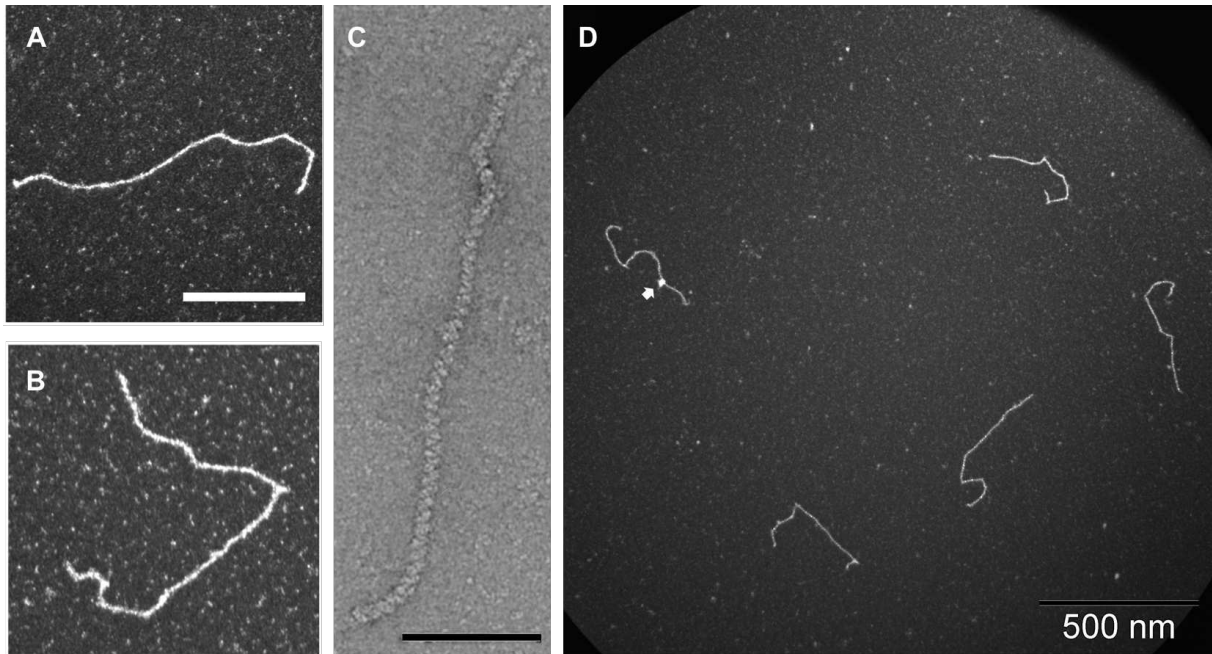


Figure 34 : Architecture des filaments RAD51 formés en présence de BRCA2 :

(A),(B) et (D) Zoom et champ de molécules d'ADN sb-db recouverte par RAD51 en présence de BRCA2 et RPA, **(C)** Substrat sb-db en coloration négative en MET formé en présence de BRCA2 et RAD51.

Au contraire, l'ajout de RAD52 entraîne la formation de filaments discontinus, c'est à dire dont la périodicité de la structure hélicoïdale est interrompue : on observe la formation de points plus brillants (marqués par des flèches sur la figure 35 C) qui suggèrent la présence de RAD52. La coloration négative met en lumière l'architecture de ces nucléofilaments mixte, notamment ces interruptions de l'hélicité. Nous avons confirmé la formation de filaments mixtes RAD51-RAD52 à l'aide d'anticorps monoclonaux dirigés contre RAD52 et d'anticorps secondaires couplés à des billes d'or (voir figure).

De plus, les filaments RAD51 mixtes formés en présence de RAD52 présentent une diminution évidente de taille, comparée aux filaments RAD51 purs. Après quantification, cette diminution apparaît très significative, d'environ 30 % (figure 36). De façon intéressante, la taille obtenue pour chaque filament est liée au nombre de points brillants des molécules, c'est à dire qu'elle est d'autant plus petite qu'il y a d'interruptions du filament par RAD52, suggérant ici encore un enroulement de l'ADNsb autour de RAD52, au sein des filaments RAD51. Les filaments RAD51 formés en présence de BRCA2 sont plus longs, continus et plus complets que les filaments RAD51 canoniques. Ceci suggère que BRCA2 en interagissant avec RAD51 joue un rôle en stimulant fortement la formation de ces filaments, sans pour autant prendre part à sa composition, contrairement à RAD52. Les deux types de filaments pourraient jouer des rôles différents dans le mécanisme de RH (voir discussion).

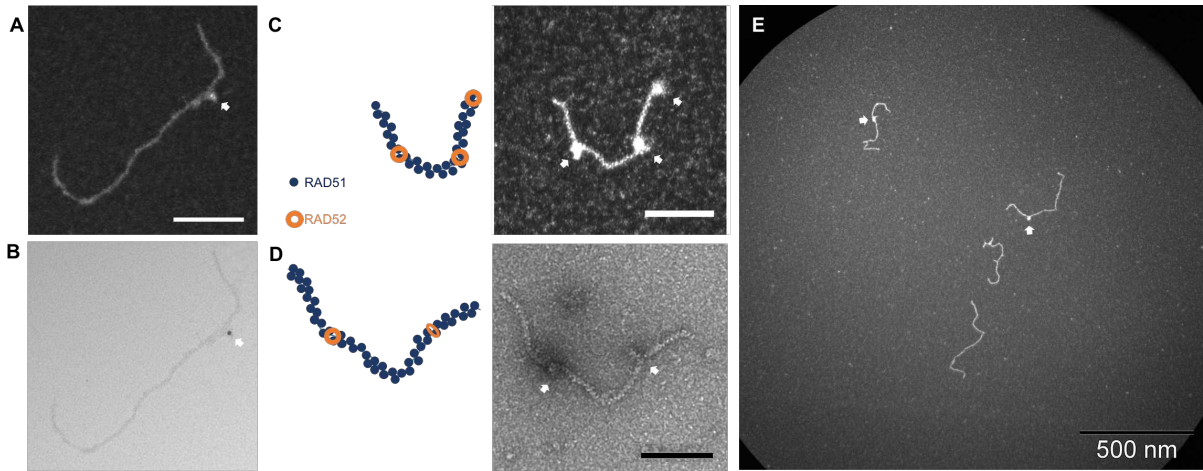


Figure 35 : Architecture des filaments RAD51 formés en présence de RAD52

(A) et (B) Filament RAD51 formé en présence de RAD52, les flèches indique la présence de billes d'or qui montre la présence de RAD52 au sein des filaments, (C),(D) et (E) Zoom et champ de molécules d'ADNsb-db recouverte par RAD51 en présence de RAD52 et RPA. Les flèches blanches représentent la présence de RAD52 au sein du filament, les barres d'échelles représentent 100 nm.

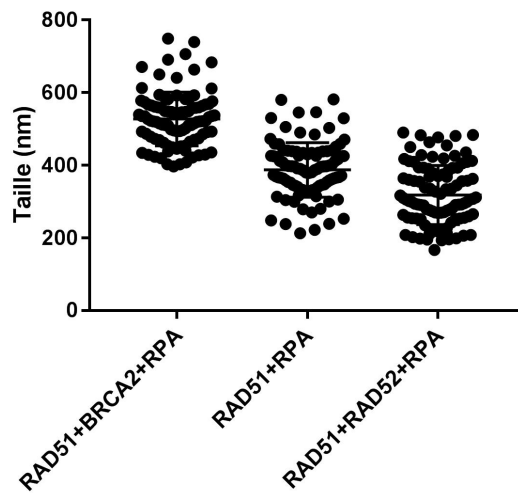


Figure 36 : Tailles des filaments RAD51 formés en présence des différents acteurs de la RH

D. Discussion

Dans cette étude avons caractérisé les filaments RAD51 formés en présence des protéines partenaires BRCA2 et/ou RAD52, en déterminant leur formation, leur architecture, ainsi que leur composition. Nous avons montré que RAD51 polymérise sur l'ADNsb et db. Nous confirmons le rôle de BRCA2 dans la médiation du filament RAD51, sans pour autant participer à sa composition. Pour cette activité médiatrice, il suffit d'une très faible concentration de BRCA2. Il a été suggéré par S. Kowalczykowsky qu'un rôle de BRCA2 pourrait être de se fixer à la jonction sb-db et favoriser une polymérisation de RAD51 sur l'ADNsb dans le sens 5' vers 3' en partant de la jonction, restreignant ainsi la polymérisation de RAD51 sur l'ADNsb. S. Kowalczykowsky nous avait également conseillé de réduire la concentration de RAD51 afin de limiter sa fixation à l'ADNsb. Ainsi, j'ai testé un certain nombre de conditions afin de tenter de mettre en évidence la fixation de BRCA2 à l'ADN (variations de concentration, du temps d'incubation, présence de sel, utilisation d'agent crosslinkant...), mais je n'ai pas pu identifier la formation de complexes ADN-BRCA2 stables. Deux hypothèses peuvent rendre compte de ce résultat : soit BRCA2 est très labile et dynamique, avec un temps de résidence très court sur l'ADN, soit elle agit et active RAD51 principalement en dehors de l'ADN. De plus, je n'ai pas trouvé de conditions dans lesquelles RAD51 polymérise exclusivement l'ADNsb. Nous pensons que des protéines telles que RAD54 pourraient jouer le rôle d'antirecombinase en enlevant RAD51 de l'ADNdb et en limitant la formation des filaments RAD51 sur l'ADNdb. Ce résultat suggère que des intermédiaires dans lesquels RAD51 polymérise sur l'ADNdb peuvent être formés transitoirement.

Chez la levure, Rad52 jouant le rôle de protéine RMP forme des filaments mixtes avec Rad51. Nous confirmons ici que RAD52 humaine n'a pas d'effet positif sur l'assemblage du filament RAD51. De plus, RAD52 inhibe l'effet médiateur de BRCA2. Ainsi, le recrutement très précoce de RAD52 au niveau de l'ADNsb d'une CDB ou d'une fourche arrêtée pourrait jouer un rôle inhibiteur de la RH en faveur d'une voie indépendante de RAD51 comme le SSA. Dans un travail collaboratif avec l'équipe de Bernard Lopez, nous avons testé l'hypothèse d'une compétition des protéines de la réparation au site d'une CDB après résection et avons montré que le recrutement des protéines détermine le choix de la voie de réparation (Chapitre VIII).

Dans un deuxième temps, nous montrons que, comme chez la levure, RAD52 est capable de former des filaments mixtes avec RAD51. Ainsi les filaments formés sont interrompus et plus courts. Les filaments formés soient en présence de BRCA2 ou de RAD52 pourraient avoir des propriétés différentes et jouer des rôles variables dans le mécanisme de RH selon le contexte, par exemple dans une région du génome contenant des séquences répétées. Il est important de tester l'activité de ces filaments dans la recherche d'homologie et l'invasion de brin.

VI. ÉTUDE DE LA RECHERCHE D'HOMOLOGIE : COMPLEXES SYNAPTIQUES ET D-LOOP

A. Introduction

Le nucléofilament procède à la recherche d'homologie par un mécanisme de 'sampling', en établissant des contacts très transitoires avec l'ADNdb donneur. Mon équipe a montré que chez la levure, ce processus de recherche d'homologie est dépendant de Rad54 (Tavares Em et al. 2019). Lorsque l'homologie est trouvée, le contact entre le filament et l'ADNdb donneur se stabilise et entraîne la formation du complexe synaptique, intermédiaire à trois brins maintenu par RAD51, (Christiansen G and J 1986). La D-loop se forme lorsque le brin envahissant s'aligne avec son brin complémentaire (formation de l'hétéroduplex), il y a alors transfert de brin et déplacement du brin non complémentaire pour former la D-loop. Chez *S. cerevisiae*, Rad54 est strictement requise pour la formation *in vitro* des complexes synaptiques et de la D-loop (Tavares Em et al. 2019; Christiansen G and J 1986; Shibata T et al. 1979), formant une unité fonctionnelle avec Rad51. RAD51 humaine seule peut former des D-loop, bien que la réaction soit fortement stimulée en présence de RAD54 (Mazina and Mazin 2004; Bugreev Dv and Av 2004; Spies J et al. 2016). Les étapes de recherche d'homologie, formation du complexe synaptique et formation de la D-loop ainsi que l'architecture de ces intermédiaires restent à préciser dans un contexte avec ou sans RAD54. De plus, récemment, un rôle post-synaptique de BRCA2 a été proposé dans lequel BRCA2 stabiliserait la D-loop en interagissant directement avec les protéines RAD51 en excès, il semble que la balance stoechiométrique RAD51-BRCA2 soit très contrôlée et importante pour la régulation et la résolution de la D-loop (Wang Cx et al. 2019; Magwood Ac et al. 2013). Les rôles de BRCA2 et de RAD52 dans la formation et l'architecture des complexes synaptiques restent à étudier.

B. Matériels & Méthodes

Formation de complexe synaptique et analyse en MET

La réaction contient 10 mM Tris-HCl pH7,5, 50 mM NaCl, 2 mM CaCl₂, 1,5 mM ATP, 1 mM DTT, 5,7 nM molécules (9 μM nt) de substrat d'ADN sb-db marqué au Cy5. RAD51 a été introduite à une concentration finale de 3 μM (1 protéine pour 3 nucléotides) pendant 10 minutes. 0,3 μM RPA (1 protéine pour 30 nucléotides) sont ajoutées pendant 10 minutes supplémentaires à 37°C. Le pUC19 (New England Biolabs), plasmide superenroulé contenant une séquence homologue au substrat est ajouté au mélange réactionnel à une concentration finale de 17nM molécules durant 30 minutes à 37°C. La réaction est ensuite diluée 25x dans le tampon réactionnel pour être étalé en vue d'être analysé en MET. Les images sont prises à une magnification de 85 000x à l'aide d'une caméra Veleta CCD puis analysé avec le logiciel iTEM (Olympus Soft Imaging Solution).

Essai D-loop in vitro

10 µL de la même réaction sont déprotéinisés à l'aide de 2mg/ml de protéinase K en présence de 1% de SDS et 25mM d'EDTA pendant 30 minutes à 37°C. Puis la réaction est analysée par électrophorèse sur gel d'agarose 1,5%, 1% TAE (Tris Acetate EDTA) qui migre à 80V pendant 45 minutes. Le gel est analysé à l'aide d'un Typhoon FLA 9500 (GE Healthcare Life Sciences).

Marquage immunologique couplé aux bille d'or des filaments présynaptiques et analyse des synapses

Le volume réactionnel contient 10 mM Tris-HCl pH7,5, 50 mM NaCl, 2 mM CaCl₂, 1,5 mM ATP, 1 mM DTT, 22,8 nM molécules (36 µM nt) de l'ADN sb-db marqué au Cy5. RAD51 est incubé pendant 10 minutes à 37°C à une concentration finale de 12 µM. 0,4 nM de RAD52 sont ajoutés à la réaction pendant 5 minutes supplémentaires. Ensuite RPA est ajouté à une concentration finale de 0,12 µM pendant 10 minutes à 37°C. L'homologue double brin (pUC19), est ajouté au mélange réactionnel à une concentration finale de 17nM molécules durant 30 minutes à 37°C. Les complexes sont crosslinkés à l'aide de 0,01% de glutaraldéhyde et laissé à température ambiante pendant 5 minutes. On ajoute ensuite 4 µL d'anticorps monoclonaux de lapin Anti-RAD52 (Sigma SAB2702174) pour une concentration finale de 0,11mg/ml à température ambiante durant 10 minutes, puis on ajoute à nouveau 2 µL de glutaraldéhyde (0,5%) et on laisse la réaction 5 minutes à température ambiante. Pour finir, le marquage secondaire est effectué à l'aide de 5,5 µL d'anticorps anti-lapin couplés à des billes d'or de 6 nm de diamètre. La réaction est laissée à température ambiante pendant 10 minutes, puis passée sur une colonne superose de chromatographie. Les complexes d'intérêt sortent dans le volume exclu, sont collectés dans un tube puis étalés sur une grille de MET afin d'être analysés.

C. Résultats

1) Rôles des médiateurs dans la recherche d'homologie

RAD51 seul catalyse la formation de complexes synaptiques dont une petite proportion est stabilisée en D-loop

Les filaments présynaptiques sont formés comme décrit précédemment puis le plasmide db homologue donneur est ajouté à la réaction. L'analyse en MET permet de mettre en évidence la formation de molécules jointes ou complexes synaptiques caractérisés par l'interaction entre un filament RAD51 et l'ADN db homologue (figure 37 A). De façon surprenante, j'ai pu compter une proportion très élevée (43%) de complexes synaptiques formés lorsque les filaments sont formés par RAD51 seule, alors que la déprotéinisation réduit considérablement la quantité de molécules jointes (analysées en gel) puisque seules 6% de molécules jointes sont détectées (figure 37D). Ceci suggère que le processus de recherche d'homologie passe par la formation de nombreux contacts entre le filament et l'ADN donneur,

stabilisés par RAD51 et que seule une petite proportion (6%) des molécules jointes observées représente des D-loop dans lesquelles l'appariement homologue a eu lieu.

Afin de savoir si la formation de ces complexes synaptiques est dépendante de l'homologie, j'ai réalisé la même expérience en introduisant, cette fois, un ADNdb donneur hétérologue (PhiX174 RFI). J'ai compté 38% de complexes synaptiques formés dans ces conditions, ce qui reste une proportion élevée (figure 37B). De façon intéressante, on note que les 6% de D-loop quantifiées représentent presque la différence entre la proportion de complexes synaptiques formés en présence de l'ADN homologue et hétérologue ($43(\text{homologue})-38(\text{hétérologue})=5$). Ce résultat montre que la formation des complexes synaptiques médiée par RAD51 est en partie indépendante de l'homologie et qu'environ 15% de ces complexes sont stabilisés par l'appariement au travers les liaisons Watson-Crick et la formation de l'hétéroduplex entre les séquence homologues, ce qui est très différent de ce que l'on a observé chez la levure (voir discussion).

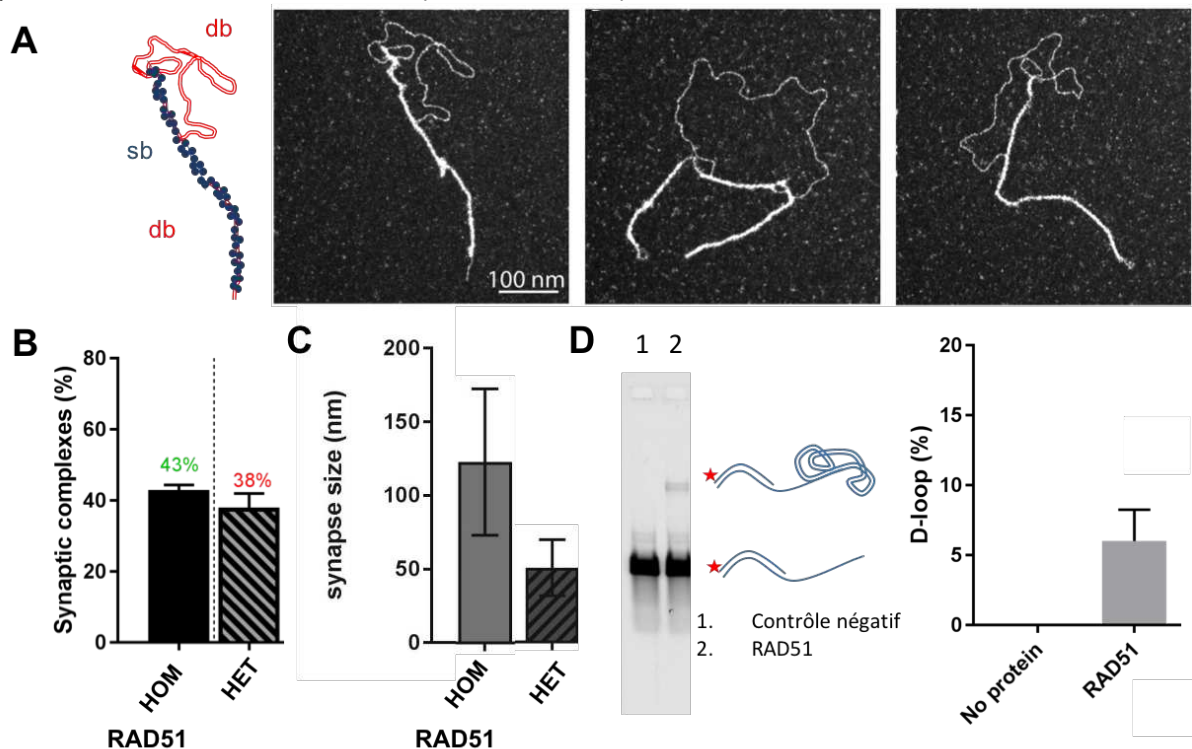


Figure 37 : Formation de complexes synaptique

(A) Panel représentant les complexes synaptiques en MET, (B) Pourcentage de complexes synaptiques formés en présence de RAD51 avec un ADN db donneur homologue versus hétérologue, (C) Taille des synapses formés avec un ADN db donneur homologue versus hétérologue en présence de RAD51, (D) Essai D-loop en absence de protéine versus la présence de RAD51 et sa quantification.

BRCA2 n'a pas d'effet dans la recherche d'homologie

Lorsque BRCA2 est ajoutée dans la réaction en même temps que RAD51, on observe une très légère augmentation de la proportion de ces complexes synaptiques (+ 2%) qui apparaît non significative, de même qu'une légère augmentation de la proportion de D-loop (+ 2%), elle aussi non significative. Nous proposons que cette variation peut être la conséquence d'une quantité plus importante de filaments complets formés en présence de BRCA2, ces filaments étant compétent pour la recherche d'homologie.

RAD52 augmente significativement la proportion des complexes synaptiques et des D-loop

De façon spectaculaire, la formation des complexes synaptiques formés est fortement stimulée en présence de RAD52 (72%, + 29% par rapport à la réaction contrôle sans RAD52) (figure 38D), de même que la proportion de D-loop qui est également significativement augmentée (17%, + 11% par rapport à la réaction contrôle sans RAD52) (figure 38F). Afin de savoir si l'effet positif de RAD52 observé ici est spécifique de l'homologie, nous avons également quantifié la proportion des molécules jointes formées avec un ADNdb donneur hétérologue. Ici aussi, on met en évidence une stimulation de la formation des complexes synaptiques (50%, + 12% par rapport à la réaction contrôle sans RAD52). Ce résultat montre que RAD52 augmente non seulement les contacts stabilisés par RAD51 entre les filaments RAD51 et l'ADNdb hétérologue, indépendamment de l'homologie, mais stimule aussi de façon importante en doublant la proportion de molécules jointes dans lesquelles l'hétéroduplex est formé par appariement homologue (ici 24% de la totalité des complexes synaptiques sont des D-loop, comparé à 12% dans la réaction sans RAD52).

Nous avons montré que RAD52 forme avec RAD51 des filaments mixtes. Ainsi, nous proposons que la présence de RAD52 au sein des filaments stimule leur activité d'invasion de brin et d'appariement homologue. Afin de caractériser l'architecture des complexes synaptiques formés en présence de RAD52 et de déterminer si RAD52 persiste au sein des structures et sa potentielle localisation, j'ai mis en place un marquage spécifique de RAD52 à l'aide d'anticorps primaires anti-RAD52 et d'anticorps secondaires couplés à des billes d'or. La MET en champs sombre/clair permet de localiser de façon spécifique RAD52 (figure 38B). Sur un certain nombre de complexes synaptiques, j'ai pu constater la présence de RAD52 au niveau de la zone de contact entre le nucléofilament envahissant et l'ADNdb donneur, ou de part et d'autre de cette zone. Cette expérience ne permet pas une quantification précise en raison du grand nombre de fixations aspécifiques des anticorps et des billes d'or. Dans les meilleures conditions testées, dans lesquelles la fixation aspécifique est limitée, seules 2% des molécules jointes présentent RAD52 au niveau de la zone de contact.

De plus, la présence de RAD52 stimule les invasions multiples, c'est à dire augmente très significativement la proportion de molécules jointes dans lesquelles un filament RAD51 est en contact avec plusieurs ADNdb donneurs homologues, comme on peut l'observer sur les images A de la figure 38. Tous ces résultats montrent qu'en formant des filaments mixtes avec RAD51, RAD52 pourrait jouer un rôle synaptique et donc plus tardif dans le mécanisme de RH. Nous proposons que cet effet de RAD52 pourrait impliquer sa propriété de créer des

interactions ADN-protéine-protéine-ADN. Cette activité pourrait jouer un rôle important dans la mécanistique de la RH (voir discussion).

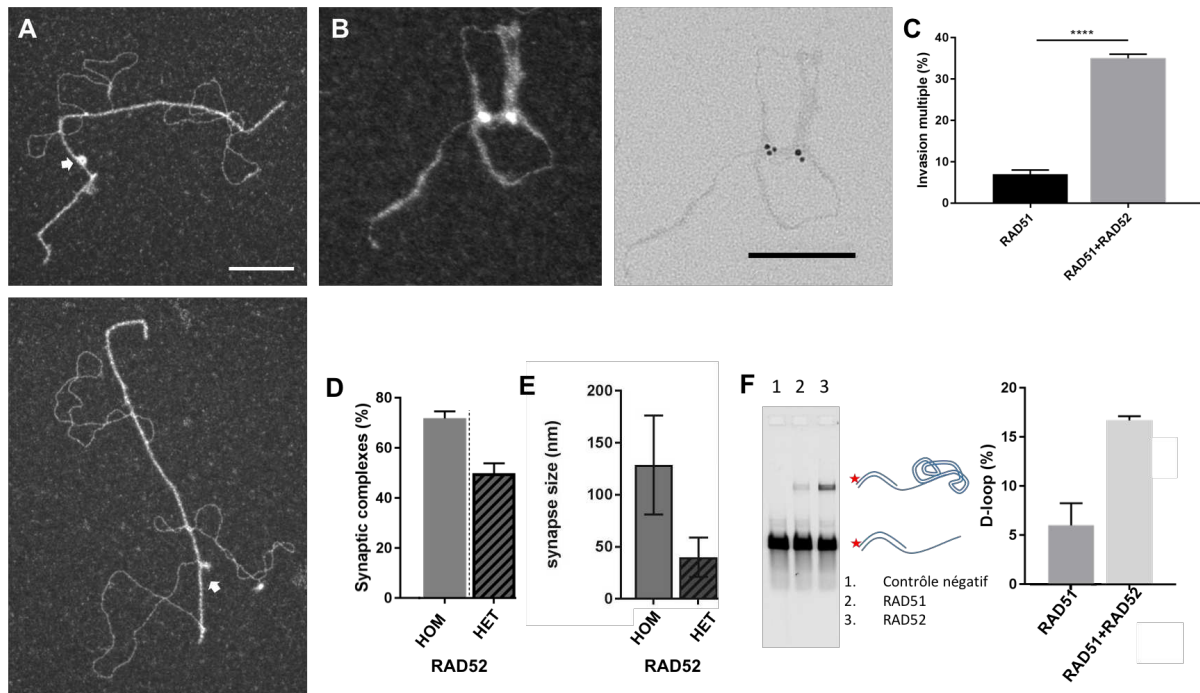


Figure 38 : Formation de complexes synaptique en présence de RAD52

(A) Complexes synaptiques formés en présence de RAD52 avec une double invasion, analysés en MET, les flèches blanches supposent la présence de RAD52, (B) Zoom sur un complexe synaptique formé en présence de billes d'or dirigées contre RAD52 (coloration positive à gauche et négative à droite), (C) Pourcentage d'invasions multiples en absence ou en présence de RAD52 (D) Pourcentage de complexes synaptiques formés en présence de RAD52 avec un ADN db donneur homologue versus hétérologue, (E) Taille des synapses formés avec un ADN db donneur homologue versus hétérologue avec RAD52, (F) Essai D-loop en présence de RAD52 et sa quantification. Les barres d'échelles représentent 100 nm.

Architecture des complexes synaptiques

J'ai également mesuré la taille de la zone de contact afin de mettre en lumière un potentiel effet de RAD52 ou BRCA2 sur la jonction. Avec RAD51 seule, je mesure une taille de 125 nm en moyenne, ce qui équivaut à 245 pb après avoir appliqué la correction liée au taux d'élongation de l'ADN par RAD51 (d'un facteur 1.5). Je n'ai pas constaté de différence significative de cette taille en présence de BRCA2, ni RAD52. Cependant, je montre une diminution importante de la taille de cette zone de contact au sein des complexes synaptiques formés par le nucléofilament avec l'ADNdb hétérologue. Ainsi, on mesure une taille inférieure à 50 nm (soit inférieure à 98 pb), toujours sans différence significative en présence de RAD52 ou BRCA2. Ceci montre que si la capacité de RAD51 à sonder l'ADNdb en établissant des contacts avec lui (sampling) ne dépend pas de l'homologie, RAD51 seule est capable de

trouver l'homologie pour former des complexes synaptiques avec une zone de jonction plus large.

D'autre part, si l'on compare le nombre d'enlacements des plasmides db donneurs (pUC19) libres et de ceux liés à un filament, c'est à dire le nombre de fois où les brins se croisent, on met en évidence que dans la majorité des molécules jointes, soit 82%, le nombre d'enlacement est inférieur à 2, suggérant que l'implication du plasmide dans une molécule jointe entraîne un relâchement de la contrainte topologique (super-enroulement négatif) du reste de la molécule (Figure 39C). Dans les conditions de la réaction, le nombre de croisements mesuré pour les plasmides libres varie entre 0 et 10. Ce relâchement peut résulter soit du recouvrement de la zone de contact par RAD51, ce qui entraîne un déroulement partiel de la double hélice (augmentation de 1,5 fois la longueur de l'ADN et périodicité de 18,6 pb) et induit une diminution du nombre de croisements de 0,081 par nm d'ADN de la zone de contact ($- 0,081 \times 125 = - 10,125$ en moyenne). Il peut également résulter de l'ouverture totale de la double hélice dans la zone du plasmide engagée dans la jonction liée à l'appariement homologue et au déplacement du brin complémentaire (D-loop). Au contraire, les contacts hétérologues n'entraînent pas de changement topologique. Ainsi, ces résultats montrent que dans les molécules jointes, la conformation de l'ADN au sein de la zone de contact recouverte par RAD51 est modifiée de façon dépendante de l'homologie, ce qui a des répercussions sur la topologie de l'ADN donneur. Ceci va dans le sens de la formation de structure à trois brins recouverte par RAD51, de façon dépendante de l'homologie.

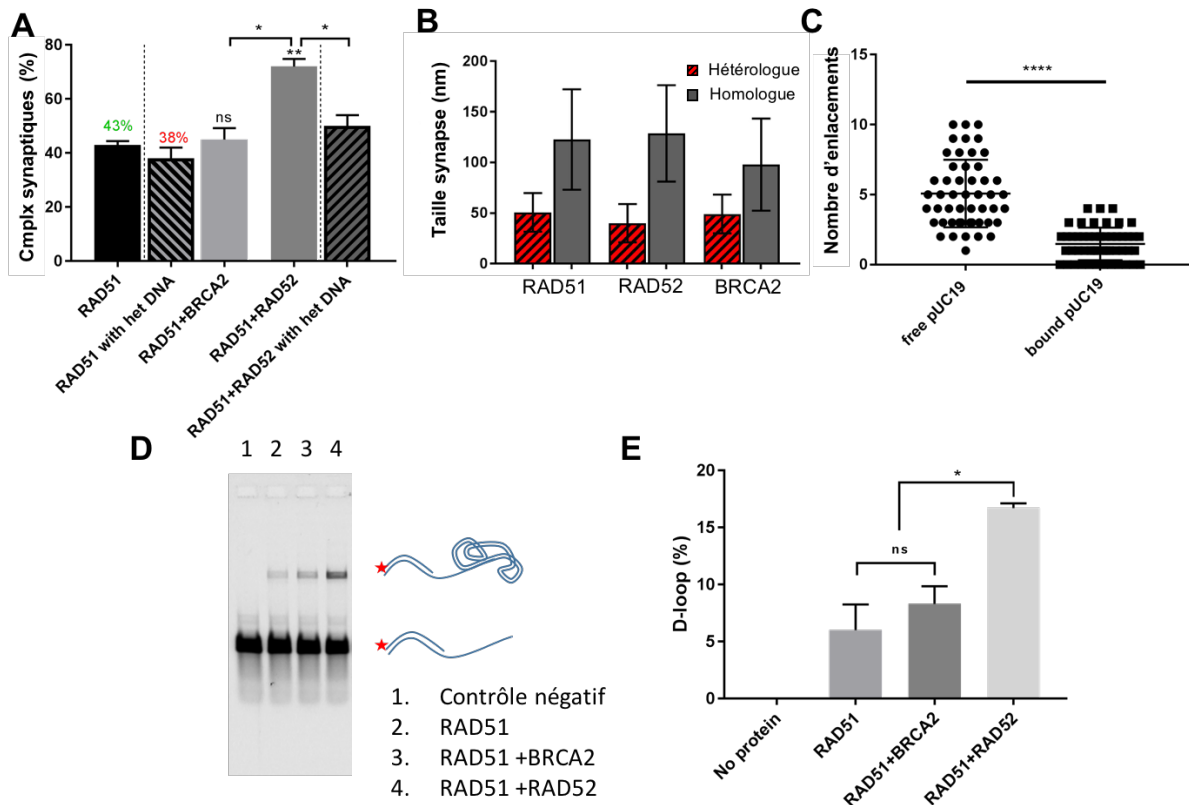


Figure 39 : Formation de complexes synaptique et de D-loop en fonction de la présence des différents acteurs de la RH

(A) Histogramme du pourcentage de complexes synaptiques formés en présence des différents acteurs de la RH, les données à rayures représentent les expériences effectuées avec un ADN db hétérologue, **(B)** Histogramme représentant la taille des synapses en présence des différentes protéines, **(C)** Nombre d'enroulements de l'ADNdb libre et impliqué dans un complexe synaptique, **(D)** Essai D-loop avec les différents acteurs de la RH, **(E)** Quantification de 3 expériences différentes sur l'essai D-loop.

2) Microhomologie

Dans le cadre d'une collaboration avec l'équipe de Bernard Lopez (Institut Cochin, Paris), j'ai étudié l'impact de la présence de petites séquences homologues sur la recherche d'homologie à l'aide de différents substrats possédant une ou deux régions homologues de 9 nt placées à différentes positions (à l'extrémité du brin, au milieu ou les deux). Pour cela j'ai réalisé un essai D-loop en préformant les filaments RAD51 sur ces substrats, puis en ajoutant l'homologue double brin donneur dans la réaction (figure 40). Avec ces substrats, le rendement du test D-loop après déprotéinisation et migration sur gel est trop faible car la proportion de molécules jointes stables formées est négligeable. Cependant, l'analyse statistique en MET permet de caractériser les complexes synaptiques stabilisés par RAD51, beaucoup plus nombreux. Je montre qu'en présence d'un substrat 100% homologue contenant une extrémité sortante de 100 nt, j'observe 22% de complexes synaptiques (comparé à 43% avec un substrat de 1000 nt d'ADNsb), ce qui montre que la taille de l'ADNsb envahissant est importante. Je montre également qu'en l'absence d'homologie (avec des substrats 100% hétérologues), 15% de complexes synaptiques sont formés. Les comptages obtenus pour les différents substrats n'ont pas permis dans nos conditions d'avoir des résultats significatifs.

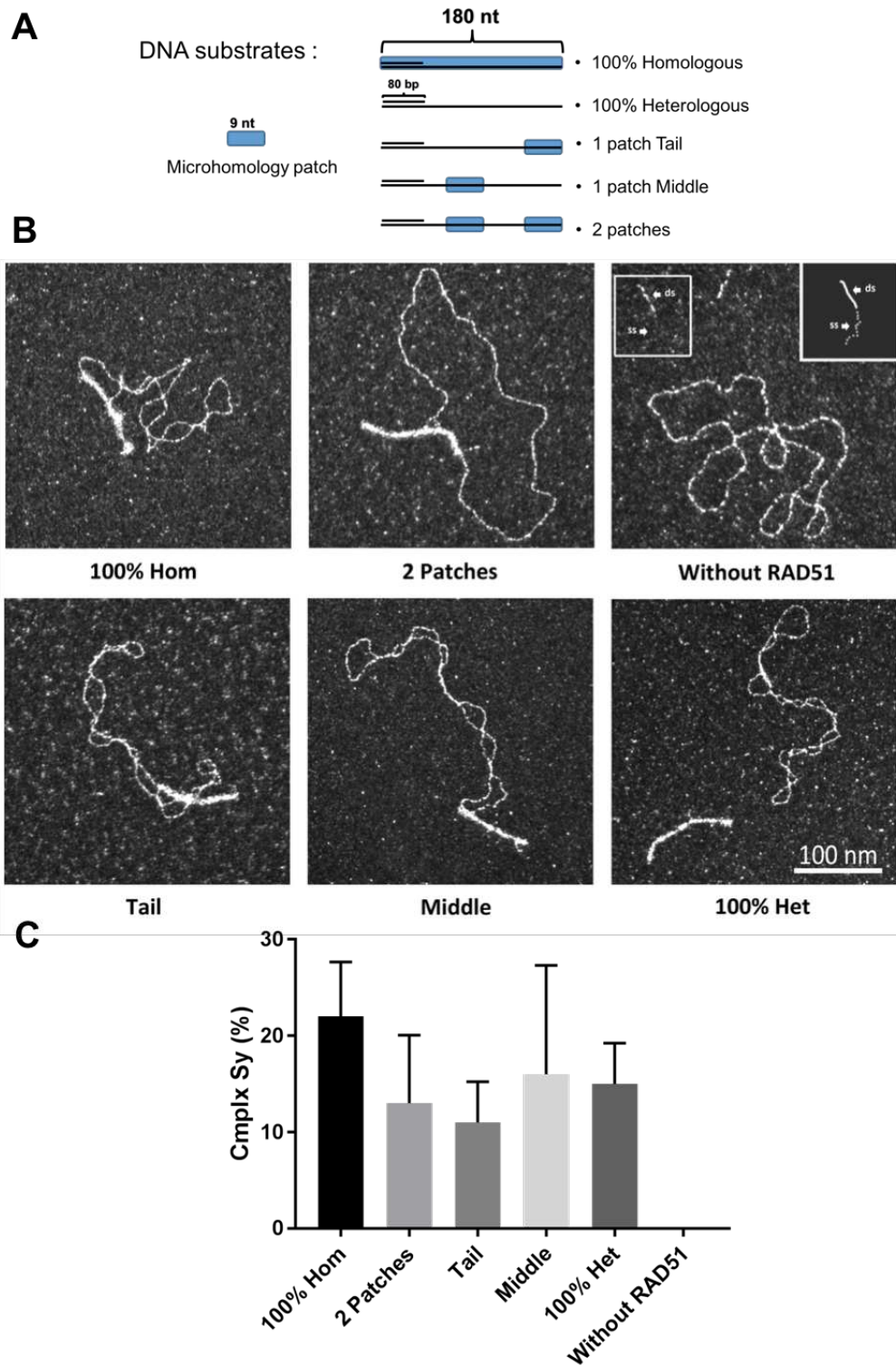


Figure 40 : Formation de complexes synaptique en présence de microhomologies :

(A) Schéma représentant les différents substrats utilisés possédant pour certains des patches de microhomologies, (B) Complexes synaptiques formés avec les différents substrats, (C) Quantification des complexes synaptiques formés avec les différents substrats.

D. Discussion

Nous avons montré dans ce chapitre que RAD51 humaine seule est capable, en polymérisant le long d'un substrat ADNsb-db et en formant des filaments présynaptiques, d'établir des contacts stables avec des ADNdb donneurs homologues sous la forme de complexes synaptiques appelés aussi molécules jointes. L'utilisation de la MET à l'avantage de pouvoir caractériser les molécules jointes stabilisées par RAD51 et leur architecture, cette population de molécules étant perdue lors de la déprotéinisation dans l'essai D-loop. Ici nous avons montré qu'une proportion inattendue et élevée (43%) des filaments est engagée dans des molécules jointes avec l'ADNdb donneur. Seules 12 % des molécules jointes restent stables après déprotéinisation et peuvent donc être qualifiées de D-loop. Nous avons réalisé le même type d'expérience avec les protéines de levure (Tavares Em et al. 2019) et montré que ScRad51 seule est incapable de former des complexes synaptiques, la présence de Rad54 étant strictement requise, en présence de laquelle, on obtient environ 37% de complexes synaptiques. Au sein de cette population, plus de la moitié (57%) des molécules jointes sont des D-loop. Nous montrons également la présence d'une proportion élevée de molécules jointes formées par RAD51 humaine lorsqu'on ajoute un ADNdb donneur hétérologue, contrairement au système de levure où même en présence de Rad54, cette proportion est négligeable. Pour finir, la zone de contact entre le filament et l'ADNdb donneur est sensiblement plus grande avec les protéines humaines (125 nm vs 65 nm), et RAD51 reste associée à cette zone. Tous ces résultats montrent que RAD51 humaine est douée d'une forte capacité à aller sonder l'ADNdb ('sampling') et à établir des contacts avec lui. Nous proposons que cette activité pourrait être liée à la structure intrinsèque des filaments humains dans lesquels les protéines RAD51 exposerait leur deuxième site de liaison à l'ADN pour contacter l'ADNdb donneur. RAD54 pourrait alors avoir la même fonction que celle caractérisée chez la levure, dépendante de son activité ATPase/translocase, de favoriser le glissement du filament le long de l'ADNdb jusqu'à un alignement des séquences complémentaires, tout en enlevant RAD51 de la zone de contact. Chez la levure, Rad54 a une fonction supplémentaire, celle de s'insérer dans le filament pour assurer le sondage (sampling) de l'ADNdb en favorisant de multiples contacts avec lui, Rad51-Rad54 forme ainsi une unité fonctionnelle. D'autre part, le fait que les jonctions soient plus larges avec RAD51 humaine et qu'elles induisent un changement de conformation de l'ADN, ces 2 propriétés étant dépendantes de l'homologie, prouve que RAD51 trouve l'homologie en formant une structure stable à 3 brins stabilisée dans le filament, une petite partie de ces structures évolue en hétéroduplex après déplacement de brin. Ici encore, RAD54 permet très certainement de favoriser ce passage.

D'après nos résultats, RAD52 stimule fortement l'activité d'invasion de brin de RAD51. En formant des filaments mixtes RAD51-RAD52, nous proposons qu'elle augmenterait encore la réactivité des filaments RAD51. Nous suggérons que cette activité de RAD52 requiert sa capacité à joindre des molécules d'ADN par des interactions protéine-protéine ou ADN-protéine-ADN (RAD52 ayant deux sites de liaison à l'ADN), capacité également impliquée dans le SSA. Dans de rares cas, nous avons identifié des molécules jointes dans lesquelles RAD52

était fixée sur la zone de contact, ce qui confirme que RAD52 faciliterait le contact entre les molécules d'ADN par sa présence au sein du filament. Cependant, aux vues de notre analyse en MET, nous proposons qu'une fois que RAD52 aurait participé à la formation de la molécule jointe, elle pourrait se dissocier de la synapse. Si BRCA2 montre un effet positif sur l'installation du nucléofilament RAD51, on n'observe pas d'effet sur la formation des intermédiaires synaptiques dans nos conditions. Un rôle tardif de BRCA2 dans la stabilisation des D-loop a été identifié, par capture des protéines RAD51 en excès (Wang Cx et al. 2019). En effet, un excès de RAD51 déstabilise les D-loop. Pour autant, aucun rôle direct sur la formation et l'architecture des complexes synaptiques n'a été observé.

VII. CARACTÉRISATION D'UNE FORME CHIMÉRIQUE DE Rad51 : SMRad51

A. Introduction

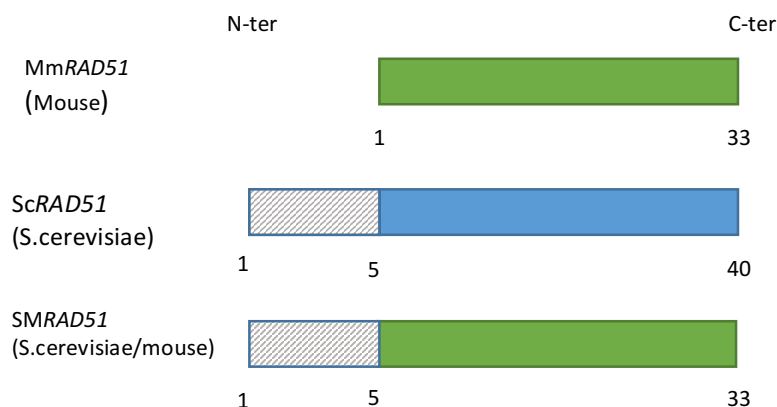
RAD51 est un gène essentiel chez les mammifères. La protéine SMRAD51 chimérique résultant de la fusion de la partie N-ter de ScRad51 avec la totalité de RAD51 de souris est utilisée par l'équipe de Bernard Lopez comme outil pour étudier les effets d'une inhibition drastique de la RH chez la souris. En effet, le gène *SMRAD51* est dominant négatif, son expression a pour effet d'inhiber l'activité de RAD51 endogène et la RH, sans stimuler les voies alternatives de réparation mutagènes. Ainsi, un modèle de souris portant *SMRAD51* inducible a été réalisée afin d'étudier l'impact d'une inhibition de la RH spécifiquement.

Mon rôle a été de caractériser en biochimie et par MET les propriétés de SMRAD51 d'assemblage sur l'ADN, de formation de filament présynaptique et l'activité d'invasion de brin des potentiels filaments formés.

B. Matériels & Méthodes

SMRad51

La forme chimérique de RAD51, SMRad51, est le résultat de la fusion de la partie N-ter (acide aminé 1 à 55) de ScRad51 avec la totalité de RAD51 de souris. Les protéines SMRAD51 et MmRAD51 (de souris) ont été purifiées par Xavier Veaute sur la plateforme CiGEx en suivant le même protocole que pour RAD51 humaine sauvage.



Essai D-loop avec SMRad51

Pour l'essai D-loop, 0,2 μ M molécules (36 μ M nt) d'un ADN sb-db marqué au Cy5 sont incubés en présence de MmRAD51, SMRAD51 ou les 2 à une concentration finale de 12 μ M (1 protéine pour 3 nt) pour 5 minutes à 37°C. RPA est ensuite ajoutée à la réaction à une concentration finale de 0,6 μ M (1 protéine pour 60 nt) pour 10 minutes supplémentaire dans une solution contenant 10 mM Tris-HCl (pH 8), 50 mM chlorure de sodium, 2 mM chlorure de calcium, 1 mM DTT et 1,5 mM ATP. Puis, l'ADNdb homologue donneur, le pUC19 (New England

Biolabs), est ajouté à la réaction à une concentration de 30 nM molécules dans un volume final de 10 μ L pour 30 minutes supplémentaire à 37°C. La réaction est ensuite stoppée avec l'ajout de 1% SDS et 25 mM EDTA puis déprotéinisée (30 minutes d'incubation à 37°C avec 2 mg/mL protéinase K). Le volume réactionnel est ensuite migré dans un gel d'agarose 1% à 80V pendant 45 minutes dans un tampon contenant 0,5x TAE. Les molécules d'ADN marqué au Cy5 sont visualisées au Typhoon FLA 9500 (GE Healthcare Life Sciences).

Analyse des filaments Rad51 en MET

Les filaments RAD51 sont assemblés sur un ADN hybride sb-db en utilisant MmRAD51, SMRAD51 ou un mélange des 2 protéines comme suit par incubation 5 minutes à 37°C de 0,2 μ M (36 μ M nt) avec MmRAD51, SMRAD51 ou les deux à une concentration finale de 12 μ M (1 protéine pour 3 nt). RPA est ensuite ajoutée à une concentration finale de 0,6 μ M (1 protéine pour 60 nt) puis 10 minutes à 37°C dans une solution contenant 10 mM Tris-HCl (pH 8), 50 mM chlorure de sodium, 2 mM chlorure de calcium, 1 mM DTT and 1,5 mM ATP. La réaction est ensuite rapidement diluée 25x dans le tampon réactionnel puis déposée sur grille de microscopie en vue d'être analysée. Les images ont été prise à une magnification de 85,000x à l'aide d'une caméra (MegaViewIII charge-coupled device (CCD)) et analysées à l'aide du logiciel iTEM software (Olympus Soft Imaging Solution).

C. Résultats

SMRad51 diminue les phénomènes de RH en altérant la structure du filament RAD51

Contrairement à MmRAD51 la forme sauvage de RAD51 de souris, SMRAD51, même introduite à des concentrations saturantes, forme des filaments irréguliers et la protéine ne polymérise pas complètement sur le substrat d'ADN, on observe notamment la présence de zones d'ADNsb (figure 41B). On constate également qu'en présence de MmRAD51, l'architecture des filaments formés est différente de celle des filaments formés par MmRAD51 seule. En effet, leur forme est irrégulière et discontinue, l'architecture hélicoïdale est altérée. Pour tester l'activité des différents filaments, j'ai réalisé un essai D-loop. 6 % de D-loop ont été obtenus avec MmRAD51, 3% avec SMRad51 et 4 % avec les 2 protéines. Ainsi dans tous les cas la présence de la forme chimérique de RAD51 affecte d'une part la structure fine des filaments présynaptiques, d'autre part leur activité de recherche d'homologie et d'invasion de brin.

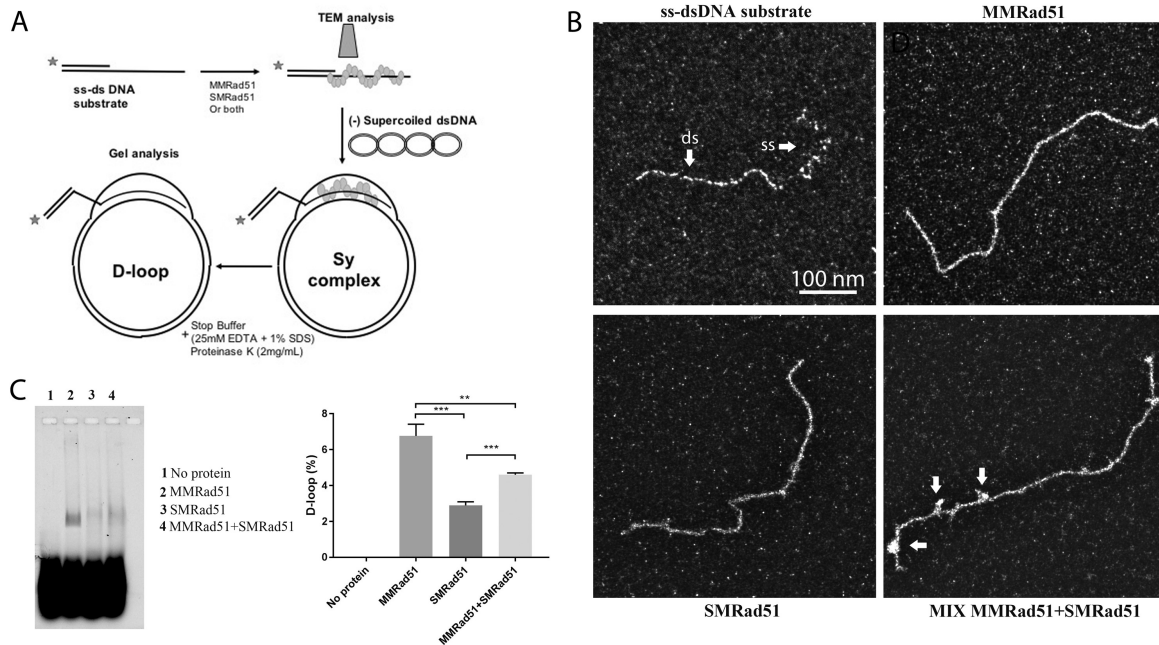


Figure 41 : Polymérisation de MmRAD51 et SMRAD51 sur l'ADN, activité d'invasion de brin (A) Schéma de l'expérimentation de D-loop, (B) Filaments formés en présence de MMRad51/SMRad51 ou les deux, (C) essai D-loop réalisé pour mettre en évidence l'effet de SMRad51 sur cette étape.

In vivo la suppression de la RH entraîne un vieillissement prématuré mais pas de cancérogenèse

Pour évaluer les conséquences d'une altération/diminution du mécanisme de RH, plusieurs types de souris ont été comparées, notamment des souris pour lesquelles l'expression de *SMRAD51* ou de *RAD51* sauvage sont induites sous l'action de la Doxycycline et des souris contrôles. Après 6 semaines d'exposition à la Doxycycline, les souris exprimant *SMRAD51* ont montré des signes de vieillissement prématuré, avec baisse d'activité physique, la chute des poils, un priapisme intermittent et une posture anormale avec protubérance du haut du dos (figure 42d). L'imagerie aux rayons X par tomographie à densité après 4 mois de traitement par la Doxycycline a révélé que ces modifications du dos étaient associées à une courbure de la colonne vertébrale, ce qui correspond à une cyphose. Une prolongation de l'expression de *SMRAD51* s'accompagne d'une perte de poids flagrante et d'une mort prématurée. Pour évaluer les modifications morphologiques des tissus causées par l'expression de *SMRAD51*, nous avons effectué des analyses anatomiques et histopathologiques. Après 6 mois de traitement par la Doxycycline, nous avons observé une réduction de la taille des testicules (Figure 42g) et une splénomégalie, comme le montre l'augmentation de la taille de la rate. De plus, l'expression de *SMRAD51* a diminué la densité du bulbe capillaire et conduit à une hyperplasie de l'épiderme (figure 42i). L'épaisseur de la couche de graisse sous-cutanée est également réduite (figure 42i). Des phénotypes similaires sont observés chez les souris avec une inactivation de *BRCA1* (Sotiropoulou et al. 2013)

médiée par un CRE-LOX spécifique de la peau. Étant donné que BRCA1 et RAD51 partagent des rôles dans la RH, cette découverte suggère que les phénotypes observés ici résultent bien de l'inactivation de la RH *in vivo*.

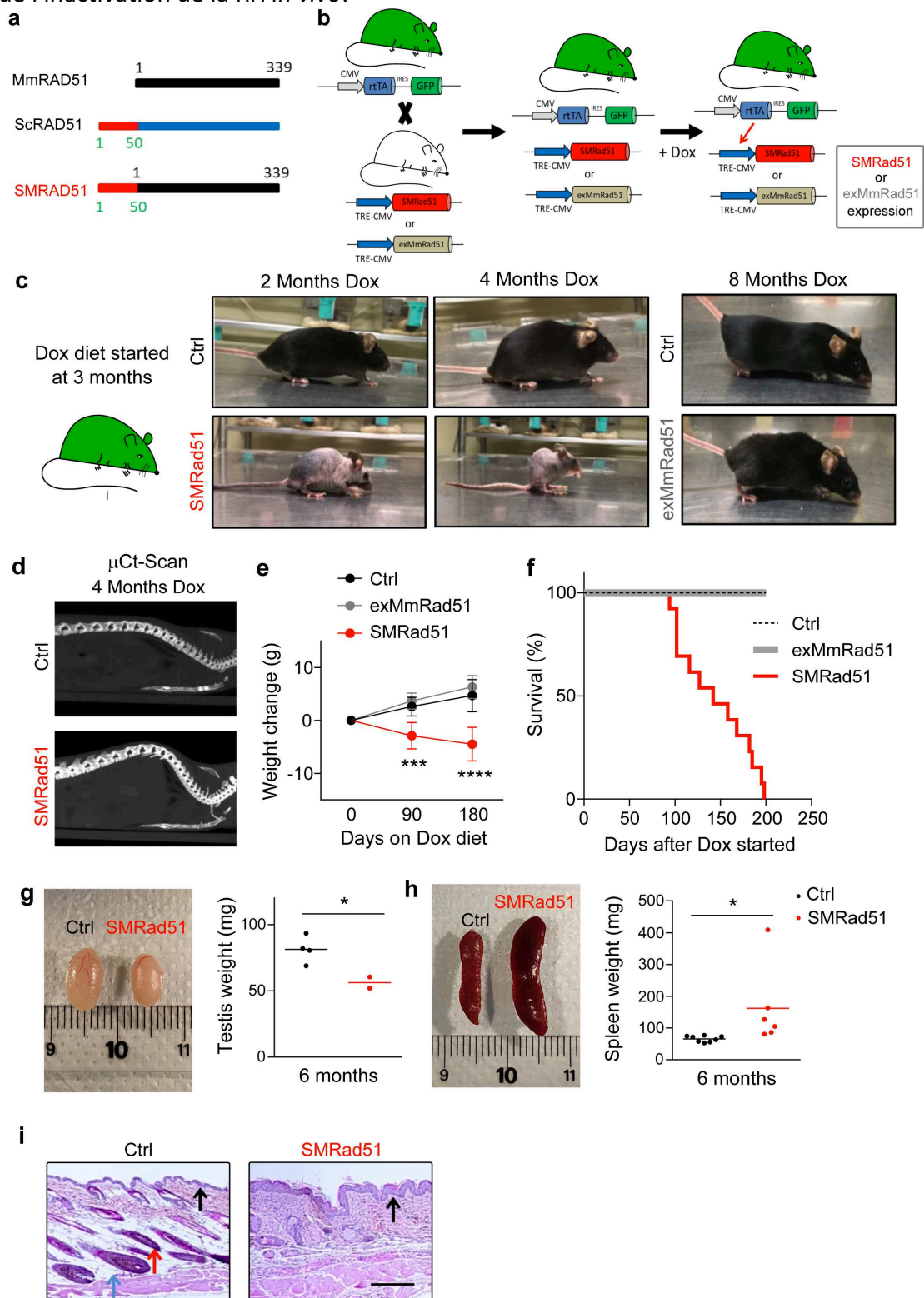


Figure 42 : L'expression de SMRad51 mène à une mort rapide chez les jeunes souris.

(a) Représentation schématique de SMRad51, **(b)** Représentation schématique des modèles de souris utilisés dans les expérimentations, **(c)** Design expérimental et photos représentatives des souris contrôles, exMmRad51 et SMRad51 traitées à la Doxycycline pendant 2,4 et 6 mois, **(d)** Image de scanographie montrant la colonne vertébrale des souris Ctrl et SMRad51 adultes traités à la Doxycycline pendant 4 mois, **(e)** Analyse quantitative de la variation poids entre le début du traitement à la Doxycycline à 3 puis 6 mois chez les souris Ctrl (n=9, 3 mois; n=7, 6 mois), les souris exMmRad51 (n=5, 3 mois; n=5, 6 mois) et les souris SMRad51 (n=10, 3 mois; n=5, 6 mois), **(f)** Courbes de survie des souris Ctrl, exMmRad51 et SMRad51 traités à la Doxycycline, **(g)** Images représentant (gauche) et quantification (droite) du poids d'un testicule de souris adultes Ctrl et SMRad51 après traitement à la Dox pendant 6 mois, **(h)** Images représentant (gauche) et quantification (droite) du poids de la rate de souris adultes Ctrl et SMRad51 après traitement à la Dox pendant 6 mois, **(i)** Images représentative d'une coupe histologique de la peau d'une souris Ctrl et SMRad après traitement à la Dox pendant 6 mois, Flèche rouge: bulbe capillaire dont la densité a été diminuée chez les souris exprimant SMRad51. Flèche bleue : hypoderme chez une souris Ctrl, dont l'épaisseur a été diminuée chez les souris exprimant SMRad51. Flèche noire : épiderme dont l'épaisseur a été augmentée chez les mutants SMRad51. Analyse statistique : **(e)** Two-way ANOVA suivie d'une correction Šidák. *** p<0.001; ****p<0.0001. **(g-i)** t-test de Student. *p<0.05.

D. Discussion

Ainsi, ce travail montre que l'inactivation fonctionnelle *in vivo* de RAD51 déplace l'équilibre vers le vieillissement prématuré plutôt que vers la cancérogénèse. En utilisant cet outil, nous avons étudié si l'inactivation de la RH médiée par RAD51, sans affecter sa liaison à l'ADN endommagé, conduit à l'oncogénèse et/ou au vieillissement. Nous avons constaté que la suppression de la RH par l'expression de SMRAD51 entraînait un stress réplicatif, une inflammation systémique, un vieillissement prématuré et une durée de vie réduite. De façon surprenante, bien que l'expression de SMRad51 ait induit une instabilité génétique, elle n'a pas induit la formation de tumeurs.

L'expression de SMRAD51 entraîne une inhibition de la RH mais sans stimulation des mécanismes alternatifs de réparation peu fidèle que sont le SSA et l'Alt-EJ, ce qui nous permet de nous focaliser spécifiquement sur l'impact de l'inhibition de la RH *in vivo*. Ici, j'ai caractérisé les bases moléculaires de l'inhibition de la RH par SMRAD51. RAD51 favorise la recherche d'homologie et l'échange de brins, étape centrale de la RH. Cette activité passe par la formation d'un filament RAD51-ssDNA dont l'architecture est cruciale pour son activité. J'ai pu montrer ici qu'en bouleversant leur structure, SMRAD51 empoisonne les filaments RAD51 en diminuant leur activité d'invasion de brin de RAD51, ce qui permet de rendre compte des phénotypes observés pour le mutant SMRAD51, à savoir l'inhibition de la RH et le caractère dominant négatif de cette inhibition.

L'équipe de Bernard Lopez a montré que la fixation de RAD51 sur l'ADNsb néoformé au site de cassure initie le mécanisme de RH et inhibe les autres voies de réparation des CDBs telles que le SSA et l'Alt-EJ (Annexe III), réduisant ainsi l'instabilité génétique associée à ces processus de réparation non conservateurs. Ainsi, l'échec du chargement de RAD51 sur l'ADNsb (en raison, par exemple, d'un défaut des protéines de chargement comme BRCA2 et PALB2) diminue non seulement l'efficacité de la RH mais stimule également les voies de réparation altératives (Han J et al. 2017). De plus, des mutations affectant les facteurs qui favorisent le chargement de RAD51 sur l'ADNsb, tels que BRCA1, BRCA2 et PALB2, confèrent une prédisposition au cancer. Ici nous montrons que l'expression de *SMRAD51*, qui pourtant interagit et se charge sur l'ADNsb mais dont l'activité d'invasion de brin et donc de RH sont altérées, sans pour autant entraîner une augmentation des voies alternatives (SSA, Alt-EJ), n'induit pas la formation de tumeur. Par conséquent, nous pouvons formuler l'hypothèse que la cancérogénèse associée à une inhibition de la RH serait favorisée par la stimulation des voies alternatives mutagènes qui sauvent en partie la viabilité cellulaire, mais augmentent aussi l'instabilité du génome. Nous montrons que l'inhibition de la RH seule conduit à un vieillissement accéléré (Figure 8 de l'Annexe III).

VIII. CHOIX DE LA VOIE DE REPARATION : RAD52 VS RAD51

A. Introduction

Il existe plusieurs voies de réparation des CDB. Comment se fait le choix de la voie ? est une question ouverte. En collaboration avec l'équipe de Bernard Lopez, nous nous intéressons aux acteurs qui interviennent dans la détermination de la voie de réparation des CDB. Comme la RH, le SSA et l'Alt-EJ (par opposition au NHEJ) sont initiées par une étape de résection aboutissant à la formation d'ADNsb. L'équipe de B. Lopez a proposé que la sélection de la voie de réparation se ferait en 2 étapes (Bétermier M, P, and Bs 2014; Rass E et al. 2009) : (1) une compétition entre le NHEJ et l'étape de la résection, (2) une fois les ADNsb formés, une compétition entre RH, SSA et Alt-EJ. Conformément à ce modèle, des études sur des cellules de rongeurs montrent qu'un défaut dans le NHEJ se traduit par une augmentation des phénomènes de RH et d'Alt-EJ (Guirouilh-Barbat J et al. 2007; Pierce Aj et al. 2001) et qu'une diminution de 53BP1, qui est un facteur clé dans la protection des extrémités d'ADN contre la résection, atténue le défaut de RH dans les cellules BRCA1 déficientes (Bunting et al. 2010). De plus, l'inhibition de la RH par la surexpression de formes dominantes négatives de RAD51 (Annexe III) ou une déficience en BRCA2 entraîne une stimulation du SSA (Lambert S and Bs 2000; Han J et al. 2017) et de l'Alt-EJ (Ahrabi S et al. 2016). Bien que la première étape de la compétition est bien documentée, le mécanisme moléculaire responsable de la 2^{ème} étape de la compétition, c'est-à-dire la sélection de la voie entre la RH, le SSA et l'Alt-EJ, a été très peu exploré et il manque beaucoup d'information concernant les mécanismes qui maintiennent la stabilité du génome en le protégeant des voies comme le SSA et l'Alt-EJ.

Une hypothèse suggère que la RH empêche le SSA et l'Alt-EJ uniquement en engageant la réparation des CDB vers la conversion génique. La présence de RAD51 sur l'ADNsb néoformé pourrait contrecarrer la résection étendue de l'ADN ou encore l'hybridation avec un autre ADNsb complémentaire, étapes clés du SSA et de l'Alt-EJ. D'ailleurs, il a été démontré que RAD51 protège les fourches de réplication arrêtées contre une résection étendue (Mason Jm et al. 2019)

Mon rôle dans ce travail a été de tester *in vitro* l'hypothèse selon laquelle la présence de RAD51 sur l'ADNsb néoformé pourrait inhiber le SSA et l'Alt-EJ. Ainsi j'ai testé l'effet de la fixation de RAD51 ainsi que deux protéines mutées (formes dominantes négatives) sur le mécanisme d'hybridation de brins complémentaires dans le test de SSA.

B. Matériels & Méthodes

Expérience de Single Strand Annealing (SSA)

Toutes les réactions ont été conduites dans un tampon qui contient 10 mM Tris-HCl (pH 8), 50 mM chlorure de sodium, 2 mM chlorure de calcium, 1 mM DTT et 1,5 mM ATP. Dans la réaction A, 0,1 μ M (8 μ M nucleotides) d'un oligonucleotide de 178 nt (5'-ATCATCACCATCACCATTGAGTTTAAACCCGCTGATCAGCCTCGACTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTTCGGTTCCCAACGATCAAGGCGAGTTACATGATCCCCCATGTTGTGCAAAAAGCGGTTAGCTCCTTCGGTCTCCGATCGTTGTCAGAAGTAAGTTGGC-3') est pré incubé avec 2,6 μ M

RAD51 pour 10 min à 37°C dans un volume final de 5 µl. Dans la réaction B, 0,1 µM d'un oligonucleotide de 80 nt marqué en 3' par un Cy5, qui est complémentaire à la portion 5' du 178-mer présent dans la réaction A (5'-GCAAACAACAGATGGCTGGCAACTAGAAGGCACAGTCG AGGCTGATCAGCGGGTTTAAACTCAATGGTGATGGTGATGAT-Cy5-3') a été pré incubé dans les mêmes conditions avec 2,6 µM RAD51. Les réactions A et B sont alors mélangées pour 5 min à 30°C. Dans certaines conditions RAD52 est ajouté à la réaction, à une concentration finale de 0,2 µM, avec une solution tampon contenant 25 mM MOPS pH 7,5, 60 mM chlorure de potassium, 5 mM chlorure de calcium, 2 mM DTT et 0,2 % de Tween. Puis, 5 µM d'un ADN froid non marqué (80-mer) sont ajoutés à la réaction. La réaction totale est arrêtée, en ajoutant 1% de SDS et 25 mM d'EDTA, et déprotéinisée (30 min d'incubation à 37°C avec 2 mg/ml proteinase K). La réaction est analysée par électrophorèse sur gel d'agarose 3%, 0,5% TAE (Tris Acetate EDTA) qui migre à 80V pendant 45 minutes. L'ADN marqué au Cy5 peut alors être détecté et la fluorescence émise est révélée à l'aide d'un Typhoon FLA 9500 (GE Healthcare Life Sciences).

C. Résultats

RAD51 et BRCA2 inhibent tous les deux le SSA et l'Alt-EJ

L'équipe de Bernard Lopez utilise des lignées de cellules humaines contenant un système de cassettes avec des gènes rapporteurs permettant de mesurer un taux d'événements de conversion génique (RH), de SSA, de NHEJ ou de l'Alt-EJ (figure 43). Une inactivation de *RAD51* diminue significativement la fréquence de RH et augmente la fréquence de SSA et d'Alt-EJ. Pour différencier le NHEJ canonique de l'Alt-EJ, un séquençage des jonctions est nécessaire. Si une délétion est détectée, alors il s'agit d'une réparation par Alt-EJ et si on remarque la présence de 4 nucléotides sortant en 3' liée à la coupure par I-SceI (protruding nucleotide : 3'Pnt), la réparation s'est faite par NHEJ (Gelot, Guirouilh-Barbat, and Lopez 2016). L'inactivation de *RAD51* augmente la fréquence des délétions aux niveaux des jonctions d'EJ, alors qu'elle n'a aucun impact sur la présence de 3'Pnt (Figure 1E et Figure supplémentaire S1 et S2 de l'article Ayeong *et al.*), montrant que *RAD51* supprime préférentiellement l'Alt-EJ plutôt que le NHEJ. Ces données contrastent avec celles montrant qu'une délétion de *BRCA2* stimule à la fois le NHEJ et l'Alt-EJ dans les cellules souches embryonnaires de souris (Han J et al. 2017). Par conséquent, cela soulève la question de savoir si *RAD51* et *BRCA2* agissent réellement de manière épistatique pour la sélection de la voie de réparation des CDBs. Ici, dans les cellules humaines, la délétion de *BRCA2* inhibe la RH et stimule à la fois SSA et le EJ. Inactiver à la fois *BRCA2* et *RAD51* montrent qu'ils agissent de manière épistatique sur la stimulation du SSA et du NHEJ (Figure 1F et 1G de Ayeong *et al.*). De plus, en séquençant les jonctions de l'EJ, nous avons constaté que dans les cellules humaines, la délétion de *BRCA2* augmentait spécifiquement les délétions, c'est-à-dire principalement l'Alt-EJ, plutôt que le NHEJ (Figure 1E et Figure supplémentaire S1 et S2 Ayeong *et al.*). Ensemble, ces données montrent que *RAD51* et *BRCA2* agissent de manière épistatique non seulement sur la RH, comme prévu, mais aussi sur la répression du SSA et de l'Alt-EJ qui sont des mécanismes non conservateurs.

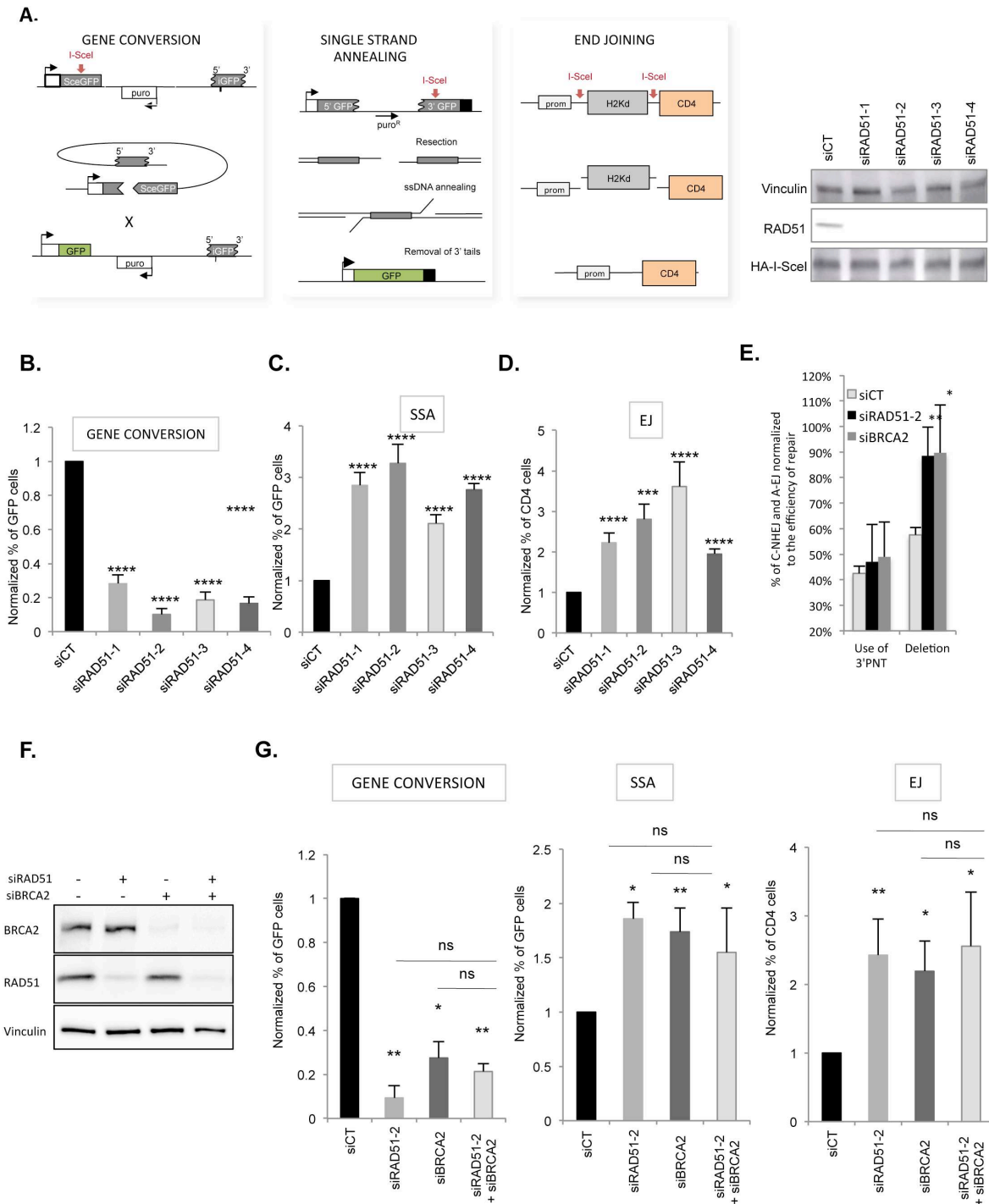


Figure 43 : Impact de RAD51 et BRCA2 sur la balance RH versus SSA et Alt-EJ.

(A) Trois substrats ont été utilisés pour surveiller la fréquence des phénomènes de RH, SSA et de l'EJ (NHEJ et l'Alt-EJ) sur des CDBs générées par l'endonucléase I-SceI, la figure de droite montre l'efficacité des siRAD51 utilisés, (B), (C), et (D) Impact des siRAD51 sur la conversion génique (B) le SSA (C) et l'EJ (D), (E) Séquences des jonctions réparées par l'EJ après

l'inactivation de RAD51 et BRCA2, **(F)** Inactivation de RAD51 et BRCA2, **(G)** Impact de l'inactivation simultanée de RAD51 et BRCA2 sur la RH, le SSA et l'EJ.

In vitro, RAD52 stimule le SSA mais wtRAD51 et SMRAD51 l'inhibent totalement

Le test de SSA permet de mimer l'étape d'hybridation dans la voie. Pour cela, la capacité de 2 brins d'ADN complémentaires de s'hybrider est testée sous l'action de protéines (figure 44). J'ai utilisé 2 brins d'ADNs de tailles différentes (178 nt et 80 nt) : le 80 nt est 100% homologue à la région 5' du 178 nt et possède un marquage Cy5 afin d'être détectable en gel. Ces substrats sont préalablement incubés, séparément, en présence des protéines (RAD52 seule, RAD51 seule ou les deux ensemble) avant d'être mélangés. Si l'hybridation entre les 2 molécules d'ADN a lieu, elle se traduit, après déprotéinisation par un retard de migration sur gel lié à l'hybridation de brins. En l'absence de protéine, une hybridation spontanée se produit d'environ 13%. RAD52 stimule le SSA jusqu'à atteindre 35%, ce qui valide notre essai. De façon très claire, la présence de RAD51 dans la réaction, seule ou accompagnée de RAD52, inhibe complètement l'hybridation. Il en est de même pour la forme dominante négative de RAD51 (SMRAD51) qui se lie à l'ADN mais n'est pas active pour la recherche d'homologie (voir chapitre précédent). Ainsi, on montre que RAD51 utilise sa capacité à interagir avec l'ADNs pour inhiber le SSA, ce qui permet de rendre compte des résultats obtenus *in vivo*.

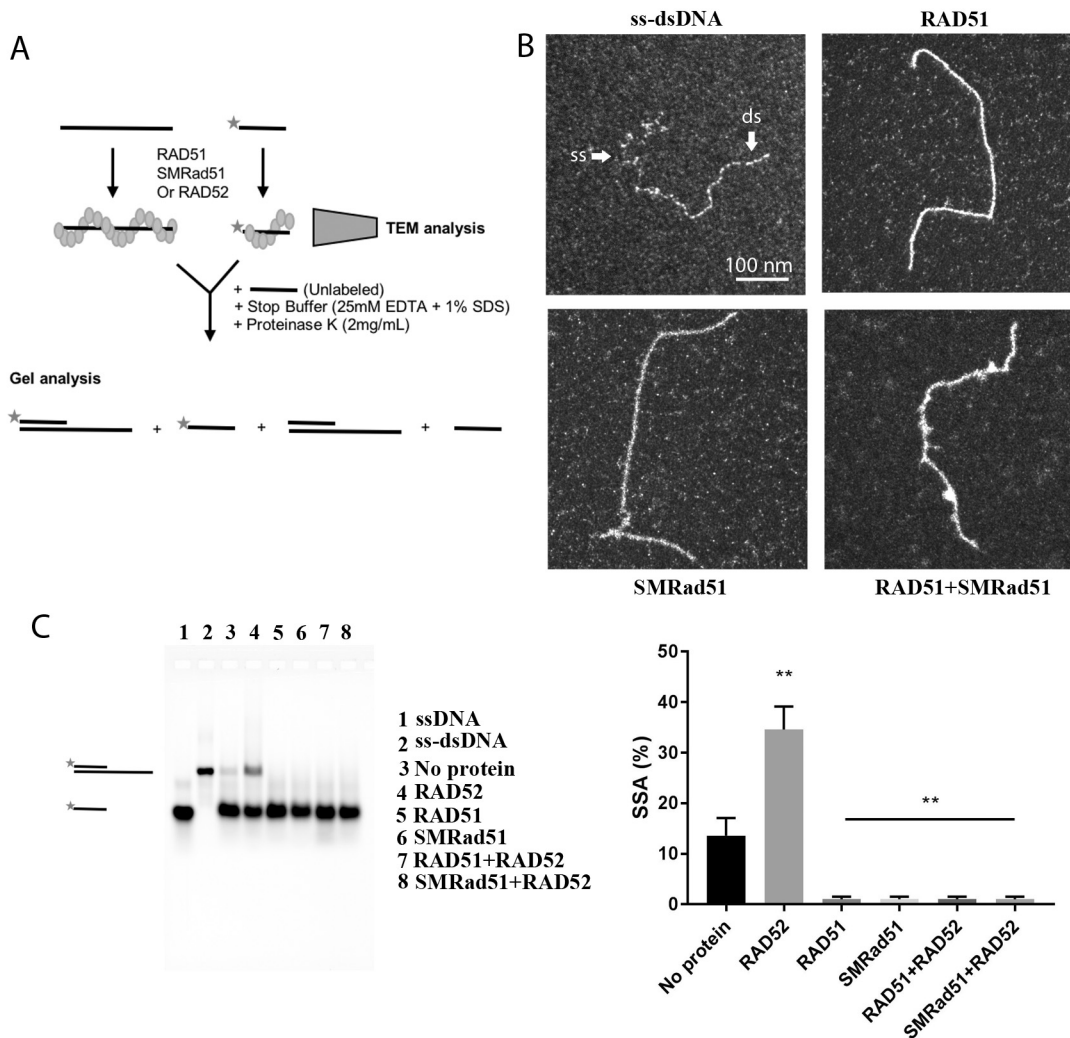


Figure 44 : Impact de RAD51 sur le SSA

(A) Schéma de l'expérimentation pour mimer le SSA, **(B)** Analyse MET des filaments formés en présence de RAD51 et/ou SMRad51, **(C)** Gel de l'essai SSA et quantification sur 3 expériences indépendantes.

D. Discussion

Nous mettons ici en lumière un rôle de RAD51 dans le choix de la voie de réparation des CDB, sur l'ADNs néoformé, au niveau de l'étape 2 de la compétition, et qui joue un rôle important dans le maintien de la stabilité génétique. En favorisant la RH, RAD51 empêche l'utilisation des autres voies alternatives, connues pour être peu fidèle. Il y a une compétition entre RAD51 et RAD52. Une augmentation des événements de SSA et d'Alt-EJ en cas de défaut dans la RH a été rapporté séparément dans différentes études (Ahrabi S et al. 2016; Han J et al. 2017), qui proposent que les CDB sont redirigées vers les mécanismes alternatifs lors d'un

défaut d'activité d'échange de brin. Dans cette étude, nous montrons que la stimulation du SSA et de l'Alt-EJ en l'absence de RAD51 n'est pas une conséquence directe de l'inhibition de la RH en soi, mais plutôt un résultat de l'absence de protéine RAD51 sur l'ADN sb, qui ne peut plus empêcher l'hybridation des brins d'ADN sb complémentaires par RAD52. Il a été proposé que Polθ stimule l'Alt-EJ en retirant RAD51 de l'ADN (Ceccaldi R et al. 2015). Cela contribue fortement à lever l'inhibition de l'hybridation des ADNsb exercée par RAD51, ce qui est en accord avec nos résultats et avec l'inhibition de l'Alt-EJ par RAD51 liée à l'ADN.

L'étape de résection qui génère l'ADNsb est essentielle pour initier la RH mais est également une condition préalable à l'hybridation de l'ADN sb complémentaire en SSA et dans Alt-EJ, mettant ainsi en péril la stabilité du génome. La protéine de liaison à l'ADNsb RPA protège contre l'hybridation de l'Alt-EJ médiées par des microhomologies (Deng Sk et al. 2014) mais favorise l'hybridation de longues homologies catalysées par RAD52 en empêchant la formation de structures secondaires (Shinohara A et al. 1998; Sugiyama T, Jh, and Sc 1998). La fonction de RPA est alors de diriger la réparation vers des processus dépendant de l'homologie, que ce soit la RH ou le SSA. Nos données montrent que l'occupation de l'ADNsb par RAD51 finalise la sélection vers la RH en la favorisant par son activité catalytique et en inhibant le SSA par l'occupation de l'ADNsb.

IX. RÉSULTATS SUPPLÉMENTAIRES : STABILISATION DE LA D-LOOP PAR CAPTURE DU SECOND BRIN ET INITIALISATION DE LA SYNTHÈSE

A. Introduction

Chez la levure, un rôle plus tardif de Rad52 dans l'étape de capture du deuxième brin a été montré (Nimonkar, Sica, and Kowalczykowski 2009). J'ai souhaité tester l'activité de RAD52 humaine dans cette étape, en mettant au point un test de capture du deuxième brin. L'architecture des intermédiaires formés dans cette réaction sera analysée, notamment en identifiant et mesurant les zones d'ADNsb/ADNdb et du contact synaptique, et l'effet de RAD52 sera alors exploré.

D'autre part, toujours dans le but de mieux caractériser les structures synaptiques et leur devenir (stabilisation, dynamique...), j'ai tenté de mettre au point une expérience de D-loop dans laquelle la synthèse peut être amorcée. Une des questions que je me pose est 'l'initiation de la synthèse peut-elle avoir lieu en présence de RAD51 et au sein d'un complexe synaptique ?'.

B. Matériels & Méthodes

Construction d'un substrat complémentaire du second brin déplacé

Pour ce test de capture, j'ai conçu un deuxième substrat avec une zone d'ADNsb complémentaire au brin déplacé de la D-loop et marqué cette fois au Cy3 afin de détecter son incorporation dans la D-loop. Ce nouveau substrat sb-db est construit en utilisant les amorces Cy3-4014(-) x b-2777(+) pour amplifier un db 1300bp marqué au Cy3 puis b-4016(-) x 3687(+) pour un 400bp selon la méthode détaillée dans la section Matériel & Méthode.

Capture du second brin

Cette expérience est effectuée en 2 étapes : tout d'abord une D-loop est formée comme décrit dans le chapitre VI (matériels et méthodes : essai D-loop *in vitro*) puis avant l'étape de déprotéinisation un second substrat sb-db (construit comme décrit précédemment) est ajouté à la réaction à une concentration finale de 5,7 nM molécules. Le mélange est incubé pour 30min à 37°C. On procède ensuite à la déprotéinisation en ajoutant 2mg/ml de protéinase K pendant 30 minutes à 37°C. La réaction est analysée par électrophorèse sur gel d'agarose 1,5%, 1% TAE (Tris Acetate EDTA) qui migre à 80V pendant 45 minutes. Les ADNsb marqués au Cy5 ainsi qu'au Cy3 peuvent alors être détectés séparément et la fluorescence émise est révélée à l'aide d'un Typhoon FLA 9500 (GE Healthcare Life Sciences).

Initiation de la synthèse de l'ADN après l'invasion du second brin

Pour mettre en évidence la synthèse à partir du brin envahissant, j'effectue une expérience de D-loop comme décrit dans le chapitre VI (matériels et méthodes : essai D-loop *in vitro*), puis j'ajoute la polymérase klenow (New England Biolabs) ainsi que des dNTPs à une concentration finale de 0,4 mM (contenant 1/10ème de dCTPs marqués au Cy5) et 5mM de MgCl₂. Le volume réactionnel est incubé à 37°C pendant 30 minutes. On procède ensuite à la déprotéinisation en ajoutant 2mg/ml de protéinase K en présence de 1% SDS et 25mM EDTA pendant 30 minutes à 37°C. La réaction est analysée par électrophorèse sur gel d'agarose 1%, 0,5% TAE (Tris Acetate EDTA) qui migre à 70V pendant 2h. L'ADN marqué au Cy5 peut alors être détecté ainsi que l'incorporation des dNTPs marqués et la fluorescence émise est révélée à l'aide d'un Typhoon FLA 9500 (GE Healthcare Life Sciences).

C. Résultats préliminaires et perspectives

La capture du second brin est favorisée par la présence de RAD52

L'expérience de capture du deuxième brin est réalisée en présence ou non de RAD52. La capture du deuxième brin est détectée grâce à l'incorporation du nouveau substrat marqué au Cy3. Après migration sur gel d'agarose puis détection de la fluorescence à l'aide de différents lasers (647 nm pour le Cy5 et 532 nm pour le Cy3), j'ai pu mettre en évidence l'incorporation du deuxième substrat, uniquement en présence de RAD52 dans la réaction (Figure 45B). Je prévois de poursuivre cette expérience afin d'optimiser le rendement de la réaction, puis de caractériser en MET les différentes populations de molécules.

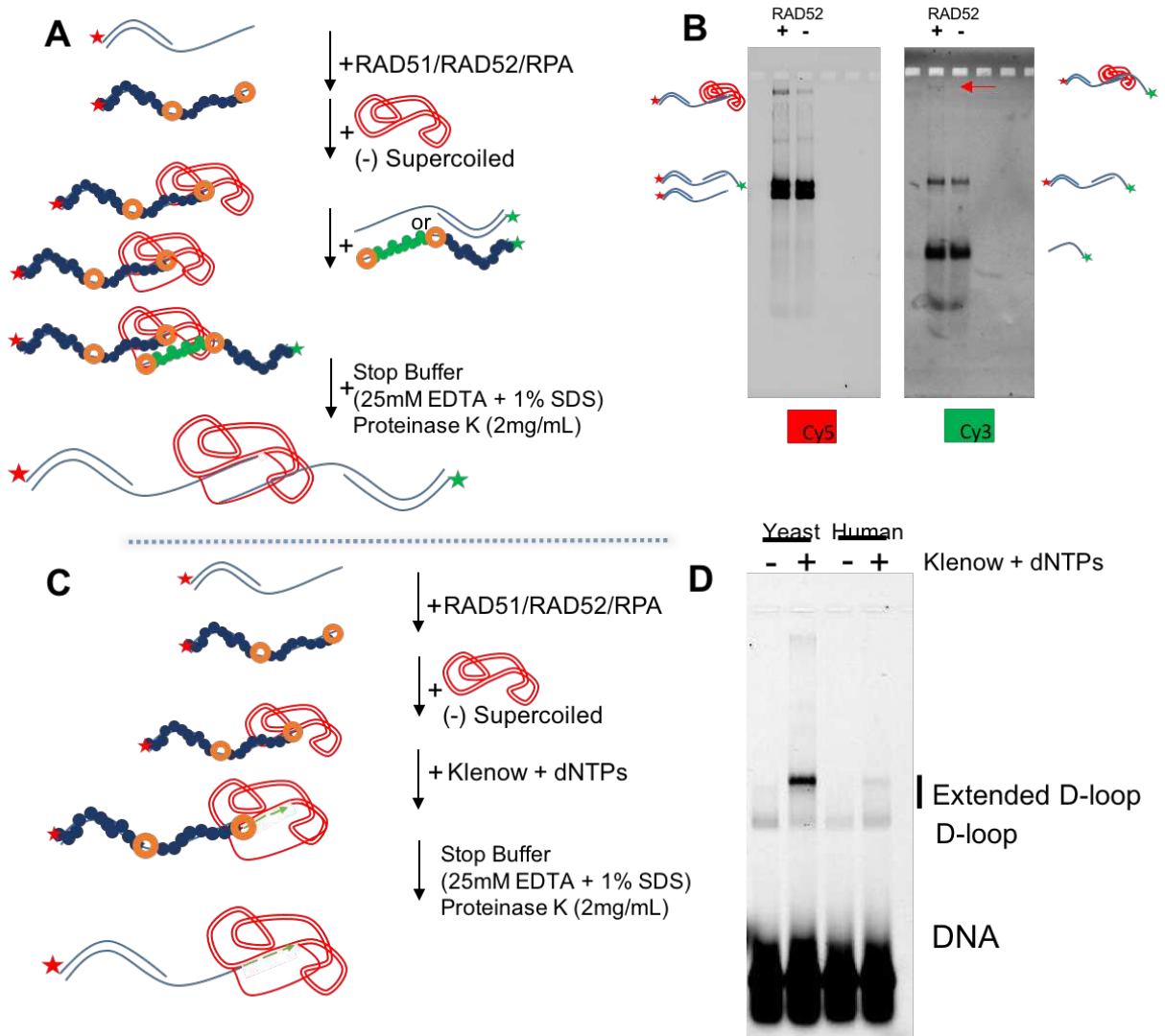


Figure 45 : Capture du second brin et mise en place de la synthèse

(A) Schéma expérimentale de la capture du second brin et (B) Analyse par gel de la réaction : à gauche révélation au Cy5 et à droite au Cy3, (C) Schéma expérimentale de la mise en place de la synthèse, (D) Analyse de la réaction.

Mises en place de la synthèse

Pour finir, j'ai mis au point un nouveau test biochimique pour détecter l'incorporation de dNTP fluorescent par la polymérase klenow dans la D-loop, l'idée étant par la suite de substituer la polymérase klenow par POL ETA, qui est potentiellement impliquée dans l'étape de synthèse au cours de la RH. L'objectif est de caractériser en parallèle la dynamique et l'architecture des intermédiaires formés et de tester davantage les rôles éventuels de RAD52 et de BRCA2. Dans les essais préliminaires et après calibration, j'ai pu détecter sur gel une nouvelle bande retardée (avec un smear) correspondant à l'incorporation de dCTP-Cy5 dans la D-loop, ce qui confirme qu'une synthèse a eu lieu. Le fait que l'extension de la D-loop soit limitée à une certaine taille pourrait s'expliquer par une contrainte topologique liée à

l'ouverture locale du plasmide db qui ne peut pas excéder une certaine taille. Il s'agit donc d'une extension maximale. Je projette maintenant d'une part de tenter d'ajouter une topoisomérase dans la réaction afin de relâcher cette contrainte et permettre à la polymérase de poursuivre la synthèse, et d'autre part de caractériser les intermédiaires formés en MET.

D. Discussion

Les résultats préliminaires concernant la stabilisation de la D-loop par la capture du second brin donne des résultats intéressants. RAD52 semble jouer un rôle important dans la capture du second brin. Son activité d'hybridation de brin interviendrait sûrement dans ce mécanisme. Ces résultats doivent, bien évidemment, être reproduits et confirmés avec un travail de calibration pour obtenir un rendement plus élevé de capture. Ensuite ces structures devront être caractérisées par MET.

Concernant la synthèse, nous avons mis en évidence qu'elle pouvait se mettre en place à la suite de la formation de la D-loop sous l'action d'une polymérase et de l'ajout de dNTPs. La suite consisterait à effectuer la synthèse dans un contexte qui se rapproche du système humain (en utilisant une polymérase humaine) et ainsi déterminer si une synthèse peut se mettre en place seulement avec la mise en place de complexes synaptiques (sans alignement de séquence) et caractériser ces structures en MET.

DISCUSSION GENERALE

Il existe plusieurs voies de réparations des cassures simple et double brin de l'ADN avec un degré de fidélité variable. L'un des mécanismes majeurs est la RH dont RAD51 est l'acteur principal. Les études menées sur ces différentes voies montrent que selon le contexte cellulaire, mais également en fonction de la signalisation et la régulation des différents acteurs impliqués, non seulement l'une ou l'autre voie est favorisée, mais la RH peut également elle-même être modulée à différents niveaux, ce qui a des répercussions génétiques sur les produits de la réparation. Dans cette étude, nous avons considéré les rôles de RAD51 et deux de ses partenaires, BRCA2 et RAD52 dans la régulation des étapes précoces de la RH, de la prise en charge de l'ADNsb néoformé après résection, à la formation des intermédiaires synaptiques en passant par l'assemblage du nucléofilament. Nous avons montré que dans ces différentes étapes, il existe un jeu subtil entre ces différents acteurs, impliquant d'une part une compétition de leur fixation sur l'ADN et d'autre part leurs activités propres. RAD51 nucléée puis polymérise sur l'ADNsb et db pour former un nucléofilament actif dans la recherche d'homologie et l'appariement homologue, RAD52 interagit avec l'ADNsb et est douée d'une activité d'appariement de brins complémentaires, BRCA2 interagit avec l'ADNsb et avec RAD51, avec une fonction médiatrice pour l'installation du filament. Nous montrons ici qu'ensemble, ces différents acteurs modulent leurs activités.

Dans un premier temps, nous avons mis en évidence un jeu entre RAD51 et RAD52 dans la prise en charge de l'ADNsb. En effet, le recrutement de RAD51 sur l'ADN inhibe la voie SSA médiée par RAD52. L'étude de la forme dominante négative SMRad51 a permis de mettre en évidence que c'est la fixation sur l'ADNsb, et non la fonction catalytique de RAD51 qui empêche la voie alternative du SSA. En parallèle, on montre que la présence de RAD52 n'inhibe pas la RH, ce qui suggère que la RH est le mécanisme principal de réparation des CDBs et que les voies alternatives prennent le relais lorsque les acteurs de la RH ne sont pas présents ou s'ils sont mutés. Ce résultat souligne encore l'importance de la présence et du recrutement des acteurs au bon endroit et au bon moment

Si le filament RAD51 se forme, alors la réparation s'engage vers la RH. Ici encore nous montrons un jeu de compétition entre BRCA2 et RAD52 quant à l'installation du filament RAD51. En effet, la présence précoce de RAD52 sur l'ADNsb inhibe l'effet médiateur de BRCA2. L'ADNsb couvert de RPA s'enroule autour des oligomères de RAD52 pour former des complexes compacts, ce qui inhibe l'élongation des filaments RAD51. La stimulation par BRCA2 de la nucléation de RAD51 sur l'ADN, ainsi que de sa fonction d'hydrolyse de l'ATP ne suffisent pas à déplacer RAD52 de l'ADN. Si RAD51 accède d'abord à l'ADN, alors des filaments peuvent se former, et même en présence de RAD52, qui pourra alors participer à la formation de filaments mixtes RAD51-RAD52. De façon intéressante, ces filaments mixtes sont plus courts, suggérant toujours un enroulement de l'ADNsb (recouvert ou non par RPA) autour des oligomères de RAD52.

Nous avons étudié l'étape de recherche d'homologie et d'invasion de brin au travers la caractérisation fine des complexes synaptiques. Ici nous mettons en évidence un rôle positif de RAD52 dans l'augmentation des contacts entre les molécules d'ADN et donc dans la

formation des complexes synaptiques. Ainsi nous concluons qu'en formant des filaments mixtes avec RAD51, RAD52 participe à la capture de l'ADNdb donneur. De plus, la proportion de D-loop, dans lesquelles les séquences homologues sont alignées, augmente également d'un facteur 3 en présence de RAD52. L'étude statistique des complexes synaptiques révèle que RAD51 humaine seule est elle-même hyper-réactive dans la capacité à interagir avec l'ADN donneur, hyper-réactivité que nous supposons adaptée à la taille et aux propriétés du génome humain. Nous pensons que RAD54 pourrait compléter ce mécanisme de formation de D-loop en enlevant RAD51 de la zone synaptique tout en 'zippant' l'hétéroduplex. Ainsi, il serait très intéressant de caractériser les intermédiaires synaptiques formés en présence de RAD54 et RAD52. De plus, la présence de RAD52 au sein des filaments entraîne un raccourcissement de ceux-ci. Nous proposons que ces filaments pourraient être impliqués dans la RH dédiée à des régions particulières du génome, par exemple aux télomères, ou dans d'autres régions contenant des séquences répétées.

Une inactivation de RAD52 entraîne une létalité synthétique des cellules mutées pour BRCA2. Il a été montré que RAD52 et BRCA2 partagent la capacité (directe ou indirecte) de protéger l'ADN contre une résection excessive au niveau des fourches de réplication : RAD52 en stabilisant la fourche arrêtée et en empêchant sa réversion, BRCA2 au travers le recrutement et le recouvrement de l'ADNsb par RAD51. On peut imaginer que RAD52-RPA et/ou BRCA2-RAD51 prennent précocement en charge l'ADNsb et le protègent contre les nucléases. En l'absence de l'une, l'autre permet d'éviter une digestion extensive, en l'absence des deux, l'ADN est soumis à une résection excessive qui entraîne la mort cellulaire.

Pour finir, j'ai initié des travaux sur la capture du second brin ainsi que sur la mise en place de la synthèse. Les résultats sont prometteurs et révèlent bien un rôle positif de RAD52 dans la capture du second brin. Ici encore, le rôle de RAD54 pourrait être investigué.

LISTE DES ABREVIATIONS

Alt-EJ : Alternative End Joining
BRCA1 : BReast CAncer 1
BRCA2 : BReast CAncer 2
BFR : Blocage des Fourches de Réplication
CDB : Cassure Double Brin
CDK : Kinase Cycline Dépendante
CO : Crossing Over
Db : Double brin
DDT : Tolérance aux Dommages à l'ADN
djH : double jonction de Holliday
DNA-PK : Protéine Kinase dépendante de l'ADN
DSBR : Double Strand Break Repair
EDTA : Acide Ethylène Diamine Tétracétique
FANCI : Fanconi Anemia Complementation group J
FBH1 : F-Box DNA Helicase 1
FPLC : Fast Protein Liquid Chromatography
LIG4 : Ligase 4
MET : Microscopie Electronique à Transmission
NHEJ : Jonction des Extrémités Non Homologues
PALB2 : Partner And Localizer of BRCA2
PARP1 : poly (ADP-ribose) polymérase 1
PAXX : paralogue XRCC4 et de XLF
PCNA : Proliferating Cell Nuclear Antigen
PCR : Polymerase Chain Reaction
RDR : Réplication Dépendante de la Recombinaison
RH : Recombinaison homologue
RMP : Recombination Mediator Protein
RPA : Replication Protein A
Sb : simple brin
SDSA : Synthesis Dependent Strand Annealing
SIM : Sumo Interacting Motif
SSA : Single Strand Annealing
SSB : Single-Strand Binding protein
TAE : Tris Acetate-EDTA
TLS : synthèse translésionnelle
UV : Rayonnement ultraviolet
WRN : Werner
XLF : Xrcc4 like factor
XRCC4 : X-ray cross complementation group 4

LISTE DES FIGURES

| | |
|---|-----|
| Figure 1 : Mécanisme du NHEJ (Dueva and Iliakis 2013) | 9 |
| Figure 2 : Mécanisme de l'Alt-EJ (Dueva and Iliakis 2013) | 11 |
| Figure 3 : Mécanisme de la RH (Dueva and Iliakis 2013) | 12 |
| Figure 4 : La voie SDSA (Dueva and Iliakis 2013) | 14 |
| Figure 5 : La voie DSBR (Dueva and Iliakis 2013) | 15 |
| Figure 6 : Mécanisme du SSA (Sallmyr and Tomkinson 2018) | 16 |
| Figure 7 : La voie du BIR. Version adaptée de (Symington, Rothstein, and Lisby 2014) | 17 |
| Figure 8 : Le choix des voies de réparation des CDBs (Chang et al. 2017) | 19 |
| Figure 9 : Vue d'ensemble des obstacles provoquant un blocage des fourches de réplication (BFR) | 21 |
| Figure 10 : Les différentes étapes de la recherche d'homologie. Adapté depuis (Renkawitz, Lademann, and Jentsch 2014) | 28 |
| Figure 11 : Résolution des jonctions de Holliday dans différentes voies (Wyatt and West 2014) | 32 |
| Figure 12 : Structure du filament présynaptique RAD51 (Xu J et al. 2017) : | 35 |
| Figure 13 : Représentation des sous-unités de RPA (Bhat Kp and D 2018) | 36 |
| Figure 14 : Structure de Rad52 | 37 |
| Figure 15 : Les protéines médiatrices de la RH (J. Liu, Ehmsen, et al. 2011) | 38 |
| Figure 16 : Structure de BRCA2 : | 39 |
| Figure 17 : Représentation des complexes formés par les paralogues de RAD51 (Sullivan and Bernstein 2018) | 44 |
| Figure 18 : L'action des hélicases dans les différentes étapes de la RH (Huselid and Bunting 2020) ; | 47 |
| Figure 19 : Modèle d'action de Rad54 : | 49 |
| Figure 20 : Les signaux après interaction du faisceau d'électrons avec les atomes de l'échantillon | 54 |
| Figure 21 : Différents composants d'un microscope électronique | 55 |
| Figure 22 : Interaction des électrons avec les atomes des échantillons. | 56 |
| Figure 23 : Dépôt de film de carbone sur les grilles MET | 57 |
| Figure 24 : Appareil à fonctionnaliser les grilles : | 58 |
| Figure 25 : Préparation des grilles de MET en fonction de la coloration | 60 |
| Figure 26 : Schéma des constructions d'ADN mimant les intermédiaires de recombinaison homologue | 62 |
| Tableau 1 : Programme PCR utilisé pour amplifier les substrats d'ADN | 62 |
| Tableau 2 : Amorces spécifiques utilisées pour l'amplification des substrats d'ADN | 63 |
| Figure 27 : Construction des substrats d'ADN et caractérisation en MET : | 70 |
| Figure 28 : Fixation de RPA sur l'intermédiaire sb-db | 71 |
| Figure 29 : Fixation de RAD51 sur l'intermédiaire sb-db en présence de RPA | 72 |
| Figure 30 : Effet de BRCA2 sur la polymérisation de RAD51 sur l'intermédiaire sb-db | 74 |
| Figure 31 : Effet de la fixation de RAD52 sur l'ADNsb | 75 |
| Figure 32 : Effet de RAD52 sur la fixation de RAD51 sur l'intermédiaire sb-db | 76 |
| Figure 33 : Histogramme récapitulatif de la proportion de filament complet formés en présence des différents acteurs de la RH | 77 |
| Figure 34 : Architecture des filaments RAD51 formés en présence de BRCA2 : | 78 |
| Figure 35 : Architecture des filaments RAD51 formés en présence de RAD52 | 79 |
| Figure 36 : Tailles des filaments RAD51 formés en présence des différents acteurs de la RH | 79 |
| Figure 37 : Formation de complexes synaptique | 83 |
| Figure 38 : Formation de complexes synaptique en présence de RAD52 | 85 |
| Figure 39 : Formation de complexes synaptique et de D-loop en fonction de la présence des différents acteurs de la RH | 87 |
| Figure 40 : Formation de complexes synaptique en présence de microhomologies : | 88 |
| Figure 41 : Polymérisation de MmRAD51 et SMRad51 sur l'ADN, activité d'invasion de brin | 93 |
| Figure 42 : L'expression de SMRad51 mène à une mort rapide chez les jeunes souris | 94 |
| Figure 43 : Impact de RAD51 et BRCA2 sur la balance RH versus SSA et Alt-EJ. | 99 |
| Figure 44 : Impact de RAD51 sur le SSA | 101 |
| Figure 45 : Capture du second brin et mise en place de la synthèse | 105 |

ABSTRACT IN ENGLISH

DNA is constantly damaged by endogenous and exogenous origin factors. Double-stranded breaks (DSB) are among the most toxic lesions that can cause cell death, but also cause genetic rearrangements that are harmful to the body. Homologous recombination (HR) is a major pathway for repairing DSB, it intervenes during replication, in the recovery of stalled and collapsed replication forks. The mechanism of HR is based on a genetic exchange using a homologous sequence as a template to accurately repair DNA, which is characterized at the molecular level by the formation of synaptic structures. This mechanism is divided into several stages (presynaptic, synaptic and postsynaptic) and they are well conserved throughout species. The HR mechanism is initiated by the formation of single-stranded (ss) DNA. Indeed, in the case of repairing DSB, the degradation of one of the 2 DNA strands on either side of the break results in the formation of an ssDNA end of several hundred nucleotides. This end is first covered by RPA which then serves as a 'platform' for the recruitment and assembly of other proteins. Recombinases (Rad51 in eukaryotes) are the core HR proteins that form the presynaptic nucleofilament capable of searching and finding homologous sequences within the entire genome. The search for homology and strand invasion involves the formation of synaptic complexes. Once homology is found, homologous pairing results in the formation of the heteroduplex with the complementary strand and displacement of the non-complementary strand from the Displacement-loop (D-loop). The invading strand can then serve as a primer for synthesis. In the later postsynaptic stages of HR, the D-loop can be resolved in different pathways, with or without crossing-over, resulting in repair of damaged DNA. HR is a very controlled process at different levels; its deregulation can lead to the formation of toxic, insoluble intermediates that cause cell death or even genetic instability responsible for carcinogenesis. In the presynaptic and synaptic stages, regulation of the nucleofilament and its activity by RAD51 partners plays an important role. My thesis project aims to study the architecture of HR intermediates in the presence of different actors (RPA, RAD51, BRCA2, RAD52) in order to better understand their roles and the interplay between them. This work was mainly carried out *in vitro* using purified proteins and synthesized DNA substrates mimicking HR intermediates. I used transmission electron microscopy (TEM) combined with biochemistry to study the different stages of HR and precisely determine the role of each actor. I first confirmed the mediating role of BRCA2 which is able to promote the assembly of complete filaments on ssDNA coated with RPA. Without BRCA2, the amount of filaments formed is negligible. Then, analysis of the architecture of complete filaments formed in the presence of RAD51 and RAD52 shows a participation of RAD52 in the composition of the filament and suggests a later role in HR. I have developed a test which consists of monitoring by TEM the intermediates formed during the D-loop reaction. It allows to analyze the architecture and the amount of synaptic complexes formed between the nucleofilament and a negatively supercoiled circular donor dsDNA. I see that the presence of RAD52 in the filaments significantly increases the formation of D-loop. It would be interesting to study in the future the role of RAD52 in the capture of the second strand as well as in the synthesis.

RESUME EN FRANÇAIS

L'ADN est constamment endommagé par des facteurs d'origine endogène et exogène. Les cassures double brin (CDB) sont parmi les lésions les plus toxiques pouvant être à l'origine de la mort cellulaire, mais également de réarrangements génétiques délétères pour l'organisme. La recombinaison homologe (RH) est une voie majeure de réparation des CDB, elle intervient au cours de la réplication, dans le redémarrage des fourches dont la progression est bloquée par un obstacle physique tel qu'une lésion présente sur un des brins. Le mécanisme de RH est basé sur un échange génétique utilisant une séquence homologe comme modèle pour réparer, ce qui se caractérise au niveau moléculaire par la formation de structures synaptiques joignant les molécules d'ADN. Ce mécanisme se décompose en plusieurs étapes (présynaptiques, synaptiques et postsynaptiques) conservées dans l'évolution et est initié par la formation d'ADN simple brin (sb). En effet, dans le cas de la réparation des CDB, la dégradation d'un des 2 brins d'ADN de part et d'autre de la cassure aboutit à la formation d'une extrémité d'ADNsb de plusieurs centaines de nucléotides. Cette extrémité est d'abord recouverte par RPA qui sert alors de 'plateforme' de recrutement et d'assemblage d'autres protéines. Les recombinases (Rad51 chez les eucaryotes) sont les protéines centrales de la RH qui forment avec l'ADNsb néoformé le nucléofilament présynaptique capable de chercher et trouver les séquences homologues au sein du génome entier. La recherche d'homologie et l'invasion de brin passent par la formation de molécules jointes ou complexes synaptiques. Une fois l'homologie trouvée, l'appariement homologe aboutit à la formation de l'hétéroduplex avec le brin complémentaire, au déplacement du brin non complémentaire pour former la structure de D-loop(Displacement-loop). Le brin envahissant peut alors servir d'amorce pour la synthèse. Dans les étapes post-synaptiques plus tardives de la RH, la D-loop peut être résolue dans différentes voies, avec ou sans crossing-over, aboutissant à la réparation de l'ADN endommagé. La RH est un processus très contrôlé à différents niveaux, sa dérégulation peut entraîner la formation d'intermédiaires toxiques, insolubles à l'origine de la mort cellulaire ou encore une instabilité génétique responsable de la cancérogenèse. Dans les étapes pré-synaptiques et synaptiques, la régulation du nucléofilament et de son activité par les partenaires de RAD51 joue un rôle important. Mon projet de thèse vise à étudier l'architecture des intermédiaires précoces de RH formés en présence de différents acteurs (RPA, RAD51, BRCA2, RAD52) afin de mieux comprendre leurs rôles et le jeu qui existe entre eux. Ces travaux ont été essentiellement réalisés *in vitro* en utilisant des protéines purifiées de la RH et des substrats d'ADN synthétisés mimant les intermédiaires de la RH. J'ai utilisé la microscopie électronique à transmission (MET) couplé à des techniques de biochimie classique pour étudier les différentes étapes de la RH et déterminer précisément le rôle de chaque acteur. J'ai d'abord confirmé le rôle médiateur de BRCA2 qui est capable de favoriser l'assemblage des filaments complets sur un ADNsb recouvert de RPA. Sans BRCA2, le nombre de filaments formés est négligeable. D'autre part, l'analyse de l'architecture de filaments complets formés en présence de RAD51 et RAD52 montre une participation de RAD52 à la composition du filament et suggère un rôle plus tardif dans la RH. J'ai mis au point un test qui consiste à suivre par MET les intermédiaires formés au

cours de la réaction de D-loop. Ceci permet d'analyser l'architecture et le nombre de complexes synaptiques formés entre le nucléofilament et un ADNdb donneur circulaire superenroulé négativement. Je vois que la présence de RAD52 dans les filaments augmente significativement la formation de D-loop. Il serait intéressant d'étudier par la suite le rôle de RAD52 dans la capture du second brin ainsi que dans la synthèse.

BIBLIOGRAPHIE

- Abreu, Carla M., Rohit Prakash, Peter J. Romanienko, Ignasi Roig, Scott Keeney, and Maria Jasin. 2018. "Shu Complex SWS1-SWSAP1 Promotes Early Steps in Mouse Meiotic Recombination." *Nature Communications* 9 (1): 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-06384-x>.
- Afshar, Negar, Bilge Argunhan, Maierdan Palihati, Goki Taniguchi, Hideo Tsubouchi, and Hiroshi Iwasaki. 2021. "A Novel Motif of Rad51 Serves as an Interaction Hub for Recombination Auxiliary Factors." Edited by Wolf-Dietrich Heyer, Jessica K Tyler, and Wolf-Dietrich Heyer. *ELife* 10 (January): e64131. <https://doi.org/10.7554/eLife.64131>.
- Aguilera, Andrés, and Tatiana García-Muse. 2012. "R Loops: From Transcription Byproducts to Threats to Genome Stability." *Molecular Cell* 46 (2): 115–24. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2012.04.009>.
- Aguilera, Andrés, and Belén Gómez-González. 2017. "DNA–RNA Hybrids: The Risks of DNA Breakage during Transcription." *Nature Structural & Molecular Biology* 24 (5): 439–43. <https://doi.org/10.1038/nsmb.3395>.
- Ahnesorg P, Smith P, and Jackson Sp. 2006. "XLF Interacts With the XRCC4-DNA Ligase IV Complex to Promote DNA Nonhomologous End-Joining." *Cell*. January 27, 2006. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16439205/>.
- Ahrabi S, Sarkar S, Pfister Sx, Pirovano G, Higgins Gs, Porter Ac, and Humphrey Tc. 2016. "A Role for Human Homologous Recombination Factors in Suppressing Microhomology-Mediated End Joining." *Nucleic Acids Research*. August 7, 2016. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27131361/>.
- Ait Saada A, Lambert Sae, and Carr Am. 2018. "Preserving Replication Fork Integrity and Competence via the Homologous Recombination Pathway." *DNA Repair*. November 2018. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30220600/>.
- Albala, J. S., M. P. Thelen, C. Prange, W. Fan, M. Christensen, L. H. Thompson, and G. G. Lennon. 1997. "Identification of a Novel Human RAD51 Homolog, RAD51B." *Genomics* 46 (3): 476–79. <https://doi.org/10.1006/geno.1997.5062>.
- Amitani, Ichiro, Ronald J. Baskin, and Stephen C. Kowalczykowski. 2006. "Visualization of Rad54, a Chromatin Remodeling Protein, Translocating on Single DNA Molecules." *Molecular Cell*. Vol. 23. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2006.05.009>.
- Anand, Syam P., Haocheng Zheng, Piero R. Bianco, Sanford H. Leuba, and Saleem A. Khan. 2007. "DNA Helicase Activity of PcrA Is Not Required for the Displacement of RecA Protein from DNA or Inhibition of RecA-Mediated Strand Exchange." *Journal of Bacteriology* 189 (12): 4502–9. <https://doi.org/10.1128/JB.00376-07>.
- Andres, Sara N., Alexandra Vergnes, Dejan Ristic, Claire Wyman, Mauro Modesti, and Murray Junop. 2012. "A Human XRCC4–XLF Complex Bridges DNA." *Nucleic Acids Research* 40 (4): 1868–78. <https://doi.org/10.1093/nar/gks022>.
- Arunkumar Ai, Stauffer Me, Bochkareva E, Bochkarev A, and Chazin Wj. 2003. "Independent and Coordinated Functions of Replication Protein A Tandem High Affinity Single-Stranded DNA Binding Domains." *The Journal of Biological Chemistry*. October 17, 2003. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12881520/>.
- Aten, Jacob A., Jan Stap, Przemek M. Krawczyk, Carel H. van Oven, Ron A. Hoebe, Jeroen Essers, and Roland Kanaar. 2004. "Dynamics of DNA Double-Strand Breaks Revealed by

- Clustering of Damaged Chromosome Domains.” *Science (New York, N.Y.)* 303 (5654): 92–95. <https://doi.org/10.1126/science.1088845>.
- Aylon Y, Liefshitz B, and Kupiec M. 2004. “The CDK Regulates Repair of Double-Strand Breaks by Homologous Recombination during the Cell Cycle.” *The EMBO Journal*. August 12, 2004. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15549137/>.
- Aymard, François, Beatrix Bugler, Christine K. Schmidt, Emmanuelle Guillou, Pierre Caron, Sébastien Briois, Jason S. Iacovoni, et al. 2014. “Transcriptionally Active Chromatin Recruits Homologous Recombination at DNA Double-Strand Breaks.” *Nature Structural & Molecular Biology* 21 (4): 366–74. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2796>.
- B, Gibb, Ye Lf, Gergoudis Sc, Kwon Y, Niu H, Sung P, and Greene Ec. 2014. “Concentration-Dependent Exchange of Replication Protein A on Single-Stranded DNA Revealed by Single-Molecule Imaging.” *PloS One*. February 2014.
- Bachrati, Csanád Z., Rhona H. Borts, and Ian D. Hickson. 2006. “Mobile D-Loops Are a Preferred Substrate for the Bloom’s Syndrome Helicase.” *Nucleic Acids Research* 34 (8): 2269–79. <https://doi.org/10.1093/nar/gkl258>.
- Ball Hl, Myers Js, and Cortez D. 2005. “ATRIP Binding to Replication Protein A-Single-Stranded DNA Promotes ATR-ATRIP Localization but Is Dispensable for Chk1 Phosphorylation.” *Molecular Biology of the Cell*. May 2005. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15743907/>.
- Bansbach Ce, Bétous R, Lovejoy Ca, Glick Gg, and Cortez D. 2009. “The Annealing Helicase SMARCAL1 Maintains Genome Integrity at Stalled Replication Forks.” *Genes & Development*. October 15, 2009. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19793861/>.
- Barber, Louise J., Jillian L. Youds, Jordan D. Ward, Michael J. McIlwraith, Nigel J. O’Neil, Mark I. R. Petalcorin, Julie S. Martin, et al. 2008. “RTEL1 Maintains Genomic Stability by Suppressing Homologous Recombination.” *Cell* 135 (2): 261–71. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.08.016>.
- Bass Te, Luzwick Jw, Kavanaugh G, Carroll C, Dungrawala H, Glick Gg, Feldkamp Md, Putney R, Chazin Wj, and Cortez D. 2016. “ETAA1 Acts at Stalled Replication Forks to Maintain Genome Integrity.” *Nature Cell Biology*. November 2016. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27723720/>.
- Baumann, P., and S. C. West. 1998. “Role of the Human RAD51 Protein in Homologous Recombination and Double-Stranded-Break Repair.” *Trends in Biochemical Sciences* 23 (7): 247–51.
- Bell, Jason C., Jody L. Plank, Christopher C. Dombrowski, and Stephen C. Kowalczykowski. 2012. “Direct Imaging of RecA Nucleation and Growth on Single Molecules of SSB-Coated SsDNA.” *Nature* 491 (7423): 274–78. <https://doi.org/10.1038/nature11598>.
- Beloin C, Jeusset J, Revet B, Mirambeau G, Le Hégarat F, and Le Cam E. 2003. “Contribution of DNA Conformation and Topology in Right-Handed DNA Wrapping by the Bacillus Subtilis LrpC Protein.” *The Journal of Biological Chemistry*. February 14, 2003. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12458218/>.
- Benson, F. E., P. Baumann, and S. C. West. 1998. “Synergistic Actions of Rad51 and Rad52 in Recombination and DNA Repair.” *Nature* 391 (6665): 401–4. <https://doi.org/10.1038/34937>.
- Bernards Ss, Pennington Kp, Harrell Mi, Agnew Kj, Garcia Rl, Norquist Bm, and Swisher Em. 2018. “Clinical Characteristics and Outcomes of Patients with BRCA1 or RAD51C Methylated versus Mutated Ovarian Carcinoma.” *Gynecologic Oncology*. February 2018. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29233532/>.

- Bétermier M, Bertrand P, and Lopez Bs. 2014. “Is Non-Homologous End-Joining Really an Inherently Error-Prone Process?” *PLoS Genetics*. January 2014. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24453986/>.
- Bhat Kp, and Cortez D. 2018. “RPA and RAD51: Fork Reversal, Fork Protection, and Genome Stability.” *Nature Structural & Molecular Biology*. June 2018. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29807999/>.
- Bhowmick, Rahul, Sheroy Minocherhomji, and Ian D. Hickson. 2016. “RAD52 Facilitates Mitotic DNA Synthesis Following Replication Stress.” *Molecular Cell* 64 (6): 1117–26. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.10.037>.
- Bizard, Anna H., and Ian D. Hickson. 2014. “The Dissolution of Double Holliday Junctions.” *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 6 (7): a016477. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a016477>.
- Blanco, Ana, Sara Gutiérrez-Enríquez, Marta Santamariña, Gemma Montalban, Sandra Bonache, Judith Balmaña, Angel Carracedo, Orland Diez, and Ana Vega. 2014. “RAD51C Germline Mutations Found in Spanish Site-Specific Breast Cancer and Breast-Ovarian Cancer Families.” *Breast Cancer Research and Treatment* 147 (1): 133–43. <https://doi.org/10.1007/s10549-014-3078-4>.
- Bochkareva E, Kaustov L, Ayed A, Yi Gs, Lu Y, Pineda-Lucena A, Liao Jc, et al. 2005. “Single-Stranded DNA Mimicry in the P53 Transactivation Domain Interaction with Replication Protein A.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. October 25, 2005. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16234232/>.
- Bochkareva E, Korolev S, Lees-Miller Sp, and Bochkarev A. 2002. “Structure of the RPA Trimerization Core and Its Role in the Multistep DNA-Binding Mechanism of RPA.” *The EMBO Journal*. February 4, 2002. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11927569/>.
- Booth Ds, Avila-Sakar A, and Cheng Y. 2011. “Visualizing Proteins and Macromolecular Complexes by Negative Stain EM: From Grid Preparation to Image Acquisition.” *Journal of Visualized Experiments : JoVE*. December 22, 2011. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22215030/>.
- Bothmer, Anne, Davide F. Robbiani, Niklas Feldhahn, Anna Gazumyan, Andre Nussenzweig, and Michel C. Nussenzweig. 2010. “53BP1 Regulates DNA Resection and the Choice between Classical and Alternative End Joining during Class Switch Recombination.” *Journal of Experimental Medicine* 207 (4): 855–65. <https://doi.org/10.1084/jem.20100244>.
- Bouwman, Peter, Amal Aly, Jose M. Escandell, Mark Pieterse, Jirina Bartkova, Hanneke van der Gulden, Sanne Hiddingh, et al. 2010. “53BP1 Loss Rescues BRCA1 Deficiency and Is Associated with Triple-Negative and BRCA-Mutated Breast Cancers.” *Nature Structural & Molecular Biology* 17 (6): 688–95. <https://doi.org/10.1038/nsmb.1831>.
- Brackley, Chris A., Mike E. Cates, and Davide Marenduzzo. 2013. “Effect of DNA Conformation on Facilitated Diffusion.” *Biochemical Society Transactions* 41 (2): 582–88. <https://doi.org/10.1042/BST20120234>.
- Braybrooke, Jeremy P., Ji-Liang Li, Leonard Wu, Fiona Caple, Fiona E. Benson, and Ian D. Hickson. 2003. “Functional Interaction between the Bloom’s Syndrome Helicase and the RAD51 Paralog, RAD51L3 (RAD51D).” *Journal of Biological Chemistry* 278 (48): 48357–66. <https://doi.org/10.1074/jbc.M308838200>.
- Brenner S, and Horne R. 1959. “A Negative Staining Method for High Resolution Electron Microscopy of Viruses.” *Biochimica et Biophysica Acta*. July 1959. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/13804200/>.

- Bressan Da, Baxter Bk, and Petrini Jh. 1999. "The Mre11-Rad50-Xrs2 Protein Complex Facilitates Homologous Recombination-Based Double-Strand Break Repair in *Saccharomyces Cerevisiae*." *Molecular and Cellular Biology*. November 1999. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10523656/>.
- Brouwer I, Zhang H, Candelli A, Normanno D, Peterman E, Wuite G, and Modesti M. 2017. "Human RAD52 Captures and Holds DNA Strands, Increases DNA Flexibility, and Prevents Melting of Duplex DNA: Implications for DNA Recombination." *Cell Reports*. March 21, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.02.068>.
- Bugreev, Dmitry V., Xiong Yu, Edward H. Egelman, and Alexander V. Mazin. 2007. "Novel Pro- and Anti-Recombination Activities of the Bloom's Syndrome Helicase." *Genes and Development* 21 (23): 3085–94. <https://doi.org/10.1101/gad.1609007>.
- Bugreev Dv, and Mazin Av. 2004. "Ca²⁺ Activates Human Homologous Recombination Protein Rad51 by Modulating Its ATPase Activity." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. June 7, 2004. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15226506/>.
- Buisson, Rémi, Anne-Marie Dion-Côté, Yan Coulombe, H  l  ne Launay, Hong Cai, Alicja Z Stasiak, Andrzej Stasiak, Bing Xia, and Jean-Yves Masson. 2010. "Cooperation of Breast Cancer Proteins PALB2 and Piccolo BRCA2 in Stimulating Homologous Recombination." *Nature Structural & Molecular Biology* 17 (10): 1247–54. <https://doi.org/10.1038/nsmb.1915>.
- Bunting, Samuel F., Elsa Call  n, Nancy Wong, Hua-Tang Chen, Federica Polato, Amanda Gunn, Anne Bothmer, et al. 2010. "53BP1 Inhibits Homologous Recombination in Brca1-Deficient Cells by Blocking Resection of DNA Breaks." *Cell* 141 (2): 243–54. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.03.012>.
- Candelli, Andrea, Jan Thomas Holthausen, Martin Depken, Ineke Brouwer, Mari  lla A. M. Franker, Margherita Marchetti, Iddo Heller, et al. 2014. "Visualization and Quantification of Nascent RAD51 Filament Formation at Single-Monomer Resolution." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111 (42): 15090–95. <https://doi.org/10.1073/pnas.1307824111>.
- Carreira, Aura, Jovencio Hilario, Ichiro Amitani, Ronald J. Baskin, Mahmud K. K. Shivji, Ashok R. Venkitaraman, and Stephen C. Kowalczykowski. 2009. "The BRC Repeats of BRCA2 Modulate the DNA-Binding Selectivity of RAD51." *Cell* 136 (6): 1032–43. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.02.019>.
- Carreira, Aura, and Stephen C. Kowalczykowski. 2011. "Two Classes of BRC Repeats in BRCA2 Promote RAD51 Nucleoprotein Filament Function by Distinct Mechanisms." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108 (26): 10448–53. <https://doi.org/10.1073/pnas.1106971108>.
- Carter Sd, Vidasov   D, Chen J, Chovanec M, and Astr  m Su. 2009. "Nej1 Recruits the Srs2 Helicase to DNA Double-Strand Breaks and Supports Repair by a Single-Strand Annealing-like Mechanism." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. July 21, 2009. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19571008/>.
- Ceccaldi R, Liu Jc, Amunugama R, Hajdu I, Primack B, Petalcorin Mi, O'Connor Kw, et al. 2015. "Homologous-Recombination-Deficient Tumours Are Dependent on Pol  -Mediated Repair." *Nature*. December 2, 2015. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25642963/>.
- Cejka P, Plank JI, Bachrati Cz, Hickson Id, and Kowalczykowski Sc. 2010. "Rmi1 Stimulates Decatenation of Double Holliday Junctions during Dissolution by Sgs1-Top3." *Nature Structural & Molecular Biology*. November 2010. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20935631/>.
- Chang, Howard H. Y., Nicholas R. Pannunzio, Noritaka Adachi, and Michael R. Lieber. 2017. "Non-Homologous DNA End Joining and Alternative Pathways to Double-Strand Break

- Repair.” *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 18 (8): 495–506. <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.48>.
- Chapman Jr, Taylor Mr, and Boulton Sj. 2012. “Playing the End Game: DNA Double-Strand Break Repair Pathway Choice.” *Molecular Cell*. August 24, 2012. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22920291/>.
- Chen, Chi-Fen, Phang-Lang Chen, Qing Zhong, Z. Dave Sharp, and Wen-Hwa Lee. 1999. “Expression of BRC Repeats in Breast Cancer Cells Disrupts the BRCA2-Rad51 Complex and Leads to Radiation Hypersensitivity and Loss of G2/M Checkpoint Control.” *Journal of Biological Chemistry* 274 (46): 32931–35. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.46.32931>.
- Chen R, Subramanyam S, Elcock Ah, Spies M, and Wold Ms. 2016. “Dynamic Binding of Replication Protein a Is Required for DNA Repair.” *Nucleic Acids Research*. August 7, 2016. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27131385/>.
- Chen Sh, Plank JI, Willcox S, Griffith Jd, and Hsieh Ts. 2014. “Top3 α Is Required during the Convergent Migration Step of Double Holliday Junction Dissolution.” *PloS One*. February 1, 2014. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24392087/>.
- Chen, X. B., R. Melchionna, C. M. Denis, Pierre-Henri L. Gaillard, A. Blasina, I. Van de Weyer, M. N. Boddy, P. Russell, J. Vialard, and C. H. McGowan. 2001. “Human Mus81-Associated Endonuclease Cleaves Holliday Junctions in Vitro.” *Molecular Cell* 8 (5): 1117–27. [https://doi.org/10.1016/s1097-2765\(01\)00375-6](https://doi.org/10.1016/s1097-2765(01)00375-6).
- Cherstvy, A. G., A. B. Kolomeisky, and A. A. Kornyshev. 2008. “Protein--DNA Interactions: Reaching and Recognizing the Targets.” *The Journal of Physical Chemistry. B* 112 (15): 4741–50. <https://doi.org/10.1021/jp076432e>.
- Chinn Ik, and Shearer Wt. 2015. “Severe Combined Immunodeficiency Disorders.” *Immunology and Allergy Clinics of North America*. November 2015. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26454313/>.
- Cho, Nam Woo, Robert L. Dilley, Michael A. Lampson, and Roger A. Greenberg. 2014. “Interchromosomal Homology Searches Drive Directional ALT Telomere Movement and Synapsis.” *Cell* 159 (1): 108–21. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.08.030>.
- Choi, Jun-Hyuk, Laura A. Lindsey-Boltz, Michael Kemp, Aaron C. Mason, Marc S. Wold, and Aziz Sancar. 2010. “Reconstitution of RPA-Covered Single-Stranded DNA-Activated ATR-Chk1 Signaling.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107 (31): 13660–65. <https://doi.org/10.1073/pnas.1007856107>.
- Christiansen G, and Griffith J. 1986. “Visualization of the Paranemic Joining of Homologous DNA Molecules Catalyzed by the RecA Protein of Escherichia Coli.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. April 1986. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3515345/>.
- Chu, Wai Kit, Miranda J. Payne, Petra Beli, Katsuhiko Hanada, Chunaram Choudhary, and Ian D. Hickson. 2015. “FBH1 Influences DNA Replication Fork Stability and Homologous Recombination through Ubiquitylation of RAD51.” *Nature Communications* 6. <https://doi.org/10.1038/ncomms6931>.
- Ciccio A, Bredemeyer Al, Sowa Me, Terret Me, Jallepalli Pv, Harper Jw, and Elledge Sj. 2009. “The SIOD Disorder Protein SMARCAL1 Is an RPA-Interacting Protein Involved in Replication Fork Restart.” *Genes & Development*. October 15, 2009. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19793862/>.
- Clements Ke, Thakar T, Nicolae Cm, Liang X, Wang Hg, and Moldovan Gl. 2018. “Loss of E2F7 Confers Resistance to Poly-ADP-Ribose Polymerase (PARP) Inhibitors in BRCA2-Deficient

- Cells.” *Nucleic Acids Research*. September 28, 2018. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30032296/>.
- Cognet Ja, Pakleza C, Cherny D, Delain E, and Cam El. 1999. “Static Curvature and Flexibility Measurements of DNA with Microscopy. A Simple Renormalization Method, Its Assessment by Experiment and Simulation.” *Journal of Molecular Biology*. January 22, 1999. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9887263/>.
- Conway, Adam B., Thomas W. Lynch, Ying Zhang, Gary S. Fortin, Cindy W. Fung, Lorraine S. Symington, and Phoebe A. Rice. 2004. “Crystal Structure of a Rad51 Filament.” *Nature Structural & Molecular Biology* 11 (8): 791–96. <https://doi.org/10.1038/nsmb795>.
- Cortez D. 2015. “Preventing Replication Fork Collapse to Maintain Genome Integrity.” *DNA Repair*. August 2015. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25957489/>.
- Costes, Audrey, and Sarah A. E. Lambert. 2012. “Homologous Recombination as a Replication Fork Escort: Fork-Protection and Recovery.” *Biomolecules* 3 (1): 39–71. <https://doi.org/10.3390/biom3010039>.
- Cox, M. M., M. F. Goodman, K. N. Kreuzer, D. J. Sherratt, S. J. Sandler, and K. J. Mariani. 2000. “The Importance of Repairing Stalled Replication Forks.” *Nature* 404 (6773): 37–41. <https://doi.org/10.1038/35003501>.
- Cramer-Morales K, Nieborowska-Skorska M, Scheibner K, Padgett M, Irvine Da, Sliwinski T, Haas K, et al. 2013. “Personalized Synthetic Lethality Induced by Targeting RAD52 in Leukemias Identified by Gene Mutation and Expression Profile.” *Blood*. August 15, 2013. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23836560/>.
- Crickard, J. Brooks, and Eric C. Greene. 2019. “Helicase Mechanisms During Homologous Recombination in *Saccharomyces Cerevisiae*.” *Annual Review of Biophysics* 48 (1): 255–73. <https://doi.org/10.1146/annurev-biophys-052118-115418>.
- Crickard Jb, Moevus Cj, Kwon Y, Sung P, and Greene Ec. 2020. “Rad54 Drives ATP Hydrolysis-Dependent DNA Sequence Alignment during Homologous Recombination.” *Cell*. November 6, 2020. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32502392/>.
- Cromie Ga, Connelly Jc, and Leach Dr. 2001. “Recombination at Double-Strand Breaks and DNA Ends: Conserved Mechanisms from Phage to Humans.” *Molecular Cell*. December 2001. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11779493/>.
- Crossley, Madzia P., Michael Bocek, and Karlene A. Cimprich. 2019. “R-Loops as Cellular Regulators and Genomic Threats.” *Molecular Cell* 73 (3): 398–411. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2019.01.024>.
- 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.” *Molecular Cell*. September 3, 2012. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22325992/>.
- Deng Sk, Gibb B, de Almeida Mj, Greene Ec, and Symington Ls. 2014. “RPA Antagonizes Microhomology-Mediated Repair of DNA Double-Strand Breaks.” *Nature Structural & Molecular Biology*. April 2014. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24608368/>.
- Dray, Eloïse, Julia Etchin, Claudia Wiese, Dorina Saro, Gareth J. Williams, Michal Hammel, Xiong Yu, et al. 2010. “Enhancement of the RAD51 Recombinase Activity by the Tumor Suppressor PALB2.” *Nature Structural & Molecular Biology* 17 (10): 1255–59. <https://doi.org/10.1038/nsmb.1916>.
- Dubochet J, Ducommun M, Zollinger M, and Kellenberger E. 1971. “A New Preparation Method for Dark-Field Electron Microscopy of Biomacromolecules.” *Journal of Ultrastructure Research*. April 1971. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/4931423/>.

- Dubrana, Karine, Haico van Attikum, Florence Hediger, and Susan M. Gasser. 2007. "The Processing of Double-Strand Breaks and Binding of Single-Strand-Binding Proteins RPA and Rad51 Modulate the Formation of ATR-Kinase Foci in Yeast." *Journal of Cell Science* 120 (Pt 23): 4209–20. <https://doi.org/10.1242/jcs.018366>.
- Dueva, Rositsa, and George Iliakis. 2013. "Alternative Pathways of Non-Homologous End Joining (NHEJ) in Genomic Instability and Cancer." *Translational Cancer Research* 2 (3): 163–77. <https://doi.org/10.21037/1152>.
- Dungrawala H, Bhat Kp, Le Meur R, Chazin Wj, Ding X, Sharan Sk, Wessel Sr, Sathe Aa, Zhao R, and Cortez D. 2017. "RADX Promotes Genome Stability and Modulates Chemosensitivity by Regulating RAD51 at Replication Forks." *Molecular Cell*. March 8, 2017. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28735897/>.
- Dupaigne, Pauline, Christophe Lavelle, Anthony Justome, Sophie Lafosse, Gilles Mirambeau, Marc Lipinski, Olivier Piétrement, and Eric Le Cam. 2008. "Rad51 Polymerization Reveals a New Chromatin Remodeling Mechanism." *PLOS ONE* 3 (11): e3643. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003643>.
- Dupaigne, Pauline, Cyrille Le Breton, Francis Fabre, Serge Gangloff, Eric Le Cam, and Xavier Veaute. 2008. "The Srs2 Helicase Activity Is Stimulated by Rad51 Filaments on DsDNA: Implications for Crossover Incidence during Mitotic Recombination." *Molecular Cell* 29 (2): 243–54. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2007.11.033>.
- Eggler, Aimee L., Ross B. Inman, and Michael M. Cox. 2002. "The Rad51-Dependent Pairing of Long DNA Substrates Is Stabilized by Replication Protein A." *The Journal of Biological Chemistry* 277 (42): 39280–88. <https://doi.org/10.1074/jbc.M204328200>.
- Eid, Wassim, Martin Steger, Mahmoud El-Shemerly, Lorenza P. Ferretti, Javier Peña-Díaz, Christiane König, Emanuele Valtorta, Alessandro A. Sartori, and Stefano Ferrari. 2010. "DNA End Resection by CtIP and Exonuclease 1 Prevents Genomic Instability." *EMBO Reports* 11 (12): 962–68. <https://doi.org/10.1038/embor.2010.157>.
- Elvers I, Johansson F, Groth P, Erixon K, and Helleday T. 2011. "UV Stalled Replication Forks Restart by Re-Priming in Human Fibroblasts." *Nucleic Acids Research*. January 9, 2011. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21646340/>.
- Esashi F, Galkin Ve, Yu X, Egelman Eh, and West Sc. 2007. "Stabilization of RAD51 Nucleoprotein Filaments by the C-Terminal Region of BRCA2." *Nature Structural & Molecular Biology*. June 2007. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17515904/>.
- Escribano-Díaz, Cristina, Alexandre Orthwein, Amélie Fradet-Turcotte, Mengtan Xing, Jordan T. F. Young, Ján Tkáč, Michael A. Cook, et al. 2013. "A Cell Cycle-Dependent Regulatory Circuit Composed of 53BP1-RIF1 and BRCA1-CtIP Controls DNA Repair Pathway Choice." *Molecular Cell* 49 (5): 872–83. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2013.01.001>.
- Farmer H, McCabe N, Lord Cj, Tutt An, Johnson Da, Richardson Tb, Santarosa M, et al. 2005. "Targeting the DNA Repair Defect in BRCA Mutant Cells as a Therapeutic Strategy." *Nature*. April 14, 2005. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15829967/>.
- Fekairi, Samira, Sarah Scaglione, Charly Chahwan, Ewan R. Taylor, Agnès Tissier, Stéphane Coulon, Meng-Qiu Dong, et al. 2009. "Human SLX4 Is a Holliday Junction Resolvase Subunit That Binds Multiple DNA Repair/Recombination Endonucleases." *Cell* 138 (1): 78–89. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.06.029>.
- Feng, Zhihui, Shaun P. Scott, Wendy Bussen, Girdhar G. Sharma, Gongshe Guo, Tej K. Pandita, and Simon N. Powell. 2011a. "Rad52 Inactivation Is Synthetically Lethal with BRCA2 Deficiency." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*

- 108 (2): 686–91. <https://doi.org/10.1073/pnas.1010959107>.
- . 2011b. “Rad52 Inactivation Is Synthetically Lethal with BRCA2 Deficiency.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108 (2): 686–91. <https://doi.org/10.1073/pnas.1010959107>.
- Ferretti Lp, Lafranchi L, and Sartori Aa. 2013. “Controlling DNA-End Resection: A New Task for CDKs.” *Frontiers in Genetics*. March 6, 2013. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23760669/>.
- Flynn Rl, and Zou L. 2010. “Oligonucleotide/Oligosaccharide-Binding Fold Proteins: A Growing Family of Genome Guardians.” *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*. August 2010. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20515430/>.
- Foulkes Wd, Knoppers Bm, and Turnbull C. 2016. “Population Genetic Testing for Cancer Susceptibility: Founder Mutations to Genomes.” *Nature Reviews. Clinical Oncology*. January 2016. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26483301/>.
- Fouquin A, Guirouilh-Barbat J, Lopez B, Hall J, Amor-Gu eret M, and Pennaneach V. 2017. “PARP2 Controls Double-Strand Break Repair Pathway Choice by Limiting 53BP1 Accumulation at DNA Damage Sites and Promoting End-Resection.” *Nucleic Acids Research*. January 12, 2017. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29036662/>.
- Fradet-Turcotte, Am elie, Justine Sitz, Damien Grapton, and Alexandre Orthwein. 2016. “BRCA2 Functions: From DNA Repair to Replication Fork Stabilization.” *Endocrine-Related Cancer* 23 (10): T1–17. <https://doi.org/10.1530/ERC-16-0297>.
- Fugger, Kasper, Martin Mistrik, Jannie Rendtlew Danielsen, Christoffel Dinant, Jacob Falck, Jiri Bartek, Jiri Lukas, and Niels Mailand. 2009. “Human Fbh1 Helicase Contributes to Genome Maintenance via Pro- and Anti-Recombinase Activities.” *Journal of Cell Biology* 186 (5): 655–63. <https://doi.org/10.1083/jcb.200812138>.
- Gelot, Camille, Jos ee Guirouilh-Barbat, and Bernard S. Lopez. 2016. “The Cohesin Complex Prevents the End-Joining of Distant DNA Double-Strand Ends in S Phase: Consequences on Genome Stability Maintenance.” *Nucleus* 7 (4): 339–45. <https://doi.org/10.1080/19491034.2016.1194159>.
- Girard, Chloe, Liudmila Chelysheva, Sandrine Choinard, Nicole Froger, Nicolas Macaisne, Afef Lehmendi, Julien Mazel, Wayne Crismani, and Raphael Mercier. 2015. “AAA-ATPase FIDGETIN-LIKE 1 and Helicase FANCM Antagonize Meiotic Crossovers by Distinct Mechanisms.” *PLOS Genetics* 11 (7): e1005369. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005369>.
- Godin, Stephen K., Zhuying Zhang, Benjamin W. Herken, James W. Westmoreland, Alison G. Lee, Michael J. Mihalevic, Zhongxun Yu, Robert W. Sobol, Michael A. Resnick, and Kara A. Bernstein. 2016. “The Shu Complex Promotes Error-Free Tolerance of Alkylation-Induced Base Excision Repair Products.” *Nucleic Acids Research* 44 (17): 8199–8215. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw535>.
- Gottlieb Tm and Jackson Sp. 1993. “The DNA-Dependent Protein Kinase: Requirement for DNA Ends and Association With Ku Antigen.” *Cell*. January 15, 1993. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8422676/>.
- Guilliam Ta, Brissett Nc, Ehlinger A, Keen Ba, Kolesar P, Taylor Em, Bailey Lj, Lindsay Hd, Chazin Wj, and Doherty Aj. 2017. “Molecular Basis for PrimPol Recruitment to Replication Forks by RPA.” *Nature Communications*. May 23, 2017. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28534480/>.
- Guirouilh-Barbat J, Rass E, Plo I, Bertrand P, and Lopez Bs. 2007. “Defects in XRCC4 and KU80 Differentially Affect the Joining of Distal Nonhomologous Ends.” *Proceedings of the National*

- Academy of Sciences of the United States of America. December 26, 2007. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18093953/>.
- Hakem, R., J. L. de la Pompa, and T. W. Mak. 1998. "Developmental Studies of Brca1 and Brca2 Knock-out Mice." *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia* 3 (4): 431–45. <https://doi.org/10.1023/a:1018792200700>.
- Hammel, Michal, Yaping Yu, Brandi L. Mahaney, Brandon Cai, Ruiqiong Ye, Barry M. Phipps, Robert P. Rambo, et al. 2010. "Ku and DNA-Dependent Protein Kinase Dynamic Conformations and Assembly Regulate DNA Binding and the Initial Non-Homologous End Joining Complex *." *Journal of Biological Chemistry* 285 (2): 1414–23. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.065615>.
- Han J, Ruan C, Huen Msy, Wang J, Xie A, Fu C, Liu T, and Huang J. 2017. "BRCA2 Antagonizes Classical and Alternative Nonhomologous End-Joining to Prevent Gross Genomic Instability." *Nature Communications*. November 13, 2017. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29133916/>.
- Hartwell Lh, Szankasi P, Roberts Cj, Murray Aw, and Friend Sh. 1997. "Integrating Genetic Approaches into the Discovery of Anticancer Drugs." *Science (New York, N.Y.)*. July 11, 1997. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9353181/>.
- Hashimoto Y, Ray Chaudhuri A, Lopes M, and Costanzo V. 2010. "Rad51 Protects Nascent DNA from Mre11-Dependent Degradation and Promotes Continuous DNA Synthesis." *Nature Structural & Molecular Biology*. November 2010. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20935632/>.
- Hays, S. L., A. A. Firmenich, and P. Berg. 1995. "Complex Formation in Yeast Double-Strand Break Repair: Participation of Rad51, Rad52, Rad55, and Rad57 Proteins." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92 (15): 6925–29.
- Hoa Nn, Kobayashi J, Omura M, Hirakawa M, Yang Sh, Komatsu K, Paull Tt, Takeda S, and Sasanuma H. 2015. "BRCA1 and CtIP Are Both Required to Recruit Dna2 at Double-Strand Breaks in Homologous Recombination." *PloS One*. April 24, 2015. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25909997/>.
- Honglin Song, Ed Dicks, Susan J. Ramus, Jonathan P. Tyrer, Maria P. Intermaggio, Jane Hayward, Christopher K. Edlund, et al. 2015. "Contribution of Germline Mutations in the RAD51B, RAD51C, and RAD51D Genes to Ovarian Cancer in the Population." *Journal of Clinical Oncology* 33 (26): 2901–7. <https://doi.org/10.1200/JCO.2015.61.2408>.
- Horne Rw, and Ronchetti Ip. 1974. "A Negative Staining-Carbon Film Technique for Studying Viruses in the Electron Microscope. I. Preparative Procedures for Examining Icosahedral and Filamentous Viruses." *Journal of Ultrastructure Research*. June 1974. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/4134731/>.
- Howard-Flanders P, West Sc, and Stasiak A. 1984. "Role of RecA Protein Spiral Filaments in Genetic Recombination." *Nature*. May 17, 1984. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6325943/>.
- Hu, Yiduo, Steven Raynard, Michael G Sehorn, Xincheng Lu, Wendy Bussen, Lu Zheng, Jeremy M Stark, et al. 2007. "RECQL5/Recql5 Helicase Regulates Homologous Recombination and Suppresses Tumor Formation via Disruption of Rad51 Presynaptic Filaments." *Genes & Development* 21 (23): 3073–84. <https://doi.org/10.1101/gad.1609107>.
- Huang J, and Dynan Ws. 2002. "Reconstitution of the Mammalian DNA Double-Strand Break End-Joining Reaction Reveals a Requirement for an Mre11/Rad50/NBS1-Containing Fraction." *Nucleic Acids Research*. January 2, 2002. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11809878/>.
- Huselid, Eric, and Samuel F. Bunting. 2020. "The Regulation of Homologous Recombination by Helicases." *Genes* 11 (5). <https://doi.org/10.3390/genes11050498>.

- Ip, Stephen C. Y., Ulrich Rass, Miguel G. Blanco, Helen R. Flynn, J. Mark Skehel, and Stephen C. West. 2008. "Identification of Holliday Junction Resolvases from Humans and Yeast." *Nature* 456 (7220): 357–61. <https://doi.org/10.1038/nature07470>.
- Ito, Kentaro, Yasuto Murayama, Yumiko Kurokawa, Shuji Kanamaru, Yuichi Kokabu, Takahisa Maki, Tsutomu Mikawa, et al. 2020. "Real-Time Tracking Reveals Catalytic Roles for the Two DNA Binding Sites of Rad51." *Nature Communications* 11 (1): 1–7. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-16750-3>.
- Iwasaki D, Hayashihara K, Shima H, Higashide M, Terasawa M, Gasser Sm, and Shinohara M. 2016. "The MRX Complex Ensures NHEJ Fidelity through Multiple Pathways Including Xrs2-FHA-Dependent Tel1 Activation." *PLoS Genetics*. March 18, 2016. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26990569/>.
- Jasin, Maria, and Rodney Rothstein. 2013. "Repair of Strand Breaks by Homologous Recombination." *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 5 (11): a012740. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a012740>.
- Jensen, Ryan B., Aura Carreira, and Stephen C. Kowalczykowski. 2010a. "Purified Human BRCA2 Stimulates RAD51-Mediated Recombination." *Nature* 467 (7316): 678–83. <https://doi.org/10.1038/nature09399>.
- Jensen, Ryan B, Aura Carreira, and Stephen C Kowalczykowski. 2010b. "Purified Human BRCA2 Stimulates RAD51-Mediated Recombination." *Nature* 467 (7316): 678–83. <https://doi.org/10.1038/nature09399>.
- Jones, N. J., R. Cox, and J. Thacker. 1987. "Isolation and Cross-Sensitivity of X-Ray-Sensitive Mutants of V79-4 Hamster Cells." *Mutation Research* 183 (3): 279–86. [https://doi.org/10.1016/0167-8817\(87\)90011-3](https://doi.org/10.1016/0167-8817(87)90011-3).
- Kaelin Wg. 2005. "The Concept of Synthetic Lethality in the Context of Anticancer Therapy." *Nature Reviews. Cancer*. September 2005. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16110319/>.
- Kaniecki, Kyle, Luisina De Tullio, Bryan Gibb, Youngho Kwon, Patrick Sung, and Eric C. Greene. 2017. "Dissociation of Rad51 Presynaptic Complexes and Heteroduplex DNA Joints by Tandem Assemblies of Srs2." *Cell Reports* 21 (11): 3166–77. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.11.047>.
- 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." *Molecular Cell*. July 27, 2012. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22841003/>.
- Karow, J. K., A. Constantinou, J. L. Li, S. C. West, and I. D. Hickson. 2000. "The Bloom's Syndrome Gene Product Promotes Branch Migration of Holliday Junctions." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97 (12): 6504–8. <https://doi.org/10.1073/pnas.100448097>.
- Kijas Aw, Lim Yc, Bolderson E, Cersaletti K, Gatei M, Jakob B, Tobias F, et al. 2015. "ATM-Dependent Phosphorylation of MRE11 Controls Extent of Resection during Homology Directed Repair by Signalling through Exonuclease 1." *Nucleic Acids Research*. September 30, 2015. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26240375/>.
- Kim C, Paulus Bf, and Wold Ms. 1994. "Interactions of Human Replication Protein A with Oligonucleotides." *Biochemistry*. November 29, 1994. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7947831/>.
- Kim G, Ison G, McKee Ae, Zhang H, Tang S, Gwise T, Sridhara R, et al. 2015. "FDA Approval Summary: Olaparib Monotherapy in Patients with Deleterious Germline BRCA-Mutated Advanced Ovarian Cancer Treated with Three or More Lines of Chemotherapy." *Clinical*

- Cancer Research : An Official Journal of the American Association for Cancer Research. January 10, 2015. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26187614/>.
- Kolinjivadi Am, Sannino V, De Antoni A, Zadorozhny K, Kilkenny M, Técher H, Baldi G, et al. 2017. “Smarc11-Mediated Fork Reversal Triggers Mre11-Dependent Degradation of Nascent DNA in the Absence of Brca2 and Stable Rad51 Nucleofilaments.” *Molecular Cell*. July 9, 2017. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28757209/>.
- Korolev, S. 2017. “Advances in Structural Studies of Recombination Mediator Proteins.” *Biophysical Chemistry*, At the Intersection of DNA Replication and Genome Maintenance: from Mechanisms to Therapy, 225 (June): 27–37. <https://doi.org/10.1016/j.bpc.2016.12.001>.
- Kowalczykowski, Stephen C. 2015a. “An Overview of the Molecular Mechanisms of Recombinational DNA Repair.” *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a016410>.
- Kowalczykowski, Stephen C. 2015b. “An Overview of the Molecular Mechanisms of Recombinational DNA Repair.” *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 7 (11): a016410. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a016410>.
- Krawczyk, P. M., T. Borovski, J. Stap, T. Cijssouw, R. ten Cate, J. P. Medema, R. Kanaar, N. a. P. Franken, and J. A. Aten. 2012. “Chromatin Mobility Is Increased at Sites of DNA Double-Strand Breaks.” *Journal of Cell Science* 125 (Pt 9): 2127–33. <https://doi.org/10.1242/jcs.089847>.
- Krejci L, Van Komen S, Li Y, Villemain J, Reddy Ms, Klein H, Ellenberger T, and Sung P. 2003. “DNA Helicase Srs2 Disrupts the Rad51 Presynaptic Filament.” *Nature*. May 15, 2003. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12748644/>.
- Krejci, Lumir, Veronika Altmannova, Mario Spirek, and Xiaolan Zhao. 2012. “Homologous Recombination and Its Regulation.” *Nucleic Acids Research* 40 (13): 5795–5818. <https://doi.org/10.1093/nar/gks270>.
- Krogh Bo, and Symington Ls. 2004. “Recombination Proteins in Yeast.” *Annual Review of Genetics*. 2004. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15568977/>.
- Kumar A, Purohit S, and Sharma Nk. 2016. “Aberrant DNA Double-Strand Break Repair Threads in Breast Carcinoma: Orchestrating Genomic Insult Survival.” *Journal of Cancer Prevention*. December 2016. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28053956/>.
- Kurumizaka, Hitoshi, Shukuko Ikawa, Maki Nakada, Keiko Eda, Wataru Kagawa, Minoru Takata, Shunichi Takeda, Shigeyuki Yokoyama, and Takehiko Shibata. 2001. “Homologous-Pairing Activity of the Human DNA-Repair Proteins Xrcc3·Rad51C.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98 (10): 5538–43. <https://doi.org/10.1073/pnas.091603098>.
- Kurumizaka, Hitoshi, Shukuko Ikawa, Maki Nakada, Rima Enomoto, Wataru Kagawa, Takashi Kinebuchi, Mitsuyoshi Yamazoe, Shigeyuki Yokoyama, and Takehiko Shibata. 2002. “Homologous Pairing and Ring and Filament Structure Formation Activities of the Human Xrcc2*Rad51D Complex.” *The Journal of Biological Chemistry* 277 (16): 14315–20. <https://doi.org/10.1074/jbc.M105719200>.
- Lambert S, and Carr Am. 2013. “Impediments to Replication Fork Movement: Stabilisation, Reactivation and Genome Instability.” *Chromosoma*. March 2013. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23446515/>.
- Lambert S, and Lopez Bs. 2000. “Characterization of Mammalian RAD51 Double Strand Break Repair Using Non-Lethal Dominant-Negative Forms.” *The EMBO Journal*. June 15, 2000. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10856252/>.
- Lavin Mf, Kozlov S, Gatei M, and Kijas Aw. 2015. “ATM-Dependent Phosphorylation of All

- Three Members of the MRN Complex: From Sensor to Adaptor.” *Biomolecules*. October 23, 2015. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26512707/>.
- Le Cam E, Fack F, Ménissier-de Murcia J, Cognet Ja, Barbin A, Sarantoglou V, Révet B, Delain E, and de Murcia G. 1994. “Conformational Analysis of a 139 Base-Pair DNA Fragment Containing a Single-Stranded Break and Its Interaction with Human Poly(ADP-Ribose) Polymerase.” *Journal of Molecular Biology*. January 21, 1994. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8289308/>.
- Lehman, Jason A., Derek J. Hoelz, and John J. Turchi. 2008. “DNA-DEPENDENT CONFORMATIONAL CHANGES IN THE KU HETERODIMER.” *Biochemistry* 47 (15): 4359–68. <https://doi.org/10.1021/bi702284c>.
- Lemaçon D, Jackson J, Quinet A, Brickner Jr, Li S, Yazinski S, You Z, et al. 2017. “MRE11 and EXO1 Nucleases Degrade Reversed Forks and Elicit MUS81-Dependent Fork Rescue in BRCA2-Deficient Cells.” *Nature Communications*. October 16, 2017. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29038425/>.
- Li X, and Heyer Wd. 2009. “RAD54 Controls Access to the Invading 3’-OH End after RAD51-Mediated DNA Strand Invasion in Homologous Recombination in *Saccharomyces Cerevisiae*.” *Nucleic Acids Research*. February 2009. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19074197/>.
- Lieber, Michael R. 2010. “The Mechanism of Double-Strand DNA Break Repair by the Nonhomologous DNA End Joining Pathway.” *Annual Review of Biochemistry* 79: 181–211. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.052308.093131>.
- Liu, Jie, Tammy Doty, Bryan Gibson, and Wolf-Dietrich Heyer. 2010a. “Human BRCA2 Protein Promotes RAD51 Filament Formation on RPA-Covered Single-Stranded DNA.” *Nature Structural & Molecular Biology* 17 (10): 1260–62. <https://doi.org/10.1038/nsmb.1904>.
- . 2010b. “Human BRCA2 Protein Promotes RAD51 Filament Formation on RPA-Covered Single-Stranded DNA.” *Nature Structural & Molecular Biology* 17 (10): 1260–62. <https://doi.org/10.1038/nsmb.1904>.
- Liu, Jie, Kirk T. Ehmsen, Wolf-Dietrich Heyer, and Scott W. Morrical. 2011. “Presynaptic Filament Dynamics in Homologous Recombination and DNA Repair.” *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* 46 (3): 240–70. <https://doi.org/10.3109/10409238.2011.576007>.
- Liu, Jie, Ludovic Renault, Xavier Veaute, Francis Fabre, Henning Stahlberg, and Wolf-Dietrich Heyer. 2011. “Rad51 Paralogues Rad55-Rad57 Balance the Antirecombinase Srs2 in Rad51 Filament Formation.” *Nature* 479 (7372): 245–48. <https://doi.org/10.1038/nature10522>.
- Liu, Ting, Li Wan, Yue Wu, Junjie Chen, and Jun Huang. 2011. “HSWS1-SWSAP1 Is an Evolutionarily Conserved Complex Required for Efficient Homologous Recombination Repair.” *The Journal of Biological Chemistry* 286 (48): 41758–66. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.271080>.
- Lok, B. H., A. C. Carley, B. Tchang, and S. N. Powell. 2013a. “RAD52 Inactivation Is Synthetically Lethal with Deficiencies in BRCA1 and PALB2 in Addition to BRCA2 through RAD51-Mediated Homologous Recombination.” *Oncogene* 32 (30): 3552–58. <https://doi.org/10.1038/onc.2012.391>.
- . 2013b. “RAD52 Inactivation Is Synthetically Lethal with Deficiencies in BRCA1 and PALB2 in Addition to BRCA2 through RAD51-Mediated Homologous Recombination.” *Oncogene* 32 (30): 3552–58. <https://doi.org/10.1038/onc.2012.391>.
- Lok, Benjamin H., and Simon N. Powell. 2012. “Molecular Pathways: Understanding the Role of Rad52 in Homologous Recombination for Therapeutic Advancement.” *Clinical Cancer*

- Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 18 (23): 6400–6406. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-11-3150>.
- Lord Cj, and Ashworth A. 2013. “Mechanisms of Resistance to Therapies Targeting BRCA-Mutant Cancers.” *Nature Medicine*. November 2013. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24202391/>.
- Lorenz, Alexander, Fekret Osman, Victoria Folkyte, Sevil Sofueva, and Matthew C Whitby. 2009. “Fbh1 Limits Rad51-Dependent Recombination at Blocked Replication Forks.” *Molecular and Cellular Biology* 29 (17): 4742–56. <https://doi.org/10.1128/MCB.00471-09>.
- Loveday, Chey, Clare Turnbull, Emma Ramsay, Deborah Hughes, Elise Ruark, Jessica R. Frankum, Georgina Bowden, et al. 2011. “Germline Mutations in RAD51D Confer Susceptibility to Ovarian Cancer.” *Nature Genetics* 43 (9): 879–82. <https://doi.org/10.1038/ng.893>.
- Ma E, Dupaigne P, Maloisel L, Guerois R, Le Cam E, and Coïc E. 2018. “Rad52-Rad51 Association Is Essential to Protect Rad51 Filaments against Srs2, but Facultative for Filament Formation.” *ELife*. September 7, 2018. <https://doi.org/10.7554/eLife.32744>.
- Magwood Ac, Malysewich Mj, Cealic I, Mundia Mm, Knapp J, and Baker Md. 2013. “Endogenous Levels of Rad51 and Brca2 Are Required for Homologous Recombination and Regulated by Homeostatic Re-Balancing.” *DNA Repair*. December 2013. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24210700/>.
- Malacaria E, Pugliese Gm, Honda M, Marabitti V, Aiello Fa, Spies M, Franchitto A, and Pichierri P. 2019. “Rad52 Prevents Excessive Replication Fork Reversal and Protects from Nascent Strand Degradation.” *Nature Communications*. March 29, 2019. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30926821/>.
- Malacaria, Malacaria, Honda M, Franchitto A, Spies M, and Pichierri P. 2020. “Physiological and Pathological Roles of RAD52 at DNA Replication Forks.” *Cancers*. October 2, 2020. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32050645/>.
- Malu S, Malshetty V, Francis D, and Cortes P. 2012. “Role of Non-Homologous End Joining in V(D)J Recombination.” *Immunologic Research*. December 2012. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22569912/>.
- Mankouri, Hocine W, Wai Kit Chu, and Ian D Hickson. 2012. “A Novel Antirecombinase Gains PARity.” *Molecular Cell* 45 (1): 6–7. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2011.12.015>.
- Mankouri Hw, and Hickson Id. 2007. “The RecQ Helicase-Topoisomerase III-Rmi1 Complex: A DNA Structure-Specific ‘Dissolvasome’?” *Trends in Biochemical Sciences*. December 2007. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17980605/>.
- Mason, Jennifer M., Yuen Ling Chan, Ralph W. Weichselbaum, and Douglas K. Bishop. 2019. “Non-Enzymatic Roles of Human RAD51 at Stalled Replication Forks.” *Nature Communications* 10 (1). <https://doi.org/10.1038/s41467-019-12297-0>.
- Mason, Jennifer M., Kritika Dusad, William Douglass Wright, Jennifer Grubb, Brian Budke, Wolf Dietrich Heyer, Philip P. Connell, Ralph R. Weichselbaum, and Douglas K. Bishop. 2015. “RAD54 Family Translocases Counter Genotoxic Effects of RAD51 in Human Tumor Cells.” *Nucleic Acids Research* 43 (6): 3180–96. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv175>.
- Mason Jm, Chan Yl, Weichselbaum Rw, and Bishop Dk. 2019. “Non-Enzymatic Roles of Human RAD51 at Stalled Replication Forks.” *Nature Communications*. September 27, 2019. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31562309/>.
- Masson, J. Y., A. Z. Stasiak, A. Stasiak, F. E. Benson, and S. C. West. 2001. “Complex Formation by the Human RAD51C and XRCC3 Recombination Repair Proteins.” *Proceedings of the*

- National Academy of Sciences of the United States of America* 98 (15): 8440–46. <https://doi.org/10.1073/pnas.111005698>.
- Masson, J. Y., M. C. Tarsounas, A. Z. Stasiak, A. Stasiak, R. Shah, M. J. McIlwraith, F. E. Benson, and S. C. West. 2001. “Identification and Purification of Two Distinct Complexes Containing the Five RAD51 Paralogs.” *Genes & Development* 15 (24): 3296–3307. <https://doi.org/10.1101/gad.947001>.
- Mateo J, Carreira S, Sandhu S, Miranda S, Mossop H, Perez-Lopez R, Nava Rodrigues D, et al. 2015. “DNA-Repair Defects and Olaparib in Metastatic Prostate Cancer.” *The New England Journal of Medicine*. October 29, 2015. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26510020/>.
- Matos J, Blanco Mg, Maslen S, Skehel Jm, and West Sc. 2011. “Regulatory Control of the Resolution of DNA Recombination Intermediates during Meiosis and Mitosis.” *Cell*. September 30, 2011. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21962513/>.
- Matsuda M, Miyagawa K, Takahashi M, Fukuda T, Kataoka T, Asahara T, Inui H, et al. 1999. “Mutations in the RAD54 Recombination Gene in Primary Cancers.” *Oncogene*. March 6, 1999. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10362365/>.
- Mavaddat, Nasim, Susan Peock, Debra Frost, Steve Ellis, Radka Platte, Elena Fineberg, D. Gareth Evans, et al. 2013. “Cancer Risks for BRCA1 and BRCA2 Mutation Carriers: Results from Prospective Analysis of EMBRACE.” *Journal of the National Cancer Institute* 105 (11): 812–22. <https://doi.org/10.1093/jnci/djt095>.
- Mazina, Olga M., and Alexander V. Mazin. 2004. “Human Rad54 Protein Stimulates DNA Strand Exchange Activity of HRad51 Protein in the Presence of Ca²⁺.” *The Journal of Biological Chemistry* 279 (50): 52042–51. <https://doi.org/10.1074/jbc.M410244200>.
- McIlwraith Mj, and West Sc. 2008. “DNA Repair Synthesis Facilitates RAD52-Mediated Second-End Capture during DSB Repair.” *Molecular Cell*. February 29, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2007.11.037>.
- McIntosh D, and Blow Jj. 2012. “Dormant Origins, the Licensing Checkpoint, and the Response to Replicative Stresses.” *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. January 10, 2012. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22904560/>.
- Meek K, Dang V, and Lees-Miller Sp. 2008. “DNA-PK: The Means to Justify the Ends?” *Advances in Immunology*. 2008. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19117531/>.
- Meindl, Alfons, Heide Hellebrand, Constanze Wiek, Verena Erven, Barbara Wappenschmidt, Dieter Niederacher, Marcel Freund, et al. 2010. “Germline Mutations in Breast and Ovarian Cancer Pedigrees Establish RAD51C as a Human Cancer Susceptibility Gene.” *Nature Genetics* 42 (5): 410–14. <https://doi.org/10.1038/ng.569>.
- Melendy T, and Stillman B. 1993. “An Interaction between Replication Protein A and SV40 T Antigen Appears Essential for Primosome Assembly during SV40 DNA Replication.” *The Journal of Biological Chemistry*. February 15, 1993. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8381428/>.
- Mer G, Bochkarev A, Gupta R, Bochkareva E, Frappier L, Ingles Cj, Edwards Am, and Chazin Wj. 2000. “Structural Basis for the Recognition of DNA Repair Proteins UNG2, XPA, and RAD52 by Replication Factor RPA.” *Cell*. October 27, 2000. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11081631/>.
- Mijic S, Zellweger R, Chappidi N, Berti M, Jacobs K, Mutreja K, Ursich S, et al. 2017. “Replication Fork Reversal Triggers Fork Degradation in BRCA2-Defective Cells.” *Nature Communications*. October 16, 2017. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29038466/>.
- Mimitou Ep, and Symington Ls. 2010. “Ku Prevents Exo1 and Sgs1-Dependent Resection of

- DNA Ends in the Absence of a Functional MRX Complex or Sae2.” *The EMBO Journal*. June 10, 2010. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20729809/>.
- Miné-Hattab, Judith, Vincent Recamier, Ignacio Izeddin, Rodney Rothstein, and Xavier Darzacq. 2017. “Multi-Scale Tracking Reveals Scale-Dependent Chromatin Dynamics after DNA Damage.” *Molecular Biology of the Cell* 28 (23): 3323–32. <https://doi.org/10.1091/mbc.e17-05-0317>.
- Mochizuki, Ayako L., Ami Katanaya, Eri Hayashi, Mihoko Hosokawa, Emiko Moribe, Akira Motegi, Masamichi Ishiai, et al. 2017. “PARI Regulates Stalled Replication Fork Processing To Maintain Genome Stability upon Replication Stress in Mice.” *Molecular and Cellular Biology*. <https://doi.org/10.1128/mcb.00117-17>.
- Moldovan, George-Lucian, and Alan D. D’Andrea. 2009. “How the Fanconi Anemia Pathway Guards the Genome.” *Annual Review of Genetics* 43: 223–49. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-102108-134222>.
- Moldovan, George-Lucian, Donniphath Dejsuphong, Mark I R Petalcorin, Kay Hofmann, Shunichi Takeda, Simon J Boulton, and Alan D D’Andrea. 2012b. “Inhibition of Homologous Recombination by the PCNA-Interacting Protein PARI.” *Molecular Cell* 45 (1): 75–86. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2011.11.010>.
- Moldovan, George-Lucian, Donniphath Dejsuphong, Mark I. R. Petalcorin, Kay Hofmann, Shunichi Takeda, Simon J. Boulton, and Alan D. D’Andrea. 2012a. “Inhibition of Homologous Recombination by the PCNA-Interacting Protein PARI.” *Molecular Cell* 45 (1): 75–86. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2011.11.010>.
- Murfuni, Ivana, Giorgia Basile, Shyamal Subramanyam, Eva Malacaria, Margherita Bignami, Maria Spies, Annapaola Franchitto, and Pietro Pichierri. 2013. “Survival of the Replication Checkpoint Deficient Cells Requires MUS81-RAD52 Function.” *PLOS Genetics* 9 (10): e1003910. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003910>.
- Neelsen KJ, and Lopes M. 2015. “Replication Fork Reversal in Eukaryotes: From Dead End to Dynamic Response.” *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*. April 2015. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25714681/>.
- Nguyen B, Sokoloski J, Galletto R, Elson El, Wold Ms, and Lohman Tm. 2014. “Diffusion of Human Replication Protein A along Single-Stranded DNA.” *Journal of Molecular Biology*. September 23, 2014. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25058683/>.
- Nielsen Fc, van Overeem Hansen T, and Sørensen Cs. 2016. “Hereditary Breast and Ovarian Cancer: New Genes in Confined Pathways.” *Nature Reviews. Cancer*. September 2016. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27515922/>.
- Nimonkar, Amitabh V., Jochen Genschel, Eri Kinoshita, Piotr Polaczek, Judith L. Campbell, Claire Wyman, Paul Modrich, and Stephen C. Kowalczykowski. 2011. “BLM-DNA2-RPA-MRN and EXO1-BLM-RPA-MRN Constitute Two DNA End Resection Machineries for Human DNA Break Repair.” *Genes & Development* 25 (4): 350–62. <https://doi.org/10.1101/gad.2003811>.
- Nimonkar, Amitabh V., A. Zeynep Ozsoy, Jochen Genschel, Paul Modrich, and Stephen C. Kowalczykowski. 2008. “Human Exonuclease 1 and BLM Helicase Interact to Resect DNA and Initiate DNA Repair.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105 (44): 16906–11. <https://doi.org/10.1073/pnas.0809380105>.
- Nimonkar, Amitabh V., R. Alejandro Sica, and Stephen C. Kowalczykowski. 2009. “Rad52 Promotes Second-End DNA Capture in Double-Stranded Break Repair to Form Complement-Stabilized Joint Molecules.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United*

- States of America* 106 (9): 3077–82. <https://doi.org/10.1073/pnas.0813247106>.
- Ochi, Takashi, Andrew N. Blackford, Julia Coates, Satpal Jhujh, Shahid Mehmood, Naoka Tamura, Jon Travers, et al. 2015. “PAXX, a Paralog of XRCC4 and XLF, Interacts with Ku to Promote DNA Double-Strand Break Repair.” *Science (New York, N.Y.)* 347 (6218): 185–88. <https://doi.org/10.1126/science.1261971>.
- Ochs F, Somyajit K, Altmeyer M, Rask Mb, Lukas J, and Lukas C. 2016. “53BP1 Fosters Fidelity of Homology-Directed DNA Repair.” *Nature Structural & Molecular Biology*. August 2016. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27348077/>.
- Osman, Fekret, Julie Dixon, Alexis R. Barr, and Matthew C. Whitby. 2005. “The F-Box DNA Helicase Fbh1 Prevents Rhp51-Dependent Recombination without Mediator Proteins.” *Molecular and Cellular Biology* 25 (18): 8084–96. <https://doi.org/10.1128/mcb.25.18.8084-8096.2005>.
- Park, J.-Y., T. R. Singh, N. Nassar, F. Zhang, M. Freund, H. Hanenberg, A. R. Meetei, and P. R. Andreassen. 2014. “Breast Cancer-Associated Missense Mutants of the PALB2 WD40 Domain, Which Directly Binds RAD51C, RAD51 and BRCA2, Disrupt DNA Repair.” *Oncogene* 33 (40): 4803–12. <https://doi.org/10.1038/onc.2013.421>.
- Park Ms. 1995. “Expression of Human RAD52 Confers Resistance to Ionizing Radiation in Mammalian Cells.” *The Journal of Biological Chemistry*. June 30, 1995. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7797537/>.
- Patel, Dharm S., Sarah M. Misenko, Joonyoung Her, and Samuel F. Bunting. 2017. “BLM Helicase Regulates DNA Repair by Counteracting RAD51 Loading at DNA Double-Strand Break Sites.” *Journal of Cell Biology* 216 (11): 3521–34. <https://doi.org/10.1083/jcb.201703144>.
- Petukhova G, Stratton S, and Sung P. 1998. “Catalysis of Homologous DNA Pairing by Yeast Rad51 and Rad54 Proteins.” *Nature*. July 5, 1998. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9590697/>.
- Pierce Aj, Hu P, Han M, Ellis N, and Jasin M. 2001. “Ku DNA End-Binding Protein Modulates Homologous Repair of Double-Strand Breaks in Mammalian Cells.” *Genes & Development*. December 15, 2001. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11751629/>.
- Popuri, Venkateswarlu, Csanád Z. Bachrati, Laura Muzzolini, Georgina Mosedale, Silvia Costantini, Elisa Giacomini, Ian D. Hickson, and Alessandro Vindigni. 2008. “The Human RecQ Helicases, BLM and RECQ1, Display Distinct DNA Substrate Specificities.” *The Journal of Biological Chemistry* 283 (26): 17766–76. <https://doi.org/10.1074/jbc.M709749200>.
- Prakash, Rohit, Dominik Satory, Eloïse Dray, Almas Papusha, Jürgen Scheller, Wilfried Kramer, Lumir Krejci, et al. 2009. “Yeast Mph1 Helicase Dissociates Rad51-Made D-Loops: Implications for Crossover Control in Mitotic Recombination.” *Genes & Development* 23 (1): 67–79. <https://doi.org/10.1101/gad.1737809>.
- Qi Z, and Greene Ec. 2016. “Visualizing Recombination Intermediates with Single-Stranded DNA Curtains.” *Methods (San Diego, Calif.)*. January 8, 2016. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27038747/>.
- Qi, Zhi, Sy Redding, Ja Yil Lee, Bryan Gibb, YoungHo Kwon, Hengyao Niu, William A. Gaines, Patrick Sung, and Eric C. Greene. 2015. “DNA Sequence Alignment by Microhomology Sampling during Homologous Recombination.” *Cell* 160 (5): 856–69. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.01.029>.
- Rao Bj, Dutreix M, and Radding Cm. 1991. “Stable Three-Stranded DNA Made by RecA Protein.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. April 15, 1991. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2014219/>.

- Rass E, Grabarz A, Plo I, Gautier J, Bertrand P, and Lopez Bs. 2009. "Role of Mre11 in Chromosomal Nonhomologous End Joining in Mammalian Cells." *Nature Structural & Molecular Biology*. August 2009. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19633668/>.
- Rass, E., A. Grabarz, P. Bertrand, and B.-S. Lopez. 2012. "[Double strand break repair, one mechanism can hide another: alternative non-homologous end joining]." *Cancer Radiotherapy: Journal De La Societe Francaise De Radiotherapie Oncologique* 16 (1): 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.canrad.2011.05.004>.
- Raynard S, Bussen W, and Sung P. 2006. "A Double Holliday Junction Dissolvosome Comprising BLM, Topoisomerase IIIalpha, and BLAP75." *The Journal of Biological Chemistry*. May 19, 2006. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16595695/>.
- Renkawitz, Jörg, Claudio A. Lademann, and Stefan Jentsch. 2014. "Mechanisms and Principles of Homology Search during Recombination." *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 15 (6): 369–83. <https://doi.org/10.1038/nrm3805>.
- Riddles, P. W., and I. R. Lehman. 1985. "The Formation of Paranemic and Plectonemic Joints between DNA Molecules by the RecA and Single-Stranded DNA-Binding Proteins of Escherichia Coli." *The Journal of Biological Chemistry* 260 (1): 165–69.
- Rijkers, T., J. Van Den Ouweland, B. Morolli, A. G. Rolink, W. M. Baarends, P. P. Van Sloun, P. H. Lohman, and A. Pastink. 1998. "Targeted Inactivation of Mouse RAD52 Reduces Homologous Recombination but Not Resistance to Ionizing Radiation." *Molecular and Cellular Biology* 18 (11): 6423–29.
- Ristic D, Kanaar R, and Wyman C. 2011. "Visualizing RAD51-Mediated Joint Molecules: Implications for Recombination Mechanism and the Effect of Sequence Heterology." *Nucleic Acids Research*. January 2011. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20817928/>.
- Ropars V, Drevet P, Legrand P, Baconnais S, Amram J, Faure G, Márquez Ja, et al. 2011. "Structural Characterization of Filaments Formed by Human Xrcc4-Cernunnos/XLF Complex Involved in Nonhomologous DNA End-Joining." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. February 8, 2011. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21768349/>.
- Rothenberg E, Grimme Jm, Spies M, and Ha T. 2008. "Human Rad52-Mediated Homology Search and Annealing Occurs by Continuous Interactions between Overlapping Nucleoprotein Complexes." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. December 23, 2008. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19074292/>.
- Rothkamm, Kai, Ines Krüger, Larry H. Thompson, and Markus Löbrich. 2003. "Pathways of DNA Double-Strand Break Repair during the Mammalian Cell Cycle." *Molecular and Cellular Biology* 23 (16): 5706–15. <https://doi.org/10.1128/MCB.23.16.5706-5715.2003>.
- Roy, Upasana, Youngho Kwon, Lea Marie, Lorraine Symington, Patrick Sung, Michael Lisby, and Eric C. Greene. 2021. "The Rad51 Paralog Complex Rad55-Rad57 Acts as a Molecular Chaperone during Homologous Recombination." *Molecular Cell* 81 (5): 1043-1057.e8. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2020.12.019>.
- Sakofsky, Cynthia J., and Anna Malkova. 2017. "Break Induced Replication in Eukaryotes: Mechanisms, Functions, and Consequences." *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* 52 (4): 395–413. <https://doi.org/10.1080/10409238.2017.1314444>.
- Saldivar Jc, Cortez D, and Cimprich Ka. 2017. "The Essential Kinase ATR: Ensuring Faithful Duplication of a Challenging Genome." *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*. October 2017. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28811666/>.
- Sallmyr, Annahita, and Alan E. Tomkinson. 2018. "Repair of DNA Double-Strand Breaks by

- Mammalian Alternative End-Joining Pathways.” *The Journal of Biological Chemistry* 293 (27): 10536–46. <https://doi.org/10.1074/jbc.TM117.000375>.
- San Filippo, Joseph, Patrick Sung, and Hannah Klein. 2008a. “Mechanism of Eukaryotic Homologous Recombination.” *Annual Review of Biochemistry* 77: 229–57. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.77.061306.125255>.
- . 2008b. “Mechanism of Eukaryotic Homologous Recombination.” *Annual Review of Biochemistry* 77: 229–57. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.77.061306.125255>.
- Sartori, Alessandro A., Claudia Lukas, Julia Coates, Martin Mistrik, Shuang Fu, Jiri Bartek, Richard Baer, Jiri Lukas, and Stephen P. Jackson. 2007. “Human CtIP Promotes DNA End Resection.” *Nature* 450 (7169): 509–14. <https://doi.org/10.1038/nature06337>.
- Schlacher, Katharina, Nicole Christ, Nicolas Siaud, Akinori Egashira, Hong Wu, and Maria Jasin. 2011. “Double-Strand Break Repair-Independent Role for BRCA2 in Blocking Stalled Replication Fork Degradation by MRE11.” *Cell* 145 (4): 529–42. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.03.041>.
- Schwendener, Sybille, Steven Raynard, Shreya Paliwal, Anita Cheng, Radhakrishnan Kanagaraj, Igor Shevelev, Jeremy M. Stark, Patrick Sung, and Pavel Jancsak. 2010. “Physical Interaction of RECQ5 Helicase with RAD51 Facilitates Its Anti-Recombinase Activity.” *Journal of Biological Chemistry* 285 (21): 15739–45. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.110478>.
- Shahid, Taha, Joanna Soroka, Eric Kong, Laurent Malivert, Michael J. McIlwraith, Tillman Pape, Stephen C. West, and Xiaodong Zhang. 2014. “Structure and Mechanism of Action of the BRCA2 Breast Cancer Tumor Suppressor.” *Nature Structural & Molecular Biology* 21 (11): 962–68. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2899>.
- Shibata T, DasGupta C, Cunningham Rp, and Radding Cm. 1979. “Purified Escherichia Coli RecA Protein Catalyzes Homologous Pairing of Superhelical DNA and Single-Stranded Fragments.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. April 1979. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/156361/>.
- Shilkin Es, Boldinova Eo, Stolyarenko Ad, Goncharova Ri, Chuprov-Netochin Rn, Smal Mp, and Makarova Av. 2020. “Translesion DNA Synthesis and Reinitiation of DNA Synthesis in Chemotherapy Resistance.” *Biochemistry. Biokhimiia*. August 2020. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33045948/>.
- Shim Ey, Chung Wh, Nicolette Ml, Zhang Y, Davis M, Zhu Z, Paull Tt, Ira G, and Lee Se. 2010. “Saccharomyces Cerevisiae Mre11/Rad50/Xrs2 and Ku Proteins Regulate Association of Exo1 and Dna2 with DNA Breaks.” *The EMBO Journal*. June 10, 2010. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20834227/>.
- Shinohara A, Shinohara M, Ohta T, Matsuda S, and Ogawa T. 1998. “Rad52 Forms Ring Structures and Co-Operates with RPA in Single-Strand DNA Annealing.” *Genes to Cells : Devoted to Molecular & Cellular Mechanisms*. March 1998. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9619627/>.
- Sigurdsson, Stefan, Stephen Van Komen, Wendy Bussen, David Schild, Joanna S. Albala, and Patrick Sung. 2001. “Mediator Function of the Human Rad51B–Rad51C Complex in Rad51/RPA-Catalyzed DNA Strand Exchange.” *Genes & Development* 15 (24): 3308–18. <https://doi.org/10.1101/gad.935501>.
- Simandlova, Jitka, Jennifer Zagelbaum, Miranda J. Payne, Wai Kit Chu, Igor Shevelev, Katsuhiko Hanada, Sujoy Chatterjee, et al. 2013a. “FBH1 Helicase Disrupts RAD51 Filaments in Vitro and Modulates Homologous Recombination in Mammalian Cells.” *The Journal of Biological Chemistry* 288 (47): 34168–80. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.484493>.

- . 2013b. “FBH1 Helicase Disrupts RAD51 Filaments in Vitro and Modulates Homologous Recombination in Mammalian Cells.” *The Journal of Biological Chemistry* 288 (47): 34168–80. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.484493>.
- Singh Tr, Ali Am, Busygina V, Raynard S, Fan Q, Du Ch, Andreassen Pr, Sung P, and Meetei Ar. 2008. “BLAP18/RMI2, a Novel OB-Fold-Containing Protein, Is an Essential Component of the Bloom Helicase-Double Holliday Junction Dissolvasome.” *Genes & Development*. October 15, 2008. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18923083/>.
- Sommers, Joshua A., Nina Rawtani, Rigu Gupta, Dmitry V. Bugreev, Alexander V. Mazin, Sharon B. Cantor, and Robert M. Brosh. 2009. “FANCD1 Uses Its Motor ATPase to Destabilize Protein-DNA Complexes, Unwind Triplexes, and Inhibit RAD51 Strand Exchange.” *Journal of Biological Chemistry* 284 (12): 7505–17. <https://doi.org/10.1074/jbc.M809019200>.
- Somyajit, Kumar, Sneha Saxena, Sharath Babu, Anup Mishra, and Ganesh Nagaraju. 2015. “Mammalian RAD51 Paralogs Protect Nascent DNA at Stalled Forks and Mediate Replication Restart.” *Nucleic Acids Research* 43 (20): 9835–55. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv880>.
- Somyajit, Kumar, Shreelakshmi Subramanya, and Ganesh Nagaraju. 2010. “RAD51C: A Novel Cancer Susceptibility Gene Is Linked to Fanconi Anemia and Breast Cancer.” *Carcinogenesis* 31 (12): 2031–38. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgq210>.
- Sotiriou Sk, Kamileri I, Lugli N, Evangelou K, Da-Ré C, Huber F, Padayachy L, et al. 2016. “Mammalian RAD52 Functions in Break-Induced Replication Repair of Collapsed DNA Replication Forks.” *Molecular Cell*. December 15, 2016. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27984746/>.
- Sotiropoulou, Panagiota A., Andrea E. Karambelas, Maud Debaugnies, Aurelie Candi, Peter Bouwman, Virginie Moers, Tatiana Revenco, et al. 2013. “BRCA1 Deficiency in Skin Epidermis Leads to Selective Loss of Hair Follicle Stem Cells and Their Progeny.” *Genes & Development* 27 (1): 39–51. <https://doi.org/10.1101/gad.206573.112>.
- Soutoglou, Evi, Jonas F. Dorn, Kundan Sengupta, Maria Jasin, Andre Nussenzweig, Thomas Ried, Gaudenz Danuser, and Tom Misteli. 2007. “Positional Stability of Single Double-Strand Breaks in Mammalian Cells.” *Nature Cell Biology* 9 (6): 675–82. <https://doi.org/10.1038/ncb1591>.
- Soutoglou, Evi, and Tom Misteli. 2007. “Mobility and Immobility of Chromatin in Transcription and Genome Stability.” *Current Opinion in Genetics & Development* 17 (5): 435–42. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2007.08.004>.
- Spies J, Waizenegger A, Barton O, Sürder M, Wright Wd, Heyer Wd, and Löbrich M. 2016. “Nek1 Regulates Rad54 to Orchestrate Homologous Recombination and Replication Fork Stability.” *Molecular Cell*. June 16, 2016. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27264870/>.
- Spies, Maria, and Stephen C. Kowalczykowski. 2005. “Homologous Recombination by the RecBCD and RecF Pathways,” January, 389–403. <https://doi.org/10.1128/9781555817640.ch21>.
- Stark Jm, Pierce Aj, Oh J, Pastink A, and Jasin M. 2004. “Genetic Steps of Mammalian Homologous Repair with Distinct Mutagenic Consequences.” *Molecular and Cellular Biology*. November 2004. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15485900/>.
- Stasiak, A., and E. H. Egelman. 1994. “Structure and Function of RecA-DNA Complexes.” *Experientia* 50 (3): 192–203. <https://doi.org/10.1007/BF01924002>.
- Stasiak, Alicja Z., Eric Larquet, Andrzej Stasiak, Shirley Müller, Andreas Engel, Eric Van Dyck, Stephen C. West, and Edward H. Egelman. 2000. “The Human Rad52 Protein Exists as a Heptameric Ring.” *Current Biology* 10 (6): 337–40. <https://doi.org/10.1016/S0960->

9822(00)00385-7.

- Sturzenegger, Andreas, Kamila Burdova, Radhakrishnan Kanagaraj, Maryna Levikova, Cosimo Pinto, Petr Cejka, and Pavel Janscak. 2014. "DNA2 Cooperates with the WRN and BLM RecQ Helicases to Mediate Long-Range DNA End Resection in Human Cells." *The Journal of Biological Chemistry* 289 (39): 27314–26. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.578823>.
- Sugiyama T, New Jh, and Kowalczykowski Sc. 1998. "DNA Annealing by RAD52 Protein Is Stimulated by Specific Interaction with the Complex of Replication Protein A and Single-Stranded DNA." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. May 26, 1998. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9600915/>.
- Sugiyama, T., E. M. Zaitseva, and S. C. Kowalczykowski. 1997. "A Single-Stranded DNA-Binding Protein Is Needed for Efficient Presynaptic Complex Formation by the *Saccharomyces Cerevisiae* Rad51 Protein." *The Journal of Biological Chemistry* 272 (12): 7940–45. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.12.7940>.
- Sullivan, Meghan R., and Kara A. Bernstein. 2018. "RAD-1cal New Insights into RAD51 Regulation." *Genes* 9 (12). <https://doi.org/10.3390/genes9120629>.
- Sung, P. 1994. "Catalysis of ATP-Dependent Homologous DNA Pairing and Strand Exchange by Yeast RAD51 Protein." *Science* 265 (5176): 1241–43. <https://doi.org/10.1126/science.8066464>.
- Sung, Patrick, and Hannah Klein. 2006. "Mechanism of Homologous Recombination: Mediators and Helicases Take on Regulatory Functions." *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 7 (10): 739–50. <https://doi.org/10.1038/nrm2008>.
- Symington, Lorraine S., Rodney Rothstein, and Michael Lisby. 2014. "Mechanisms and Regulation of Mitotic Recombination in *Saccharomyces Cerevisiae*." *Genetics* 198 (3): 795–835. <https://doi.org/10.1534/genetics.114.166140>.
- Symington Ls. 2016. "Mechanism and Regulation of DNA End Resection in Eukaryotes." *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*. June 2016. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27098756/>.
- Szostak, Jack W., Terry L. Orr-Weaver, Rodney J. Rothstein, and Franklin W. Stahl. 1983. "The Double-Strand-Break Repair Model for Recombination." *Cell* 33 (1): 25–35. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(83\)90331-8](https://doi.org/10.1016/0092-8674(83)90331-8).
- Tagliatalata A, Alvarez S, Leuzzi G, Sannino V, Ranjha L, Huang Jw, Madubata C, et al. 2017. "Restoration of Replication Fork Stability in BRCA1- and BRCA2-Deficient Cells by Inactivation of SNF2-Family Fork Remodelers." *Molecular Cell*. October 19, 2017. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29053959/>.
- Talhaoui I, Bernal M, and Mazón G. 2016. "The Nucleolytic Resolution of Recombination Intermediates in Yeast Mitotic Cells." *FEMS Yeast Research*. September 2016. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27509904/>.
- Tavares Em, Wright Wd, Heyer Wd, Le Cam E, and Dupaigne P. 2019. "In Vitro Role of Rad54 in Rad51-SsDNA Filament-Dependent Homology Search and Synaptic Complexes Formation." *Nature Communications*. June 9, 2019. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31492866/>.
- Taylor, Martin R. G., Mário Špírek, Chu Jian Ma, Raffaella Carzaniga, Tohru Takaki, Lucy M. Collinson, Eric C. Greene, Lumir Krejci, and Simon J. Boulton. 2016. "A Polar and Nucleotide-Dependent Mechanism of Action for RAD51 Paralogs in RAD51 Filament Remodeling." *Molecular Cell* 64 (5): 926–39. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.10.020>.
- Taylor, Martin R.G., Mário Špírek, Kathy R. Chaurasiya, Jordan D. Ward, Raffaella Carzaniga,

- Xiong Yu, Edward H. Egelman, et al. 2015. "Rad51 Paralogs Remodel Pre-Synaptic Rad51 Filaments to Stimulate Homologous Recombination." *Cell* 162 (2): 271–86. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.06.015>.
- Teng, Yaqun, Tribhuwan Yadav, Meihan Duan, Jun Tan, Yufei Xiang, Boya Gao, Jianquan Xu, et al. 2018. "ROS-Induced R Loops Trigger a Transcription-Coupled but BRCA1/2-Independent Homologous Recombination Pathway through CSB." *Nature Communications* 9 (1): 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-06586-3>.
- Thacker, J. 1999. "A Surfeit of RAD51-like Genes?" *Trends in Genetics: TIG* 15 (5): 166–68. [https://doi.org/10.1016/s0168-9525\(99\)01733-3](https://doi.org/10.1016/s0168-9525(99)01733-3).
- Thorslund, Tina, Michael J. McIlwraith, Sarah A. Compton, Sergey Lekomtsev, Mark Petronczki, Jack D. Griffith, and Stephen C. West. 2010. "The Breast Cancer Tumor Suppressor BRCA2 Promotes the Specific Targeting of RAD51 to Single-Stranded DNA." *Nature Structural & Molecular Biology* 17 (10): 1263–65. <https://doi.org/10.1038/nsmb.1905>.
- Toledo Li, Altmeyer M, Rask Mb, Lukas C, Larsen Dh, Povlsen Lk, Bekker-Jensen S, Mailand N, Bartek J, and Lukas J. 2013. "ATR Prohibits Replication Catastrophe by Preventing Global Exhaustion of RPA." *Cell*. November 21, 2013. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24267891/>.
- Toma M, Skorski T, and Sliwinski T. 2019. "DNA Double Strand Break Repair - Related Synthetic Lethality." *Current Medicinal Chemistry*. 2019. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29421999/>.
- Tomimatsu, Nozomi, Bipasha Mukherjee, Katherine Deland, Akihiro Kurimasa, Emma Bolderson, Kum Kum Khanna, and Sandeep Burma. 2012. "Exo1 Plays a Major Role in DNA End Resection in Humans and Influences Double-Strand Break Repair and Damage Signaling Decisions." *DNA Repair* 11 (4): 441–48. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2012.01.006>.
- Tomita K, Matsuura A, Caspari T, Carr Am, Akamatsu Y, Iwasaki H, Mizuno K, et al. 2003. "Competition between the Rad50 Complex and the Ku Heterodimer Reveals a Role for Exo1 in Processing Double-Strand Breaks but Not Telomeres." *Molecular and Cellular Biology*. August 2003. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12861005/>.
- Uematsu, Naoya, Eric Weterings, Ken-ichi Yano, Keiko Morotomi-Yano, Burkhard Jakob, Gisela Taucher-Scholz, Pierre-Olivier Mari, Dik C. van Gent, Benjamin P.C. Chen, and David J. Chen. 2007. "Autophosphorylation of DNA-PKCS Regulates Its Dynamics at DNA Double-Strand Breaks." *The Journal of Cell Biology* 177 (2): 219–29. <https://doi.org/10.1083/jcb.200608077>.
- Veaute X, Delmas S, Selva M, Jeusset J, Le Cam E, Matic I, Fabre F, and Petit Ma. 2005. "UvrD Helicase, Unlike Rep Helicase, Dismantles RecA Nucleoprotein Filaments in Escherichia Coli." *The EMBO Journal*. December 1, 2005. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15565170/>.
- Veaute, Xavier, Josette Jeusset, Christine Soustelle, Stephen C. Kowalczykowski, Eric Le Cam, and Francis Fabre. 2003. "The Srs2 Helicase Prevents Recombination by Disrupting Rad51 Nucleoprotein Filaments." *Nature* 423 (6937): 309–12. <https://doi.org/10.1038/nature01585>.
- Venkitaraman, Ashok R. 2001. "Functions of BRCA1 and BRCA2 in the Biological Response to DNA Damage." *Journal of Cell Science* 114 (20): 3591–98.
- Verma, Priyanka, Robert L. Dilley, Tianpeng Zhang, Melina T. Gyparaki, Yiwen Li, and Roger A. Greenberg. 2019. "RAD52 and SLX4 Act Nonredundantly to Ensure Telomere Stability during Alternative Telomere Lengthening." *Genes & Development* 33 (3–4): 221–35. <https://doi.org/10.1101/gad.319723.118>.
- Vlaminck, Iwijn De, Marijn T J van Loenhout, Ludovit Zweifel, Johan den Blanken, Koen Hooning, Susanne Hage, Jacob Kerssemakers, and Cees Dekker. 2012. "Mechanism of

- Homology Recognition in DNA Recombination from Dual-Molecule Experiments.” *Molecular Cell* 46 (5): 616–24. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2012.03.029>.
- Walker, John R., Richard A. Corpina, and Jonathan Goldberg. 2001. “Structure of the Ku Heterodimer Bound to DNA and Its Implications for Double-Strand Break Repair.” *Nature* 412 (6847): 607–14. <https://doi.org/10.1038/35088000>.
- Wang Cx, Jimenez-Sainz J, Jensen Rb, and Mazin Av. 2019. “The Post-Synaptic Function of Brca2.” *Scientific Reports*. March 14, 2019. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30872704/>.
- Wang H, Zeng Zc, Bui Ta, Sonoda E, Takata M, Takeda S, and Iliakis G. 2001. “Efficient Rejoining of Radiation-Induced DNA Double-Strand Breaks in Vertebrate Cells Deficient in Genes of the RAD52 Epistasis Group.” *Oncogene*. April 26, 2001. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1204350>.
- Wei, Leizhen, Satoshi Nakajima, Stefanie Böhm, Kara A. Bernstein, Zhiyuan Shen, Michael Tsang, Arthur S. Levine, and Li Lan. 2015. “DNA Damage during the G0/G1 Phase Triggers RNA-Templated, Cockayne Syndrome B-Dependent Homologous Recombination.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 112 (27): E3495–3504. <https://doi.org/10.1073/pnas.1507105112>.
- West Sc, Blanco Mg, Chan Yw, Matos J, Sarbajna S, and Wyatt Hd. 2015. “Resolution of Recombination Intermediates: Mechanisms and Regulation.” *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*. 2015. <https://doi.org/10.1101/sqb.2015.80.027649>.
- West, Stephen C. 2003. “Molecular Views of Recombination Proteins and Their Control.” *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 4 (6): 435–45. <https://doi.org/10.1038/nrm1127>.
- Wl, de Laat, Appeldoorn E, Sugasawa K, Weterings E, Jaspers Ng, and Hoeijmakers Jh. 1998. “DNA-Binding Polarity of Human Replication Protein A Positions Nucleases in Nucleotide Excision Repair.” *Genes & Development*. August 1998.
- Wold, M. S. 1997. “Replication Protein A: A Heterotrimeric, Single-Stranded DNA-Binding Protein Required for Eukaryotic DNA Metabolism.” *Annual Review of Biochemistry* 66: 61–92. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.66.1.61>.
- Wright Wd, and Heyer Wd. 2014. “Rad54 Functions as a Heteroduplex DNA Pump Modulated by Its DNA Substrates and Rad51 during D Loop Formation.” *Molecular Cell*. June 2, 2014. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24486020/>.
- Wu L, Bachrati Cz, Ou J, Xu C, Yin J, Chang M, Wang W, Li L, Brown Gw, and Hickson Id. 2006. “BLAP75/RMI1 Promotes the BLM-Dependent Dissolution of Homologous Recombination Intermediates.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. March 14, 2006. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16537486/>.
- Wu, Leonard, Sally L. Davies, Nicola C. Levitt, and Ian D. Hickson. 2001. “Potential Role for the BLM Helicase in Recombinational Repair via a Conserved Interaction with RAD51.” *Journal of Biological Chemistry* 276 (22): 19375–81. <https://doi.org/10.1074/jbc.M009471200>.
- Wu, Leonard, and Ian D. Hickson. 2003. “The Bloom’s Syndrome Helicase Suppresses Crossing over during Homologous Recombination.” *Nature* 426 (6968): 870–74. <https://doi.org/10.1038/nature02253>.
- Wu Y, He Y, Moya Ia, Qian X, and Luo Y. 2004. “Crystal Structure of Archaeal Recombinase RADA: A Snapshot of Its Extended Conformation.” *Molecular Cell*. August 13, 2004. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15304222/>.
- Wyatt, Haley D. M., Shriparna Sarbajna, Joao Matos, and Stephen C. West. 2013. “Coordinated Actions of SLX1-SLX4 and MUS81-EME1 for Holliday Junction Resolution in Human Cells.” *Molecular Cell* 52 (2): 234–47. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2013.08.035>.


- Wyatt, Haley D.M., and Stephen C. West. 2014. "Holliday Junction Resolvases." *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 6 (9). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a023192>.
- Xia, Bing, Qing Sheng, Koji Nakanishi, Akihiro Ohashi, Jianmin Wu, Nicole Christ, Xinggong Liu, Maria Jasin, Fergus J. Couch, and David M. Livingston. 2006. "Control of BRCA2 Cellular and Clinical Functions by a Nuclear Partner, PALB2." *Molecular Cell* 22 (6): 719–29. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2006.05.022>.
- Xu J, Zhao L, Xu Y, Zhao W, Sung P, and Wang Hw. 2017. "Cryo-EM Structures of Human RAD51 Recombinase Filaments during Catalysis of DNA-Strand Exchange." *Nature Structural & Molecular Biology*. January 2017. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27941862/>.
- Xu X, Vaithiyalingam S, Glick Gg, Mordes Da, Chazin Wj, and Cortez D. 2008. "The Basic Cleft of RPA70N Binds Multiple Checkpoint Proteins, Including RAD9, to Regulate ATR Signaling." *Molecular and Cellular Biology*. December 2008. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18936170/>.
- Xu, Xin, Lindsay Ball, Wangyang Chen, Xuelei Tian, Amanda Lambrecht, Michelle Hanna, and Wei Xiao. 2013. "The Yeast Shu Complex Utilizes Homologous Recombination Machinery for Error-Free Lesion Bypass via Physical Interaction with a Rad51 Parologue." *PloS One* 8 (12): e81371. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0081371>.
- Yang H, Jeffrey Pd, Miller J, Kinnucan E, Sun Y, Thoma Nh, Zheng N, Chen Pl, Lee Wh, and Pavletich Np. 2002. "BRCA2 Function in DNA Binding and Recombination from a BRCA2-DSS1-SsDNA Structure." *Science (New York, N.Y.)*. September 13, 2002. <https://doi.org/10.1126/science.297.5588.1837>.
- Yasuhara, Takaaki, Reona Kato, Yoshihiko Hagiwara, Bunsyo Shiotani, Motohiro Yamauchi, Shinichiro Nakada, Atsushi Shibata, and Kiyoshi Miyagawa. 2018a. "Human Rad52 Promotes XPG-Mediated R-Loop Processing to Initiate Transcription-Associated Homologous Recombination Repair." *Cell* 175 (2): 558-570.e11. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.08.056>.
- . 2018b. "Human Rad52 Promotes XPG-Mediated R-Loop Processing to Initiate Transcription-Associated Homologous Recombination Repair." *Cell* 175 (2): 558-570.e11. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.08.056>.
- Yeeles Jtp, Janska A, Early A, and Diffley Jfx. 2017. "How the Eukaryotic Replisome Achieves Rapid and Efficient DNA Replication." *Molecular Cell*. May 1, 2017. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27989442/>.
- Yun Mh, and Hiom K. 2009. "CtIP-BRCA1 Modulates the Choice of DNA Double-Strand-Break Repair Pathway throughout the Cell Cycle." *Nature*. May 21, 2009. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19357644/>.
- Zakharyevich K, Tang S, Ma Y, and Hunter N. 2012. "Delineation of Joint Molecule Resolution Pathways in Meiosis Identifies a Crossover-Specific Resolvase." *Cell*. April 13, 2012. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22500800/>.
- Zellweger R, Dalcher D, Mutreja K, Berti M, Schmid Ja, Herrador R, Vindigni A, and Lopes M. 2015. "Rad51-Mediated Replication Fork Reversal Is a Global Response to Genotoxic Treatments in Human Cells." *The Journal of Cell Biology*. February 3, 2015. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25733714/>.
- Zeman Mk, and Cimprich Ka. 2014. "Causes and Consequences of Replication Stress." *Nature Cell Biology*. January 2014. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24366029/>.
- Zierhut C, and Diffley Jf. 2008. "Break Dosage, Cell Cycle Stage and DNA Replication Influence DNA Double Strand Break Response." *The EMBO Journal*. September 7, 2008. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18511906/>.

- Zimmermann, Michal, Francisca Lotterberger, Sara B. Buonomo, Agnel Sfeir, and Titia de Lange. 2013. "53BP1 Regulates DSB Repair Using Rif1 to Control 5' End Resection." *Science (New York, N.Y.)* 339 (6120): 700–704. <https://doi.org/10.1126/science.1231573>.
- Zou L, and Elledge Sj. 2003. "Sensing DNA Damage through ATRIP Recognition of RPA-SsDNA Complexes." *Science (New York, N.Y.)*. June 6, 2003. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12791985/>.

Annexe I : Article de Méthode

METHODS MANUSCRIPT

Method combining BAC film and positive staining for the characterization of DNA intermediates by dark-field electron microscopy

Yann Benureau^{1,2,†}, Eliana Moreira Tavares^{1,†}, Ali-Akbar Muhammad¹, Sonia Baconnais¹, Eric Le Cam^{1,*,‡}, and Pauline Dupaigne ^{1,‡}

¹DSB Repair, Replication Stress and Genome Integrity, UMR9019-CNRS ‘Genome Integrity and Cancer’, CNRS, Université Paris-Saclay, Gustave Roussy, F-94805, Villejuif Cedex, France and ²UMR9019-CNRS, Genome Integrity and Cancer, Equipe labellisée Ligue contre le Cancer, Université Paris-Saclay, Gustave Roussy, F-94805, Villejuif Cedex, France

*Correspondence address. DSB Repair, Replication Stress and Genome Integrity, UMR9019-CNRS ‘Genome Integrity and Cancer’, CNRS, Université Paris-Saclay, Gustave Roussy, F-94805, Villejuif Cedex, France. Tel: 00 33 1 42 11 48 76 and 00 33 1 42 11 48 74; E-mail: Eric.LECAM@gustaveroussy.fr

[†]These authors contributed equally to this work.

[‡]These two authors contributed as equal corresponding authors.

Abstract

DNA intermediate structures are formed in all major pathways of DNA metabolism. Transmission electron microscopy (TEM) is a tool of choice to study their choreography and has led to major advances in the understanding of these mechanisms, particularly those of homologous recombination (HR) and replication. In this article, we describe specific TEM procedures dedicated to the structural characterization of DNA intermediates formed during these processes. These particular DNA species contain single-stranded DNA regions and/or branched structures, which require controlling both the DNA molecules spreading and their staining for subsequent visualization using dark-field imaging mode. Combining BAC (benzyl dimethyl alkyl ammonium chloride) film hyperphase with positive staining and dark-field TEM allows characterizing synthetic DNA substrates, joint molecules formed during not only *in vitro* assays mimicking HR, but also *in vivo* DNA intermediates.

Keywords: transmission electron microscopy; DNA; replication fork; homologous recombination; replication intermediate; recombination intermediate

Introduction

DNA metabolism pathways including transcription, replication, repair, and recombination involve DNA transactions with transient conformational states and intermediates structures formation. The fine regulation of these DNA intermediates is

not only critical for accurate genome duplication, expression, but also strongly participates in the genome maintenance and plasticity. DNA is constantly threatened by exogenous or endogenous challenges producing damages that can alter its structure and consequently the progression of the replication

Received: 4 February 2020; Revised: 19 June 2020; Accepted: 22 June 2020

© The Author(s) 2020. Published by Oxford University Press.

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted reuse, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

fork, leading to potential genomic instability. Cells have, therefore, evolved several DNA damage response (DDR) pathways to limit the accumulation of damages, insoluble DNA intermediates, and DNA breakages [1]. Precisely, replication stress is accompanied by alterations in the replication fork structure and the subsequent formation of double- and single-stranded DNA (ds and ssDNA) breaks leading to the activation of the intra-S-phase checkpoint and to the potential recruitment of DNA repair and/or tolerance machinery [2, 3]. In particular, homologous recombination (HR) using the undamaged homologous sister chromatid to repair the damaged DNA is a pivotal pathway involved in these processes [4]. The structural characterization of the DNA intermediates choreography is crucial to better understand these major DDR pathways.

Conventional transmission electron microscopy (TEM) is a pertinent and powerful tool for the observation of DNA molecules allowing the unique opportunity to characterize DNA conformation and topology, nucleoprotein complexes, but also the architecture of various DNA intermediates. In TEM studies, the spreading of DNA molecules onto the carbon film surface of copper grids is a critical step. It depends on the physicochemical properties of the DNA, mainly its charge and its flexibility characterized by the persistence length (50 nm for dsDNA and few nm for ssDNA in medium ionic strength). Consequently, the adsorption behavior of ssDNA and dsDNA molecules is radically different. Different spreading methods have been specifically adapted to either dsDNA or ssDNA observations. With regard to dsDNA, two main approaches have been distinguished, the “hypophase/hyperphase method” and the “adsorption method”. The first one is based on the formation of a cytochrome c protein film at the water–air interface in which DNA molecules are stretched. In fact, the film containing DNA molecules deposited on the surface of the water hypophase constitutes a hyperphase [5–9]. The second one, the “adsorption method” is based on the functionalization of the carbon surface by the deposition of sticky positively charged substances (Mg^{2+} , Ethidium Bromide, PolyHistidine, PolyLysine, Spermidine or Pentylamine/Amylamine). The dsDNA, which is negatively charged, is then absorbed onto the surface [10–15].

The case of ssDNA spreading is more challenging as it naturally collapses onto the carbon surface due to its high flexibility and its folding into small secondary structures (hairpins). To analyze replication or recombination intermediates containing ssDNA regions, an alternative spreading method has been developed using a detergent film that stretches dsDNA, ssDNA, mixed ss–dsDNA molecules, and more complex DNA structures. The so-called BAC (benzyl dimethyl alkyl ammonium chloride) produces a floating film (hyperphase) that spreads out at the interface between water (hypophase) and air in which DNA molecules are embedded [16–19]. BAC remains the reference method commonly used to characterize replication intermediates. DNA samples are stained in presence of very low concentration of uranyl acetate (UrAc) followed by shadowing, which uses a vacuum-deposited heavy metal thin film (typically platinum/carbon) by rotary deposition. The sample is then observed in bright-field imaging mode.

For >30 years, our laboratory has developed TEM methods dedicated to the study of DNA conformation, both intrinsic and induced by proteins, with a specific expertise in the characterization of nucleoprotein machinery involved in DNA repair pathways, including HR [20–24]. For this, we have optimized the TEM methodology initially developed by Jacques Dubochet [17] consisting on the preactivation of a very thin carbon film with glow discharge in presence of pentylamine/amylamine (primary

amine), followed by DNA spreading, and its staining with UrAc (from 0.02% to 2%). This approach gives rise to the positive staining of the sample, as DNA is decorated with fine clusters of UrAc, without staining of the carbon support. Interestingly, our previous atomic force microscopy thickness measurements (Z height) of dsDNA spread on carbon grid revealed a mean value of 3 nm. The height of the ssDNA could not be determined with precision, but is anyway <2 nm. In addition to staining the DNA, this method promotes the recruitment and the deployment of the DNA backbone onto the surface maintaining its 3D/2D properties [25, 26]. The primary amine stably anchored to the carbon film recruits the DNA molecules at different points, thus limiting their 2D diffusion. UrAc allows both their deployment and staining. As initially demonstrated by Dubochet et al. [10], it then allows DNA observation in dark-field mode, which is based on Z-contrast imaging that gives a direct image of atomic structural composition [27] (UrAc clusters in our method). We use annular or crystallographic dark-field mode and an energy filter to select zero-loss energy electron providing fine contrast [26, 28, 29]. Fine studies on DNA local flexibility, curvature, and topology have contributed to prove the relevance of this positive staining approach [26, 29–32], which is also suitable to the study of DNA–protein complexes involved in DNA metabolism pathways allowing to characterize the behavior of proteins on DNA, from their binding modes to recognition events [20–23].

In order to contribute to the studies of replication intermediates, we combined our direct adsorption approach with the BAC film method to optimize the recruitment of DNA onto the carbon surface, its spreading, and its positive staining under stretching conditions. We named this new approach BAC film positive staining (BPS). The present work describes the technical optimizations we have developed using a rapid and reproducible sample preparation procedure in order to characterize dsDNA as well as ssDNA, mixed ss–dsDNA and branched DNA from synthetic DNA substrates to *in vivo* DNA structures formed along DNA transactions. We also detail the methods to generate DNA substrates for reconstitution *in vitro* assays in the presence of purified proteins. We then provide procedures to characterize *in vivo* DNA intermediates from human cells, with a focus on the critical steps of the DNA isolation. Finally, in a practical case study, we present original observations of *in vivo* replication, recombination, and resection DNA intermediates highlighting the DDR pathways identified in cells undergoing two different genotoxic stresses.

Material and methods

Generation of DNA substrates

Synthesis of 5' junction (with a 3' ssDNA overhang) and gap substrate

Two DNA fragments of 1440 and 609 bp were amplified from pBR322 plasmid by PCR using Taq polymerase (NEB) and the pairs of primers Cy5-2574⁺ and biotin-4014⁻, biotin-2574⁺ and 3185⁻, respectively. The biotinylated PCR products were purified on a MiniQ 4.6/50 ion exchange column (GE Healthcare Life Sciences) and loaded onto a HiTrap Streptavidin HP column (GE Healthcare Life Sciences). Purification of the nonbiotinylated strand was achieved by elution with 80 mM NaOH, neutralized by addition of HCl 1M and annealed at equimolar concentrations in molecules, in presence of 1.5 mM $MgCl_2$ then purified on anion exchange MiniQ column.

For the ds–ss–ds, in this article, mentioned as gap substrate, three DNA fragments of 400, 600, and 1440 bp were amplified from pBR322 plasmid by PCR using the pairs of primers biotin-2574⁺ and Cy5-2974⁻ (400 bp), biotin-3413⁺ and Cy5-4014⁻ (600 bp), and 2574⁺ and biotin-4014⁻ (1440 bp). The three non-biotinylated ssDNA fragments were purified by elution on HiTrap Streptavidin HP column and annealed at equimolar concentrations in molecules as described then purified on the anion exchange MiniQ column mentioned above.

In vitro Holliday junction synthesis

A 660 nt-long sequence was amplified from PBR322 plasmid using one biotinylated primer and one a nontagged primer to generate two different amplicons named as X1 and X2 (Supplementary Fig. 1). These primers were designed to add two different additional sequences of 19 nt located in 3' (named as mod1 and mod2) necessary for the further final structure assemblage. In parallel, two identical biotinylated fragments were generated using primers designed to localize the mod1 and mod2 sequences in the 5' of the amplicons, named X3 and X4, respectively. Then the four amplicons were loaded on a HiTrap Streptavidin HP column in order to purify the nonbiotinylated strands following manufacturer's instructions. After a transient denaturation (95°C for 5 min), the X1 fragment was slowly annealed with its antiparallel counterpart X2 (and X3 with X4) at equimolar concentrations, overnight at RT in presence of 1.5 mM MgCl₂. This generated two pseudoforks with mod1 and mod2 ssDNA overhangs located either in 5' or 3'. Both were assembled following heating at 50°C for 30 min then annealing at RT for 2 h to generate selective hybridization between both mod1 and mod2 extremities. Local strand spontaneous slippages generated the suited HJ structures with various arms lengths.

Homologous recombination in vitro assays

Protein purification for in vitro assays

Saccharomyces cerevisiae replication protein A (RPA) heterotrimer and Rad51 proteins were purified as previously described [33–36]. Yeast Rad54 was purified as previously described [24].

Displacement loop assay

The reaction contained 10 mM Tris-HCl pH7.5, 50 mM NaCl, 3 mM MgCl₂, 1.5 mM ATP, 1 mM DTT, 10 mM phosphocreatine, 35 U/ml phosphocreatine kinase, 25 nM molecules (36 μM nt) of 5' junction DNA with overhang labeled with Cy5. Rad51 at a final concentration of 12 μM (1 protein per 3 nt) was introduced into the reaction and incubated 10 min followed by RPA addition at a final concentration of 1.44 μM (1 protein per 25 nt) also during 10 min. Rad54 and homologous pUC19 dsDNA plasmid (purchased from NEB and purified on MiniQ ion-exchange chromatography column) were added together in a final concentration of 175 nM and 25 nM in molecules of dsDNA (seven proteins per dsDNA molecule) in a final volume of 14 μl during 20 min. This assay was carried out at 30°C. In these reactions lacking Rad54 (control), storage buffer was added in order to rule out nonspecific effects of buffer components and to maintain the ionic strength in all samples. For agarose gel analysis, 7 μl of the 14 μl reaction was taken and stopped using 0.5 mg ml⁻¹ Proteinase K, 1% sodium dodecyl sulfate (SDS), 12.5 mM EDTA and incubated overnight at room temperature. A 1% TAE agarose gel was run at 70 V, for 40 min.

Strand exchange assay

13 μM Rad51 were incubated with 40 μM of circular viral ssDNA (+) PhiX174 (previously purified in ion-exchange MiniQ column) for 5 min, in 10 mM Tris-HCl pH 7.5, 100 mM NaCl, 3 mM MgCl₂, 2 mM ATP, 1 mM DTT, and 2 mM Spermidine, and 1.3 μM RPA was then added into reaction for 15 min. Twenty micrometers of linear dsDNA PhiX174 replicative form I were added into the reaction for 50 min (unless stated), to a 10 μl final volume. The dsDNA was linearized by digestion with the restriction enzyme XhoI or PstI (NEB) followed by phenol–chloroform extraction. The reaction was performed at 37°C. Reactions were cross-linked with trioxsalen (final concentration 10 μg/ml) (Sigma) during 4 min under UVA (cross-link density of 1 per 200–300 nt) and stopped using 0.5 mg/ml proteinase K, 1% SDS, 12.5 mM EDTA, and incubated overnight at room temperature. Samples were separated on a 0.8% D5 agarose (Condalab, Dutscher) gel electrophoresis in TAE 1×, run at 40 V for 2.5 h and finally stained with SYBR gold (Invitrogen). For TEM analysis, four independent in vitro strand exchange reactions were pooled, and then DNA was purified using phenol–chloroform and ethanol precipitation.

Isolation of replication intermediates from human cells

Cells were seeded at 3.10⁶ in 100 mm dishes and potentially subjected to UVC irradiation (15 or 25 J/m² followed by 1 h at 37°C) or camptothecin (CPT) (200 nM, 1 h at 37°C) treatments the day after. Then asynchronous and nonconfluent cells were incubated with 10 ml PBS supplemented with 10 μg/ml trioxsalen (Sigma) for 5 min on ice covered from light. Following a 45 kJ UVA irradiation, cells were then subjected to another round of trioxsalen/UVA irradiation. After a PBS wash, cells were scrapped, washed, and centrifuged, then nuclei were isolated in order to avoid cytosolic material contaminations following manufacturer's instruction (Nuclei EZ prep, Sigma). The genomic DNA (gDNA) was extracted from nuclei using DNAzol (1 ml/dish) (Invitrogen) that removed most of the chromatin-bound proteins and residual RNA. Then gDNA was precipitated by adding 0.5 ml 100% ethanol, washed in 70% ethanol and finally resuspended in water, avoiding the use of vortex, micropipette, or centrifugation. The material was subjected to proteinase K (1 mg/ml) hydrolysis overnight at 55°C in the presence of 10 mM Tris-HCl, 20 mM NaCl, 1 mM EDTA, and 1% SDS. After a smooth phenol/chloroform extraction, the gDNA was subjected to a second round of proteinase K hydrolysis and phenol/chloroform extraction. Following the precipitation with 0.3 M sodium acetate and 2.5 volumes of 100% ethanol, the gDNA was washed in 70% ethanol and resuspended in water. The gDNA was quantified by NanoDrop (Thermo). Then it was fragmented by enzymatic restriction using 10 U/μg DNA BamHI or 5 U/μg EcoRI for 2 h or overnight in presence of excess amounts of RNase A to hydrolyze all forms of remaining nuclear RNA in low-salt conditions. After supplementation with 1 mM EDTA and 300 mM NaCl, the gDNA was loaded onto poly-prep chromatography column (Bio-Rad) stacked with benzoylated naphthoylated DEAE–Cellulose (Sigma) as previously described [37]. The first four ssDNA-containing fractions were pooled, precipitated, quality controlled by agarose gel analysis, and finally spread for TEM analysis.

Evaluation of ssDNA accumulation through the monitoring of RPA70 recruitment

Human fibroblasts (MRC5-V1) cells were cultured at 37°C in MEM (Gibco) supplemented with 10% fetal calf serum, 100 U/ml penicillin and 100 µg/ml streptomycin under 5% CO₂. Cells were seeded at 4.10⁵ cells per well in six-well plates, subjected to indicated treatments the day after, and harvested by trypsinization at indicated time points. Cells were washed in PBS and centrifuged, then pellets were resuspended in 1 ml/well of CytoSkeleton 100 buffer (10 mM PIPES pH 6.8, 100 mM NaCl, 300 mM sucrose, 3 mM MgCl₂, 1 mM ethylene glycol tetraacetic acid, 0.2% Triton ×100, anti-proteases) and incubated 15 min on ice. Samples were then centrifuged at 7000 rpm for 5 min at 4°C. Pellets were then resuspended in 100 µl of benzonase buffer (10 mM Tris pH 7.5, 20 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, 0.4% SDS, anti-proteases, 0.15 U/µl benzonase) and incubated 30 min at 37°C. Protein quantity was evaluated using NanoDrop. After denaturation in Laemmli buffer at 90°C for 10 min, the proteins were run on 10% sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). Membranes were finally blotted with antibodies directed against RPA70 (Calbiochem) or H3 (Abcam) proteins.

TEM for DNA intermediates imaging

Preparation of carbon-coated grids

TEM copper grids 600 mesh (EMS) were covered with a very thin carbon film (2–4 nm), which functions as a support surface for sample deposition and spreading. The contrast increases significantly with the fineness of the carbon film. To prepare carbon films of a few nanometers thick, a carbon thread (Bal-Tec) was evaporated onto a freshly cleaved mica sheet (EMS) in the vacuum evaporator (MED10/MED20 Balzers/Bal-Tec) at distance of about 100 mm from the carbon source at 10⁻⁴ Pa. Then the carbon-coated mica was slowly plunged in a MilliQ water pool to separate the carbon from the mica, and the floating carbon film was deposited onto the grids, previously set at the bottom of the dish by a slow water flow out. Finally, the carbon-coated grids were dried.

Functionalization of the carbon-coated grids

The functionalization of a very thin (2–4 nm) carbon film coating grids was carried out by pentylamine or amyamine (Sigma Aldrich) ionization using a glow discharge, providing stable NH⁺ charges deposition onto the carbon surface (Fig. 1) [28, 29].

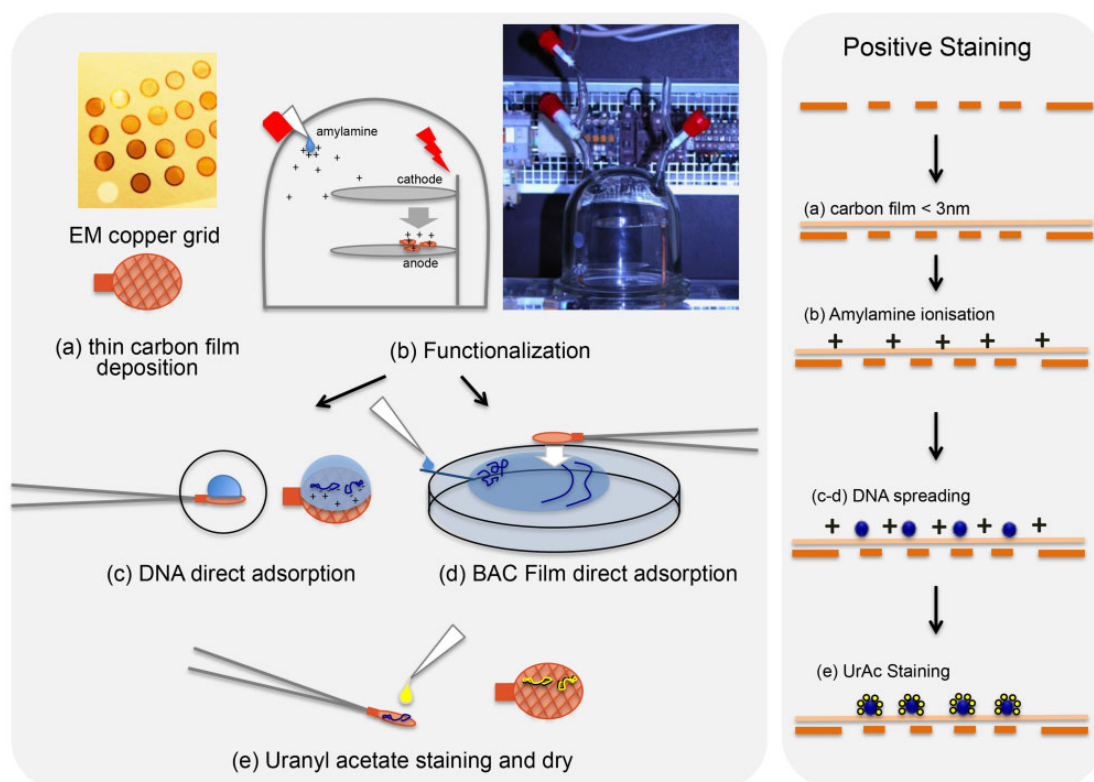


Figure 1: Two experimental procedures for nucleic acids sample preparation and imaging. (a) Deposition of a thin carbon film on the TEM copper grid. Direct adsorption method by (b) functionalization by evaporation of the positively charged amyamine agent under high voltage in the device held under vacuum, then (c) DNA direct adsorption after 5 µl sample drop (concentration 0.5 µg/ml) deposition, and finally (e) positive staining using UrAc, rinsing, and dry. BPS method by (d) deposition and spreading of 2.5 µl of DNA sample (concentration 25 µg/ml) in a BAC hypophase/hyperphase film formed at the interface between water and air, then adsorption on an amyamine pretreated grid, and finally (e) positive staining using UrAc and dry.

Grids were deposited on a glass slide coated with parafilm and placed on the lower steel plate of our lab-made device (Fig. 1). It consists of a glass bell in which the vacuum is generated by a vacuum pump and an inlet allows the controlled introduction of pentylamine/amyamine, which is vaporized under high voltage. At 2.6 Pa vacuum (0.026 mbar), a drop of amyamine is introduced up to about 26.7 Pa (0.27 mbar), and then ionized over 30 s by switching on the tension (900 V) to form a plasma. Grids prepared in this manner keep functionalized properties for about 1 day.

Direct adsorption spreading method for canonical positive staining

Five microliters of DNA or DNA-protein complexes as indicated (at 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ DNA) were deposited on the carbon-coated grid for 1 min and then rinsed with two drops of a 2% (w/vol) solution of aqueous UrAc which allowed a fine staining of DNA molecules [27, 28]. After a careful drying with an ashless filter paper (Macherey-Nagel, VWR), the grids were directly subjected to TEM analysis.

BAC film hyperphase associated with positive staining

Fresh cleaved mica sheet (rectangles of 1 cm per 2 cm) was partially immersed (45° angle) in a petri dish with 14 cm diameter containing MilliQ water. Two separated drops were deposited in a 1.5 ml Eppendorf tube: a drop containing 2 μl of formamide (Sigma Aldrich), 0.8 μl of 10% BAC (benzyl dimethyl alkyl ammonium chloride) (Sigma Aldrich) and 0.4 μl of glyoxal (Sigma Aldrich), and another drop containing 2.5 μl of ultrapure DNA sample at 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Just before initiating the spreading, some graphite powder was loaded on the water surface near the mica sheet in order to visually delimit the hyperphase film. After the two drops were quickly spun down forming the hyperphase, the mix was loaded on the mica, slipped along the ramp and therefore onto the water surface, creating the spreading film. The DNA was picked up on functionalized carbon-coated grids by briefly touching the film surface. Grids were washed in a large volume of purified MilliQ water and then 100% ethanol and dried with filter paper. Finally, grids were stained with three drops of 2% UrAc and dried.

Tem imaging

Samples were visualized in annular or crystallographic dark-field mode using Zeiss TEM902 or Zeiss TEM912 microscopes, respectively. TEM902 was equipped with a magnetic prism electron filter and TEM912 with an Omega energy filter allowing energy-filtered imaging. Such imaging techniques use the energy loss spectrum properties to increase the contrast. In dark-field mode, only electrons scattered at wide angles are collected while the central beam is eliminated. This mode was obtained using either an annular condenser aperture combined with an objective aperture of 40 μm (for Zeiss 902) or a tilted beam combined with an objective aperture of 60 μm (for Zeiss 912). Finally, only zero-loss electrons were selected (zero-loss filtering), which prevents inelastically scattered electrons from contributing to image formation and improves image contrast and resolution. Electron micrographs were acquired using a Veleta or Tengra high-resolution 2k \times 2k CCD camera associated with a dedicated iTEM software (Olympus, Soft Imaging Solutions) at $\times 30\,000$ to $\times 140\,000$ magnification.

Results and discussion

DNA visualization using direct adsorption compared to BPS

Our direct adsorption method associated with positive staining allows DNA molecules to deploy rather than being projected on the surface of the carbon film, thus maintaining their conformational properties. In these conditions, the DNA adsorption properties are independent of the presence of counterions, both monovalent (Na^+/K^+) or divalent (Mg^{2+} or Mn^{2+}) in buffer solutions. Indeed, DNA conformation and/or topology can be analyzed in various conditions of ionic strength, pH, and in the presence of ligands. Digitizing and contour tracking allows calculating local curvature and flexibility along large linear DNA molecules or on small ones containing specific sites such as a curved region, single-strand break, or abasic site using the appropriate algorithms [20, 26, 30, 31, 38, 39]. This approach can be extended to closed circular plasmids, minicircles, or for the characterization of nucleoprotein machineries related to DNA repair pathways, including HR [21–24, 29, 32, 39–43]. The quality of the positive staining is directly related to the quality of the amyamine-mediated functionalization of the thin carbon film using our lab-made device (see Material and methods), giving a slight decoration of the DNA by UrAc with almost no UrAc background contamination. Due to the fineness of the staining, the sample must be visualized in dark-field imaging mode, which allows a very fine contrast, each cluster of UrAc deposited along the DNA being directly detected [27]. This procedure avoids an additional step of sample shadowing which usually increases the contrast but leads to the artificial thickening of DNA and loss of resolution [28].

Linear 1440 bp dsDNA fragment and closed negatively supercoiled pUC19 plasmid were first visualized in dark-field imaging mode after their direct adsorption and positive staining (Fig. 2a–c). Interestingly, we were able to demonstrate the reversible transition from the toroidal to plectonemic form of negatively supercoiled DNA without any change in the topological constraints (no ssDNA break) (Fig. 2b and c, respectively). Toroidal form of supercoiled DNA was obtained at very low ionic strength (i.e., in absence of counterions), the mutual repulsion of the negative charges of the phosphate backbone conferring rigidity to DNA. Addition of monovalent salt restored the canonical plectonemic form of the plasmid without altering its adsorption properties. PhiX174 ssDNA virion diluted in water and spread by direct adsorption and positive staining, appeared to be partially deployed (Fig. 2f), while the addition of counterions caused its collapse on the surface due to its high flexibility and its folding with the formation of secondary structures (Fig. 2g). Covering ssDNA with specific ssDNA-binding (SSB) proteins was another way to identify and characterize ssDNA (Fig. 2h).

To develop the analysis of ssDNA containing intermediates, we combined this direct adsorption with the usual BAC film hyperphase (Fig. 1). It allowed us to take advantage of the BAC film for stretching the intermediates and of the positive staining for their recruitment, their staining and their observation in dark-field imaging mode. Beforehand, we concluded that amyamine is the best positively charged agent to provide DNA recruitment, compared to Mg^{2+} , Ethidium Bromide, PolyHistidine, PolyLysine, or Spermidine pretreatment, giving the best quality of positive staining (data not shown). This combination allowed the deployment and stretching of dsDNA (Fig. 2d and e), linear 1440 bp dsDNA fragment and negatively supercoiled pUC19

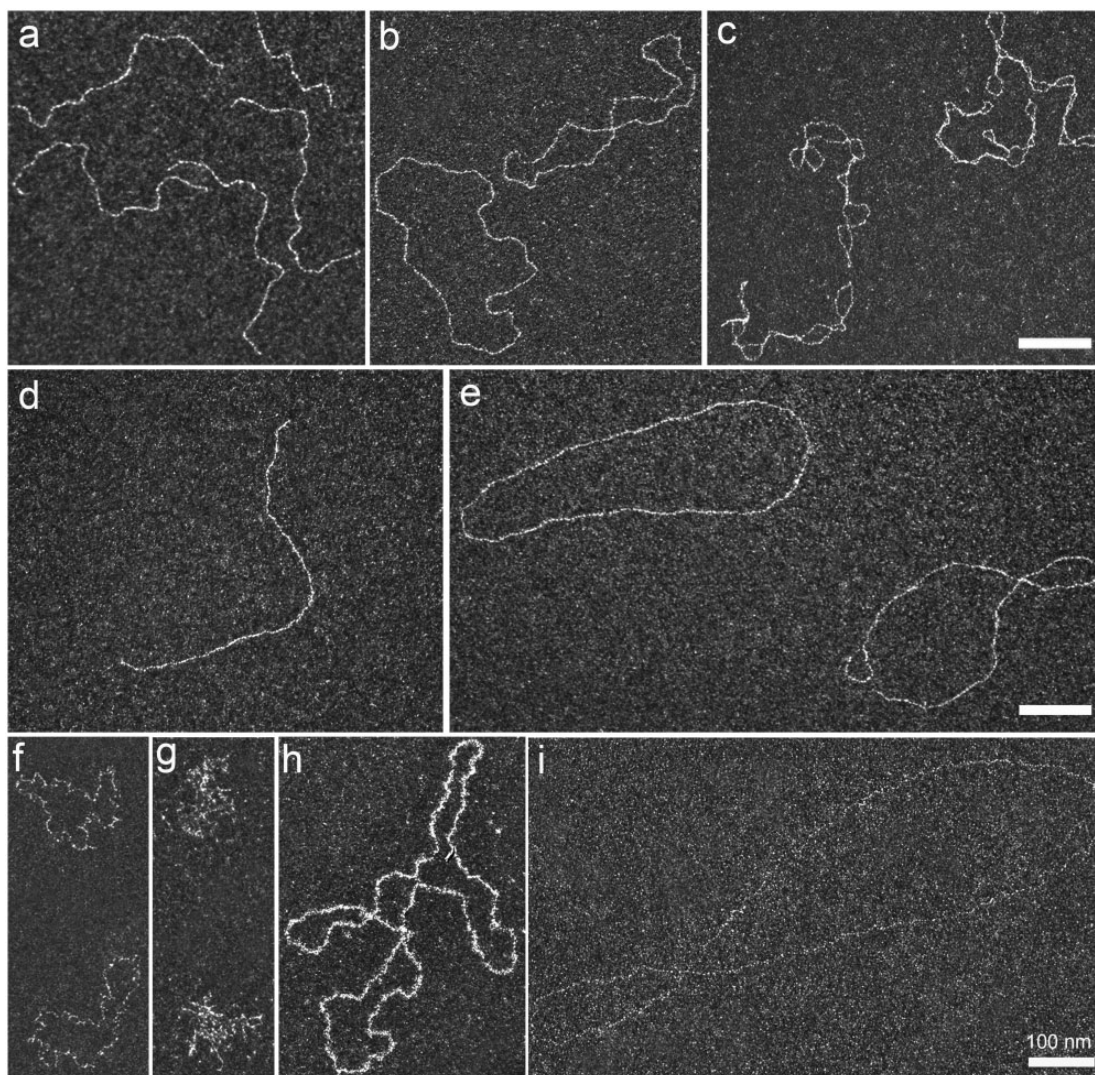


Figure 2: Ds and ssDNA visualization in dark-field imaging mode using both direct adsorption and BPS methods. (a) Positive staining of a linear dsDNA fragment of 1440 base pairs (bp) visualized in dark-field mode. (b) Toroidal form of closed negatively supercoiled pUC19 dsDNA plasmid obtained after dilution in a 10 mM Tris-HCl pH 7.5 buffer without salt. (c) Usual plectonemic form of closed negatively supercoiled pUC19 dsDNA plasmid diluted in 10 mM Tris-HCl, pH 7.5 buffer in presence of 50 mM NaCl. (d) Linear 1440bp dsDNA fragment and (e) negatively supercoiled pUC19 plasmid spread using the BPS combined methods. Linear and closed circular DNAs are stretched onto the surface. (f–i) Positive staining of ssDNA PhiX174 virion spread in water (f) and in a buffer containing 10 mM Tris-HCl pH 7.5, 50 mM NaCl (g). In the latter buffer, ssDNA is folded due to its high flexibility and secondary structures formation. (h) SsDNA PhiX174 virion can be revealed after incubation with *E. coli* SSB proteins (one protein per 20 nucleotides in buffer 10 mM Tris-HCl pH 7.5, 50 mM NaCl). The reaction is diluted before its spreading using direct adsorption method. (i) SsDNA PhiX174 virion, spread using BPS method ssDNA appears very thin and stretched onto the surface. All scale bars represent 100 nm.

plasmid being stretched onto the surface, until the plectonemes of pUC19 totally disappeared through a redistribution of Twist and Writhe. The ssDNA PhiX174 was also clearly stretched using this BPS approach (Fig. 2i). Importantly, we observed that the BAC film integrity could be affected by the presence of proteins or other contaminants remaining in the DNA sample. With regard to the imaging conditions, we noticed that the positive staining is slightly affected using BPS compared to direct adsorption. First, the background appeared slightly brighter probably due to the interaction between small UrAc clusters

with the BAC film on the carbon surface. Second, DNA stretching reduces UrAc staining, which makes DNA thinner. The dark-field mode is essential for such imaging.

TEM analysis of synthetic DNA intermediates

Synthetic ss–dsDNA substrates (1–3 kb) designed for replication/recombination *in vitro* investigations can be efficiently analyzed using both direct absorption and BPS approaches.

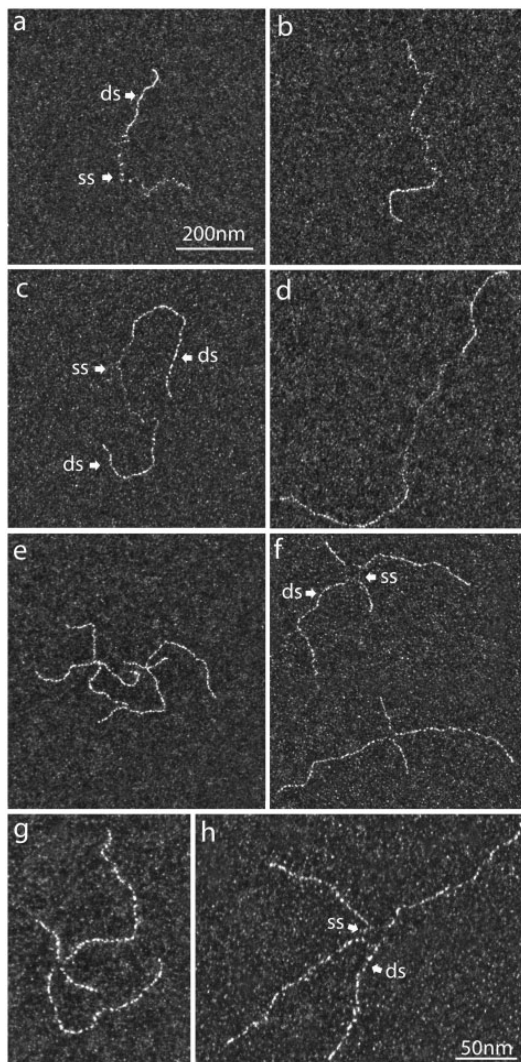


Figure 3: DNA substrates characterization using direct adsorption and BPS method. (a, b) Comparison of a 5' junction ss-dsDNA substrate spread using direct adsorption and BPS methods, respectively. The dsDNA is spread in the same way while the ss part is stretched using the BPS method. (c, d) Comparison of an ssDNA gap contained in dsDNA substrate spread using direct adsorption and BPS methods, respectively. (e, g, f, h) Comparison of a HJ DNA substrate spread using direct adsorption and BPS methods, respectively. This synthetic HJ displays a bubble at the crossing point. The magnification is the same ($\times 85\,000$) for each picture, (a-f): the scale bar represents 200 nm; (g-h) the scale bar represents 50 nm.

Mixed ss-ds and branched DNA substrates

We set up protocols to design and prepare ss-ds hybrid and ds-ds-ds (gapped) DNA molecules that could be used to mimic part of DNA intermediates, such as postreplicative gaps formed during replication, and other recombination intermediates. We prepared dsDNA linear fragments extended with a long single-stranded overhang (3' or 5') mimicking the double-strand break

after the resection step on the early stages of HR (see "Following HR intermediates using a TEM-suitable D-loop assay" section) (Fig. 3a and b), or single-stranded gaps that mimic repriming events during replication (Fig. 3c and d). The substrates were spread using both direct adsorption and BPS methods and visualized in dark-field mode (Fig. 3 panels of left and right, respectively). The ss and ds regions of the substrates were easily distinguishable under both conditions although the analysis of ssDNA within ss-ds hybrid and ds-ss-ds (gap) was clearly facilitated with the BPS method thanks to its stretching. These substrates were helpful to highlight the specific binding of a protein to the ss-dsDNA junction and can be used in *in vitro* HR experiments [23, 24]. Moreover, they may also be used to test working hypothesis concerning gap-filling mechanisms by comparing the structures obtained *in vitro* with those from *in vivo* experiments.

In a similar approach, we constructed synthetic four ways DNA substrates also known as Holliday Junctions (HJ) (Fig. 3e-h). BPS spreading revealed that all four-ways molecules clearly exhibited a denaturation bubble located at the junction point ("open centered structures"), rarely observed using direct adsorption spreading.

TEM quantitative analysis demonstrated that these DNA substrates were never destructured upon both spreading methods.

Following HR intermediates using a TEM-suitable displacement loop assay

HR uses a DNA template to repair damaged DNA by finding and copying the intact homologous DNA sequence of the sister chromatid. Rad51 recombinase forms an ATP-dependent presynaptic helical filament on ssDNA resulting from resection and able to catalyze homology search, strand invasion, and strand transfer [44-47]. We have developed *in vitro* approaches to generate and identify specific HR intermediates formed during homology search, strand invasion, and strand transfer mechanistic steps.

The nucleoprotein filament performs homology search by probing duplex DNA throughout the whole genome. Mechanistically, when homology is found, the interaction between the nucleoprotein filament on ssDNA and the duplex DNA donor results in their incorporation into a three-stranded intermediate, the synaptic complex [48-50]. Then the invading ssDNA and its complementary DNA strand in the dsDNA donor intertwine, forming the heteroduplex DNA and after the third strand is displaced, yielding a structure called the displacement loop (D-loop) [51, 52]. The D-loop is an important HR intermediate since its formation is required to prime DNA synthesis [33] but its precise architecture is still poorly known. To reconstitute HR synaptic intermediates such as D-loop and gain molecular insight, we have set up a D-loop assay and followed the intermediates formed along the reaction using direct adsorption of the sample and TEM analysis (Fig. 4). Rad51 (from yeast or human) was incubated with a 5' junction DNA substrate to form the presynaptic filament, and then a homologous supercoiled dsDNA plasmid was added (Fig. 4a and b). Rad51-mediated synaptic complexes are the protein-containing joint molecules resulting from the interaction of Rad51-ssDNA with the homologous dsDNA donor. We were able not only to quantify the amount of joint molecules, but also to evaluate the length of the contact zone, to assess the presence of proteins on it (with the ability to specifically label proteins using gold bead coupled antibodies), and finally to characterize the topological

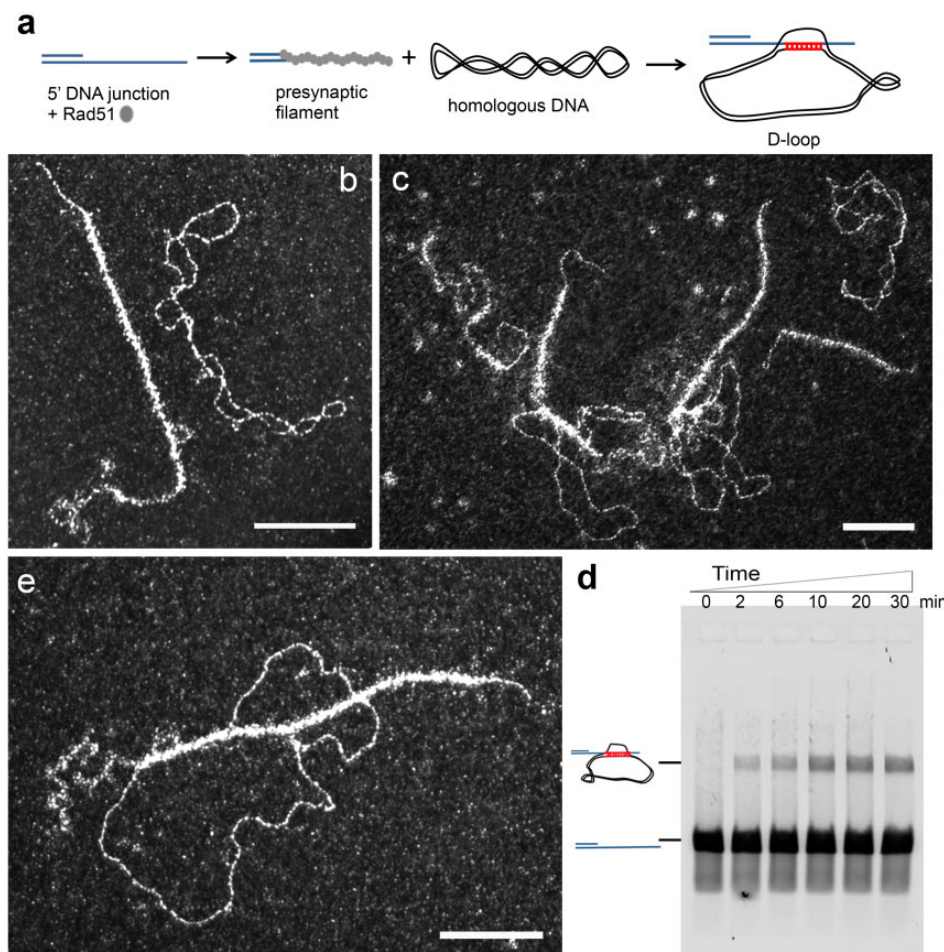


Figure 4: D-loop assay followed by TEM in dark-field mode using direct adsorption method. (a) Scheme of the D-loop reaction. The 5'-DNA junction was incubated with Rad51 (one protein per three nucleotides) for 3 min followed by RPA addition (1 protein per 60 nt) 10 min at 37°C in a buffer containing 10 mM Tris-HCl (pH 8), 50 mM NaCl, 3 mM MgCl₂, 1 mM DTT, and 1.5 mM ATP. Then homologous dsDNA pUC19 negatively supercoiled plasmid was added to the reaction during 30 min. RAD51 polymerizes onto the DNA substrate to form the presynaptic filament and then catalyzes the formation of the synaptic complex with the homologous DNA. (b) TEM representative view of the presynaptic filament formed on the 5' junction and the homolog plasmid. (c) Representative view of the reaction (20 min). (d) Zoom on a synaptic complex (joint molecule formed between the presynaptic filament and the homolog plasmid); (e) half of the reaction was deproteinized then run on an electrophoretic gel, the D-loop band is visible within 2 min following homolog plasmid addition. All scale bars represent 100 nm.

properties of the homologous dsDNA donor (Fig. 4c and d) [24]. The traditional D-loop assay involves deproteinization of the reaction products, allowing the DNA species separation by electrophoresis and the reaction yield quantification along time (Fig. 4e).

Structural characterization of DNA intermediates formed during DNA strand exchange

The DNA strand exchange assay is mechanistically different from the D-loop assay, mainly because of the long and fully homologous DNA substrates used which allow the complete strand transfer. Recombinases promote *in vitro* strand exchange between circular ssDNA and linear homologous dsDNA by catalyzing the strand transfer from the extremity of the linear dsDNA to the circular DNA strand originally unpaired [53, 54].

The presynaptic filament was performed by Rad51 polymerization on PhiX174 circular ssDNA in the presence of RPA, then the previously linearized homologous dsDNA PhiX174 was added (Fig. 5a). The formation of joint molecules by Rad51 between circular ssDNA and linear dsDNA and further final products (nicked circles) were monitored by TEM analysis providing mechanistic details (Fig. 5b-k). After addition of the donor dsDNA to the preformed presynaptic filaments, direct adsorption spreading of the sample revealed the formation of different joint molecules due to the capture of linear dsDNA by the Rad51 filament on circular ssDNA (Fig. 5c-e), leading to different lengths of strand transfer within the filament, with formation of displaced ssDNA covered by RPA (cloudy region, near the arrow pointing the strand transfer region). As shown in Fig. 5d, the first contact between the circular ss- and ds-DNA only occurred through the extremity of the linear dsDNA. To better

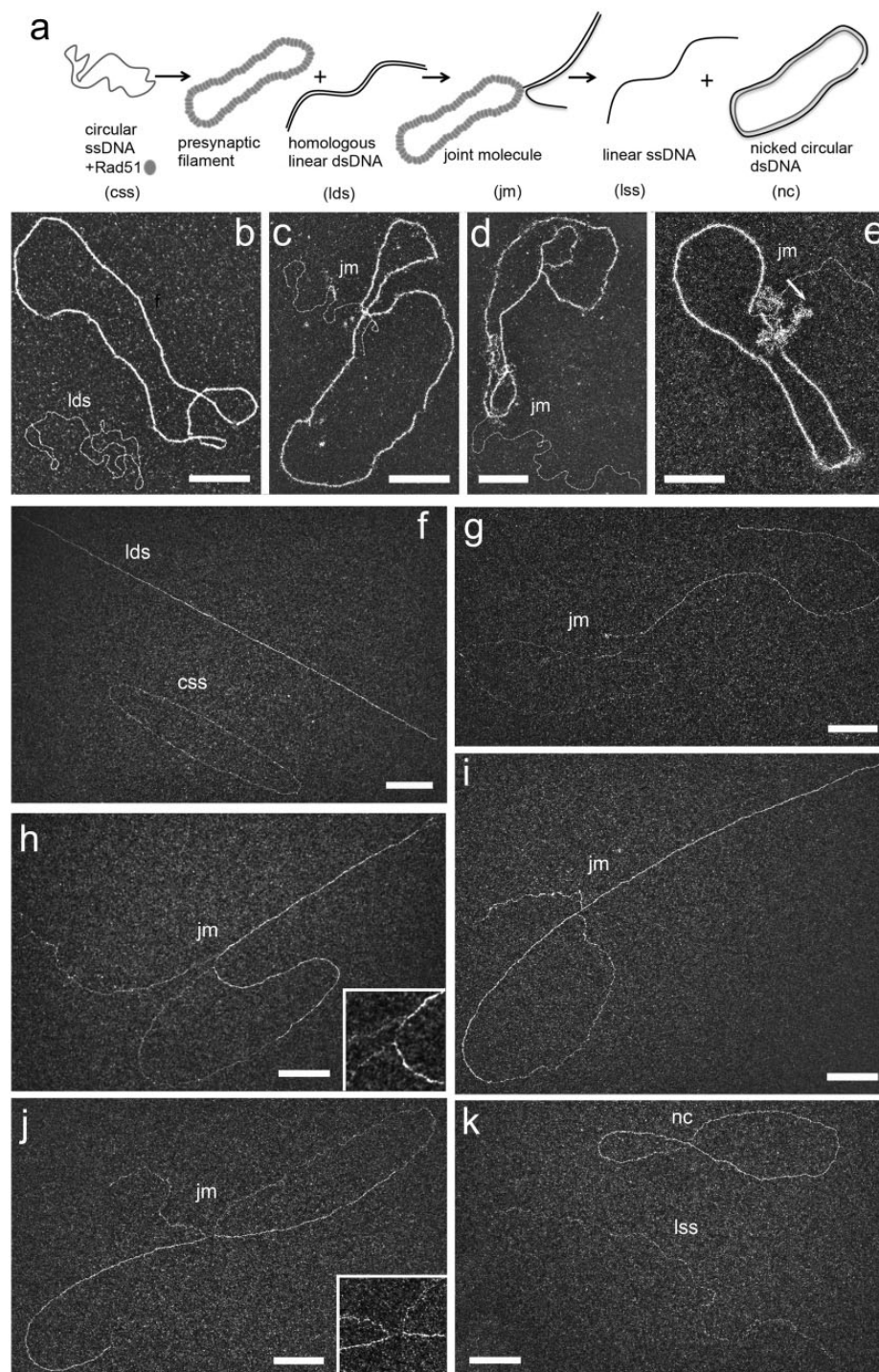


Figure 5: Strand exchange assay followed by TEM using direct adsorption or cross-linking/deproteinization combined with BPS spreading. (a) Scheme of the strand exchange reaction. The ssDNA PhiX174 virion (named circular ssDNA, css) was incubated with Rad51 (one protein per three nucleotides) for 3 min followed by RPA addition (1 protein per 60 nt) 10 min at 37°C in a buffer containing 10 mM Tris-HCl (pH 8), 50 mM sodium chloride, 3 mM Magnesium chloride, 1 mM DTT, and 1.5 mM ATP. Then linearized PhiX174 RFI homologous plasmid (named linear dsDNA, lds) was added to the reaction during 30 min. RAD51 polymerizes onto the ssDNA substrate to form the presynaptic filament and then catalyzes the strand invasion and strand transfer with the linear homologous dsDNA. Final products are linear ssDNA (lss) and

(continued)

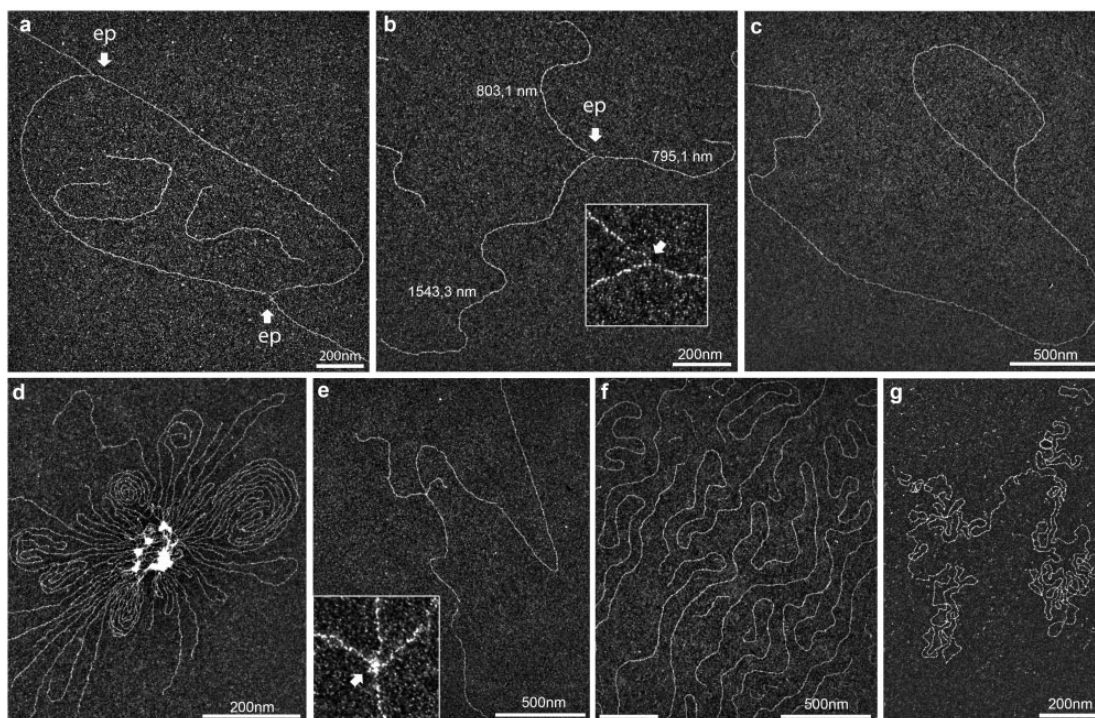


Figure 6: Reliable characterization of *in vivo* DNA intermediates. Replication intermediates were isolated from human fibroblastic cells as described and subjected to BPS method. (a) Typical replication bubble (untreated cells). (b) Typical replication fork resulting from the symmetric enzymatic digestion of a replication bubble, displaying two daughter strands of the same length and no visible ssDNA regions (untreated cells). (c) Loop-ended linear dsDNA molecule potentially corresponding to telomeric structures, or “T-Loop”, as described by Griffith et al. in 1999 (untreated cells). (d) An improperly deproteinized sample exhibited gDNA aggregation and protein clusters. (e) Subtle amounts of residual proteins (inlay) bridged two individual molecules together and consequently generated intermolecular crossings, generating nonspecific four-way structures (untreated cells). Comparison of gDNA spread using BPS (f) and direct adsorption (g) methods. The BPS avoids random crossovers of long DNA molecules.

reveal the architecture and to allow a more precise analysis of the intermediates, joint molecules must be deproteinized and deployed on the surface. In that way, samples were stabilized using UVA/trioxsalen *in vitro* cross-linking, deproteinized and subjected to BPS and TEM analysis (Fig. 5f–k). We identified two populations of joint molecules: one where the DNA strand transfer was initiating through the extremity of the linear dsDNA containing a small portion that had been transferred (Fig. 5g), and a second exhibiting a longer length of transferred strand (Fig. 5h–j). Notably, in most of them, ~50% of the total length of linear dsDNA had been transferred. These two intermediates seemed to be kinetically stable joint molecules during the strand exchange reaction. Interestingly, in some joint molecule intermediates, we detected the presence of ssDNA region at the transfer zone (Fig. 5h and j). We inferred this happens because, as proposed for RecA, a segment of the exchanged strand

is maintained in a three-stranded complex with Rad51, which is disrupted upon deproteinization [48, 55, 56].

Characterization of *in vivo* DNA intermediates

Various endogenous and exogenous damages induce replication fork stalling and collapse, a source of genomic instability. The study of DNA intermediates generated at replication fork represents a crucial point to understand how the replication machinery coordinates with DNA repair and Damage Tolerance (DDT) mechanisms. Efforts have been made to decipher replication dynamics at the molecular level (e.g., DNA fiber assays), but structural evidences are often lacking. TEM constitutes a unique tool allowing the fine characterization of *in vivo* intermediate architectures. José Sogo, Jack Griffith, and David Dressler have been among the leaders in this field, developing TEM tools that

Figure 5: Continued.

nicked dsDNA plasmid (nc). (b–e) The reaction is diluted and spread using direct adsorption method followed by positive staining. (b) DNA substrates at the beginning of the reaction (presynaptic filament formed by Rad51 polymerization on css and naked lds); (c–e) representative joint molecules; (f–k) The reaction is cross-linked using psoralen/UVA irradiation, deproteinized, DNA intermediates are extracted using phenol/chloroform then diluted and spread following BPS procedure. (f) DNA substrates at the beginning of the reaction after deproteinization (css and lds); (g–j) representative joint molecules formed during the reaction (20 min). The first contact between the circular ss- and ds-DNA occurred through the extremity of the linear dsDNA (g). A small part of the lds has been transferred to the css. An ssDNA region (“gap”) is often visible at the point of strand transfer (see zooms on (h) and (j)). (k) Final products of the reaction: linear ssDNA (lss) and nicked circular dsDNA (nc). All scale bars represent 200 nm.

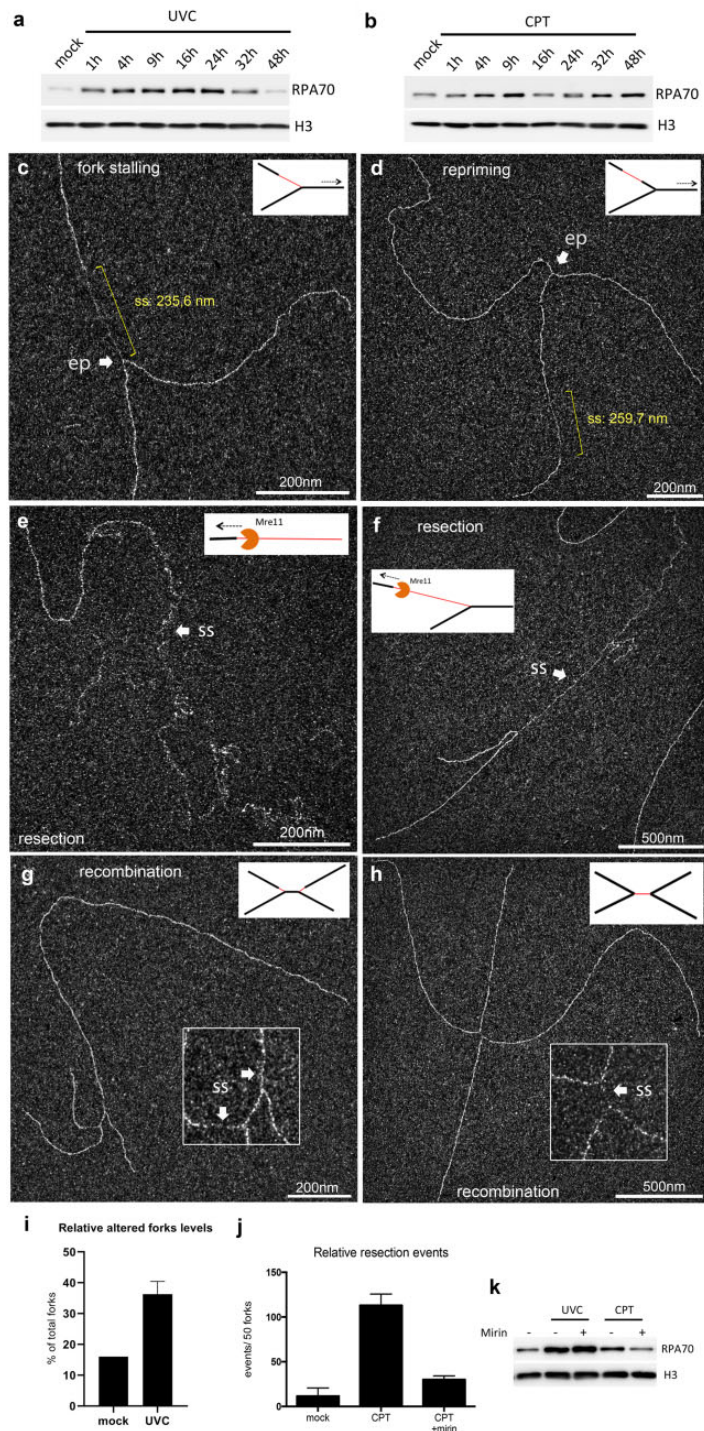


Figure 7: Characterization of *in vivo* DNA intermediates following genotoxic treatments reveals the cellular DDR. Kinetic characterization of global ssDNA accumulation by monitoring the RPA70 recruitment to chromatin after CPT (200 nM) (a) or UVC (15 J/m²) (b) treatment of human fibroblastic cells. UVC induced a one-way profile over the time, whereas CPT induced a two-way profile with ssDNA remaining unrepaired at 48 h. For TEM analysis, gDNA was isolated at 1 h after genotoxic treatment and subjected to BPS spreading. (c, d) Altered replication forks isolated from UV-treated cells (25 J/m²). Indicated in yellow, two types of ssDNA stretches could be observed and measured for further studies, one starting from the elongation point (c), reminiscent of a fork stalling, and the other located on one daughter strand (d), suggesting

(continued)

gave access to the nucleic structures, thereby contributing to major advances on DNA replication and DDR understanding: the identification of HJs in *Escherichia coli*, fork reversal in yeast and humans, replication fork stalling and fork restart downstream the DNA lesion (“repriming”), template switching in yeast, meiotic HR, but also identification of the till then theoretical telomeric loop (T-loop) in humans [57–64]. TEM procedures have been more recently updated notably by developing methods dedicated to human cell studies [37, 65, 66]. By combining an optimized *in vivo* sample preparation of these fragile structures to the BPS procedure, we improved their fine visualization.

DNA intermediates preparation

In order to stabilize the structures, cells were first subjected to UVA/trioxalen *in vivo* cross-linking, which generates inter-strand DNA covalent link (interstrand cross-link) into gDNA sites that are not protected by the presence of nucleosomes or other chromatin-associated proteins. This procedure avoids further slippage or denaturation of DNA intermediates upon the subsequent sample preparation [67–69]. The efficiency of the cross-link was calibrated by transient denaturation as previously described [70] (data not shown). The second step corresponds to the subsequent purification of gDNA that requires a careful handling to avoid DNA breakages. Since genotoxic treatments specifically increase ssDNA accumulation, the gDNA material becomes more fragile and breakable. Concretely, this can generate asymmetric replication forks [61]. In a third step, a rigorous protein removal was carried out to remove tightly bound chromatin-associated proteins, in order to avoid the formation of nonspecific structures (see below) but also to maintain the hyperphase film integrity. In a fourth step, the gDNA was fragmented using enzymatic restriction, together with residual RNA removal to avoid its misleading with ssDNA and subsequent misunderstanding of the structures. Nuclei isolation and the use of DNAzol first optimized the RNA removal. Note that the efficiency of enzymatic fragmentation had to be set up depending on the structures of interest (choice of enzyme, enzyme/DNA ratio, and time of reaction). For example, excessive fragmentation generated short molecules but increased the enrichment specificity, i.e., reducing amount of molecules devoid of ssDNA. Conversely, mild fragmentation increased the rate of large molecules containing a unique/short ssDNA region. In a final step, the sample was then loaded onto a BND-cellulose chromatography column (a resin highly affine for ssDNA) allowing the separation of ssDNA containing molecules from the strictly dsDNA material by elution with caffeine agent. As structures containing ssDNA regions, DNA intermediates were enriched in caffeine fractions [37, 61, 71]. As a quality control, the enrichment efficiency was evaluated by TEM analysis of all fractions.

Figure 7: Continued.

a postreplicative gap generated by a repriming process. (e, f) Early resection events isolated from CPT-treated cells (200 nM), consisting of long-ssDNA stretches (several kbs), indicated with arrows and located either at dsDNA molecule extremity (e) or at the elongation point of a replication fork (f). Multibranch structures (or “H-shape”) resulting from late recombination events in (g) UV-treated cells and (h) CPT-treated cells. (i) Relative altered forks levels upon UVC treatment. For each condition, 50 forks were characterized and evaluated for the UVC-specific ssDNA regions located at or/and behind the elongation point. The error bar represents the SD between two independent experiments. (j, k) MRC5 cells were pretreated or not with 30 μ M Mirin for 1 h, and then subjected to CPT treatment for 1 h. (j) The levels of relative resection events were evaluated and normalized to 50 usual replication forks. The error bars represent the SD between two independent experiments. (k) Together with the levels of resection events, the addition of Mirin also reduced the global ssDNA levels following the CPT treatment, but not after UVC. ss, ssDNA; ep, elongation point.

Accurate characterization of *in vivo* DNA intermediates

DNA intermediates were extracted from human fibroblastic cells, then spread using BPS approach and analyzed in dark-field imaging mode (Fig. 6). As transitory and dynamic entities, entire replication bubbles were rarely observed, because they quickly underwent fragmentation owing to the sample preparation (Fig. 6a). This hydrolysis resulted in symmetric replication forks after enzymatic cleavage of the two daughter strands (Fig. 6b). In untreated conditions, no accumulation of ssDNA in the vicinity of the fork was observed. Interestingly, loop-ended dsDNA molecules were sometimes identified (Fig. 6c) probably corresponding to telomeric structures (T-loops) previously evidenced using TEM [64].

As the structures of interest were expected to display branched DNA structures, accidental inter- and intramolecular crossovers have to be identified and limited. Performing BAC spreading avoided most of the dsDNA crossovers (compare Fig. 6f to Fig. 6g). However, the presence of residual chromatin-bound proteins can bridge multiple DNA molecules together (Fig. 6d). Using our imaging mode allowed a fine identification of protein clusters appearing as a local increased contrast at the crossing point of two independent molecules (Fig. 6e).

Characterizing DNA intermediates to identify the DNA damage tolerance mechanisms

The cellular response to replication stress is in part specific of the type of DNA lesion. To validate the whole procedure described herein, we characterized DNA intermediates structures in cells undergoing two different genotoxic treatments. On the one hand, UVC is natural solar radiations inducing bulky lesions into DNA, mostly composed of cyclobutane pyrimidine dimers and pyrimidine 6–4 pyrimidone (6–4 PP) photoproducts [72]. On the other hand, CPT is an anticancer cytotoxic alkaloid that stabilizes a cleavable complex between topoisomerase I and DNA. Both treatments impede the replication forks progression and generate genomic ssDNA accumulation [1, 73–78]. RPA is the major ssDNA-binding protein in eukaryotes and is a key factor in both DNA replication and DDR pathways activation [79, 80]. In order to evaluate the global genomic ssDNA accumulation upon both treatments, we monitored the recruitment of RPA70 subunit levels to the chromatin as a sensor of global DNA damages. Both UVC (15 J/m²) and CPT (200 nM) treatments induced a recruitment of RPA70 in the first hour, but the recruitment profiles evolved differently over the time (compare Fig. 7a and b).

To provide information on DDR mechanisms used by the cells to cope with the damages, DNA intermediates were characterized by TEM early (1 h) and later (2 h) after both equivalent treatments. In UVC-treated cells, we showed an early accumulation of ssDNA regions at and behind the elongation point of the replication forks (Fig. 7c and d, respectively). Previous TEM studies reported that it corresponded to the stalling of leading strand synthesis (inducing the uncoupling of helicase and synthesis activities) and to postreplicative gaps owing to repriming

events [59–61]. Here the rate of these altered forks increased 2.3-fold upon UVC challenge (Fig. 7i). Conversely, CPT treatment induced the accumulation of much longer ssDNA regions located either at dsDNA molecule extremities or less frequently starting from the elongation point of the replication forks (Fig. 7e and f). The addition of Mirin, an Mre11 nuclease inhibitor, significantly reduced (almost 4-fold) the levels of these structures and limited RPA70 recruitment to chromatin (Fig. 7j and k). In contrast, the inhibitor did not influence RPA70 recruitment induced by UVC, revealing two distinct mechanisms for early ssDNA accumulation. These results were consistent with previous studies describing UV-induced fork stalling and gaps accumulation [59, 61], however, we provided here the first structural observations of early resection events induced by CPT treatment.

Two hours following both treatments, multibranching DNA intermediates were observed (Fig. 7g and h). Intriguingly, they were totally absent at earlier time points or in untreated conditions. Most of the time, they displayed an “H-shape” with a short ssDNA region at the center, making them unlikely to correspond to two converging replication forks. Interestingly, they locally resembled joint molecules identified in the *in vitro* strand-exchange reaction described above (Fig. 5h and j). We propose these structures to belong to postreplicative recombination events. However, further studies are needed to better characterize these particular DNA intermediates.

Conclusion

TEM has a long history of success in characterizing the architecture of DNA intermediates through their direct visualization, which has undeniably provided a unique perspective for drawing the molecular basis of DNA replication and repair mechanisms. We present here methods specifically dedicated to structural analysis of replication and recombination DNA intermediates, including *in vitro* DNA and nucleoprotein machineries related to DNA repair pathways and *in vivo* replication DNA intermediates. It ranges from the preparation of *in vitro* and *in vivo* samples to imaging developments. The use of positive staining approach allows imaging in low-dye condition and will open perspectives to move toward a low-dose acquisition mode in order to improve resolution. These developments will be reinforced by the use of new generation of CCD or direct cameras associated with automatic acquisition system and adequate image analysis software. In this way, our team is actually developing the automatic digitization of DNA molecules by contour tracking, taking into account the different trajectories of the DNA.

Finally, while the method described herein represents an original and robust approach to characterize the molecular features of DDR pathways, we now have to explore new strategies to enrich and purify specific intermediate structures to enlarge and precise our application field. Coupled with other biochemical approaches, our method allowed dissecting-specific HR molecular mechanism, highlighting pioneering observations of resection and recombination events. Facing the structures observed *in vitro* and *in vivo* offers unique perspectives for the understanding of these complex molecular choreographies.

Supplementary data

Supplementary data is available at *Biology Methods and Protocols* online.

Acknowledgements

The authors specifically thank A. De Cian and A. Joubert (E.L.C. team and both current position CNRS UMR 7196/INSERM U1154) for their active contribution to the implementation of the method. Y.B. was supported by the SIRIC SOCRATE program (INCa-DGOS-Inserm 12551) under the supervision of P. Kannouche (UMR9019, Equipe labellisée Ligue contre le Cancer). J.-C. Ehrhart, G. Mazòn, and E. Despras are also thanked for helpful discussions and critical reading of the manuscript.

Funding

This work has been initially supported by ANR (PIRBIO-MIRR), then by ANR FIRE ANR-17-CE12-0015 and PLBio2016-144.

Conflict of interest statement

The authors declare no conflict of interest.

References

- Zeman MK, Cimprich KA. Causes and consequences of replication stress. *Nat Cell Biol* 2014;16:2–9.
- Branzei D, Foiani M. Interplay of replication checkpoints and repair proteins at stalled replication forks. *DNA Repair (Amst)* 2007;6:994–1003.
- Branzei D, Szakal B. DNA damage tolerance by recombination: molecular pathways and *DNA Repair (Amst)* 2016;44:68–75.
- Ait Saada A, Lambert SAE, Carr AM. Preserving replication fork integrity and competence via the homologous recombination pathway. *DNA Repair (Amst)* 2018;71:135–47.
- Abermann R, Salpeter MM. Visualization of deoxyribonucleic acid molecules by protein film adsorption and tantalum tungsten shadowing. *J Histochem Cytochem* 1974;22:845–55.
- Lang D, Kleinschmidt AK, Zahn RK. Configuration and longitudinal distribution of DNA molecules in solution. *Biochim Biophys Acta* 1964;29:142–54.
- Kaiser AD, Inman RB. Cohesion and the biological activity of bacteriophage lambda DNA. *J Mol Biol* 1965;13:78–91.
- Knippers R, Razin A, Davis R et al. The process of infection with bacteriophage + X174 in *vim* studies on the synthesis of the single-stranded DNA of progeny 4x174 bacteriophage. *J Mol Biol* 1969;45:237–63.
- Clayton D, Davis W, Vinograd J. Homology and structural relationships between the dimeric and monomeric circular forms of mitochondrial DNA from human leukemic leukocytes. *J Mol Biol* 1970;47:137–53.
- Dubochet J, Ducommun M, Zollinger M et al. A new preparation method for dark-field electron microscopy of biomacromolecules. *J Ultrastruct Res* 1971;35:147–67.
- Sogo JM, Portmann R, Kaufmann P et al. Adsorption of DNA molecules to different support films. *J Microsc* 1975;104:187–98.
- Williams RC. Use of polylysine for adsorption of nucleic acids and enzymes to electron microscope specimen films. *Proc Natl Acad Sci USA* 1977;74:2311–5.

13. Griffith JD, Christiansen G. Electron microscope visualization of chromatin and other DNA-protein complexes. *Annu Rev Biophys Bioeng* 1978;7:19–35.
14. Stasiak A, Di Capua E, Koller T. Elongation of duplex DNA by recA protein. *J Mol Biol* 1981;151:557–64.
15. Cherny DI, Jovin TM. Electron and scanning force microscopy studies of alterations in supercoiled DNA tertiary structure. *J Mol Biol* 2001;313:295–307.
16. Vollenweider HJ, James A, Szybalski W. Discrete length classes of DNA depend on mode of dehydration. *Proc Natl Acad Sci USA* 1978;75:710–4.
17. Vollenweider HJ, Sogo JM, Koller T. A routine method for protein-free spreading of double- and single-stranded nucleic acid molecules. *Proc Natl Acad Sci USA* 1975;72:83–7.
18. Thach SS, Collins ML, Thach RE. Electron microscopy of single and double stranded nucleic acid: a new technique. *J Ultrastructure Res* 1976;55:70–8.
19. Benada O. A modified BAC method for the preparation of large number of DNA samples for electron microscopy. *J Elec Microsc Tech* 1987;5:381–2.
20. Le Cam E, Culard F, Larquet E et al. DNA bending induced by the archaeobacterial histone-like protein MC1. *J Mol Biol* 1999;285:1011–21.
21. Veaute X, Jeusset J, Soustelle C et al. The Srs2 helicase prevents recombination by disrupting Rad51 nucleoprotein filaments. *Nature* 2003;423:309–12.
22. Dupaigne P, Lavelle C, Justome A et al. Rad51 polymerization reveals a new chromatin remodeling mechanism. *PLoS One* 2008;3:e3643.
23. Dupaigne P, Le Breton C, Fabre F et al. The Srs2 helicase activity is stimulated by Rad51 filaments on dsDNA: implications for crossover incidence during mitotic recombination. *Mol Cell* 2008;29:243–54.
24. Tavares EM, Wright WD, Heyer WD et al. *In vitro* role of Rad54 in Rad51-ssDNA filament-dependent homology search and synaptic complexes formation. *Nat Commun* 2019;10:1–12.
25. Joanicot M, Revet B. DNA conformational studies from electron microscopy. Excluded effect volume and structured dimensionality. *Biopolymers* 1987;26:315–26.
26. Muzard G, Theveny B, Revet B. Electron microscopy mapping of pBR322 DNA curvature. Comparison with theoretical models. *Embo J* 1990;9:1289–98.
27. Mory C, Colliex C, Revet B et al. Improved visualization of single- and double-strained nucleic acids by STEM. *Ultramicroscopy* 1981;7:161–7.
28. Delain E, Le Cam E. The spreading of nucleic acids. In: Morel G (ed.), *Visualization of Nucleic Acids*. CRC Press, 1995, 35–55.
29. Beloin C, Jeusset J, Révet B et al. Contribution of DNA conformation and topology in right-handed DNA wrapping by the *Bacillus subtilis* LrpC protein. *J Biol Chem* 2003;278:5333–42.
30. Le Cam E, Theveny B, Mignotte B et al. Quantitative electron microscopic analysis of DNA- protein interactions. *J Elec Microsc Tech* 1991;18:375–86.
31. Cognet JAH, Pakleza C, Cherny D et al. Static curvature and flexibility measurements of DNA with microscopy. A simple renormalization method, its assessment by experiment and simulation. *J Mol Biol* 1999;285:997–1009.
32. Le Cam E, Frechon D, Barray M et al. Observation of binding and polymerization of Fur repressor onto operator-containing DNA with electron and atomic force microscopes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:11816–20.
33. Wright WD, Heyer WD. Rad54 functions as a heteroduplex DNA pump modulated by its DNA substrates and Rad51 during D loop formation. *Mol Cell* 2014;53:420–32.
34. Sugiyama T, Zaitseva EM, Kowalczykowski SC. A single-stranded DNA-binding protein is needed for efficient presynaptic complex formation by the *Saccharomyces cerevisiae* Rad51 protein. *J Biol Chem* 1997;272:7940–5.
35. New JH, Sugiyama T, Zaitseva E et al. Rad52 protein stimulates DNA strand exchange by Rad51 and replication protein A. *Nature* 1998;391:407–10.
36. Solinger JA, Lutz G, Sugiyama T et al. Rad54 protein stimulates heteroduplex DNA formation in the synaptic phase of DNA strand exchange via specific interactions with the presynaptic Rad51 nucleoprotein filament. *J Mol Biol* 2001;307:1207–21.
37. Neelsen KJ, Chaudhuri AR, Follonier C et al. Visualization and interpretation of eukaryotic DNA replication intermediates in vivo by electron microscopy. *Methods Mol Biol* 2014;1094:177–208.
38. Le Cam E, Fack F, Ménissier-de Murcia J et al. Conformational analysis of a 139 base-pair DNA fragment containing a single-stranded break and its interaction with human poly(ADP-ribose) polymerase. *J Mol Biol* 1994;235:1062–71.
39. Kládova OA, Bazlekowa-Karaban M, Bacconnais S et al. The role of the N-terminal domain of human apurinic/apyrimidinic endonuclease 1, APE1, in DNA glycosylase stimulation. *DNA Repair (Amst)* 2018;64:10–25.
40. Toulmé F, Le Cam E, Teyssier C et al. Conformational changes of DNA minicircles upon the binding of the archaeobacterial histone-like protein MC1. *J Biol Chem* 1995;270:6286–91.
41. Le Cam E, Delain E, Larquet E et al. DNA protein complexes analyzed by electron microscopy and cryomicroscopy. In: Buckle AT& M (ed.), *Practical Approach Series*, Vol. 37. Oxford University. 2000, 337–50.
42. Dupaigne P, Tavares EM, Piétrement O et al. Recombinases and related proteins in the context of homologous recombination analyzed by molecular microscopy. *Methods Mol Biol* 2018;1805:251–70.
43. Ma E, Dupaigne P, Maloisel L et al. Rad52-Rad51 association is essential to protect Rad51 filaments against Srs2, but facultative for filament formation. *Elife* 2018;7:1–24.
44. Nishinaka T, Shinohara A, Ito Y et al. Base pair switching by interconversion of sugar puckers in DNA extended by proteins of RecA-family: a model for homology search in homologous genetic recombination. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:11071–6.
45. Chen Z, Yang H, Pavletich NP. Mechanism of homologous recombination from the RecA-ssDNA/dsDNA structures. *Nature* 2008;453:489–4.
46. Ogawa T, Yu X, Shinohara A et al. Similarity of the yeast RAD51 filament to the bacterial RecA filament. *Science* 1993;259:1896–9.
47. Yu X, Jacobs SA, West SC et al. Domain structure and dynamics in the helical filaments formed by RecA and Rad51 on DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:8419–24.
48. Christiansen G, Griffith J. Visualization of the paranemic joining of homologous DNA molecules catalyzed by the RecA protein of *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986;83:2066–70.
49. Dray E, Etchin J, Wiese C et al. Enhancement of RAD51 recombinase activity by the tumor suppressor PALB2. *Nat Struct Mol Biol* 2010;17:1255–9.
50. Wiese C, Dray E, Groesser T et al. Promotion of homologous recombination and genomic stability by RAD51AP1 via RAD51 recombinase enhancement. *Mol Cell* 2007;28:482–90.
51. Riddles PW, Lehman IR. The formation of paranemic and plectonemic joints between DNA molecules by the recA and

- single-stranded DNA-binding proteins of *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 1985;**260**:165–9.
52. Bianchi M, DasGupta C, Radding CM. Synapsis and the formation of paranemic joints by *E. coli* RecA protein. *Cell* 1983;**34**: 931–9.
 53. Howard-Flanders P, West SC, Stasiak A. Role of RecA protein spiral filaments in genetic recombination. *Nature* 1984;**309**: 215–9.
 54. Prentiss M, Prévost C, Danilowicz C. Structure/function relationships in RecA protein-mediated homology recognition and strand exchange. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 2015;**50**: 453–76.
 55. Register JC, Christiansen G, Griffith J. Electron microscopic visualization of the RecA protein-mediated pairing and branch migration phases of DNA strand exchange. *J Biol Chem* 1987;**262**:12812–20.
 56. Rao BJ, Jwang B, Radding CM. RecA protein reinitiates strand exchange on isolated protein-free DNA intermediates. *J Mol Biol* 1990;**213**:789–809.
 57. Potter H, Dressler D. On the mechanism of genetic recombination: the maturation of recombination intermediates. *Proc Natl Acad Sci USA* 1977;**74**:4168–72.
 58. Sogo JM, Lopes M, Foiani M. Fork reversal and ssDNA accumulation at stalled replication forks owing to checkpoint defects. *Science* 2002;**297**:599–602.
 59. Zellweger R, Dalcher D, Mutreja K et al. Rad51-mediated replication fork reversal is a global response to genotoxic treatments in human cells. *J Cell Biol* 2015;**208**:563–79.
 60. Cordeiro-Stone M, Makhov AM, Zaritskaya LS et al. Analysis of DNA replication forks encountering a pyrimidine dimer in the template to the leading strand. *J Mol Biol* 1999;**289**: 1207–18.
 61. Lopes M, Foiani M, Sogo JM. Multiple mechanisms control chromosome integrity after replication fork uncoupling and restart at irreparable UV lesions. *Mol Cell* 2006;**21**:15–27.
 62. Giannattasio M, Zwicky K, Follonier C et al. Visualization of recombination-mediated damage bypass by template switching. *Nat Struct Mol Biol* 2014;**21**:884–92.
 63. Cromie GA, Hyppa RW, Taylor AF et al. Single Holliday junctions are intermediates of meiotic recombination. *Cell* 2006;**127**:1167–78.
 64. Griffith JD, Comeau L, Rosenfield S et al. Mammalian telomeres end in a large duplex loop. *Cell* 1999;**97**:503–14.
 65. Lopes M. Electron microscopy methods for studying in vivo DNA replication intermediates. *Methods Mol Biol* 2009;**521**: 605–31.
 66. Zellweger R, Lopes M. Dynamic architecture of eukaryotic DNA replication forks in vivo, visualized by electron microscopy. *Methods Mol Biol* 2018;**1672**:261–94.
 67. Tatsumi K, Strauss B. Production of DNA bifilarly substituted with bromodeoxyuridine in the first round of synthesis: branch migration during isolation of cellular DNA. *Nucl Acids Res* 1978;**5**:331–47.
 68. Cole RS, Zusman D. Sedimentation properties of phage DNA molecules containing light-induced psoralen cross-links. *BBA Sect Nucleic Acids Protein Synth* 1970;**224**:660–2.
 69. Hanson CV, Shen CKJ, Hearst JE. Cross-linking of DNA in situ as a probe for chromatin structure. *Science* 1976;**193**:62–4.
 70. Sogo JM, Ness PJ, Widmer RM et al. Psoralen-crosslinking of DNA as a probe for the structure of active nucleolar chromatin. *J Mol Biol* 1984;**178**:897–919.
 71. Dijkwel PA, Vaughn JP, Hamlin JL. Mapping of replication initiation sites in mammalian genomes by two-dimensional gel analysis: stabilization and enrichment of replication intermediates by isolation on the nuclear matrix. *Mol Cell Biol* 1991;**11**:3850–9.
 72. Rastogi RP, Richa Kumar A, Tyagi MB et al. Molecular mechanisms of ultraviolet radiation-induced DNA damage and repair. *J Nucleic Acids* 2010;**2010**.
 73. Booth C. Quantitative amplification of single-stranded DNA (QAOS) demonstrates that cdc13-1 mutants generate ssDNA in a telomere to centromere direction. *Nucleic Acids Res* 2001;**29**:4414–22.
 74. Holstein EM, Lydall D. Quantitative amplification of single-stranded DNA. *Methods Mol Biol* 2012;**920**:323–39.
 75. Despras E, Daboussi F, Hyrien O et al. ATR/Chk1 pathway is essential for resumption of DNA synthesis and cell survival in UV-irradiated XP variant cells. *Hum Mol Genet* 2010;**19**: 1690–701.
 76. Shao R-G. Replication-mediated DNA damage by camptothecin induces phosphorylation of RPA by DNA-dependent protein kinase and dissociates RPA: DNA-PK complexes. *Embo J* 1999;**18**:1397–406.
 77. Sakasai R, Shinohe K, Ichijima Y et al. Differential involvement of phosphatidylinositol 3-kinase-related protein kinases in hyperphosphorylation of replication protein A2 in response to replication-mediated DNA double-strand breaks. *Genes Cells* 2006;**11**:237–46.
 78. Lehmann AR, Fuchs RP. Gaps and forks in DNA replication: rediscovering old models. *DNA Repair (Amst)* 2006;**5**: 1495–8.
 79. Maréchal A, Zou L. RPA-coated single-stranded DNA as a platform for post-translational modifications in the DNA damage response. *Cell Res* 2015;**25**:9–23.
 80. Oakley GG, Patrick SM. Replication protein A: Directing traffic at the intersection of replication and repair. *Front Biosci* 2010;**15**:883–900.

Annexe II : Article I

***In vivo* inactivation of RAD51-mediated homologous recombination leads to premature aging rather than tumor development**

Gabriel Matos-Rodrigues^{1,2}, Vilma Barroca³, Ali-Akbar Muhammad⁴, Awatef Allouch⁵, Stephane Koundrioukoff⁶, Daniel Lewandowski³, Emmanuelle Despras⁷, Josée Guirouilh-Barbat¹, Lucien Frappart⁸, Patricia Kannouche⁷, Pauline Dupaigne⁴, Eric Le Cam⁴, Jean-Luc Perfettini⁵, Paul-Henri Romeo³, Michelle Debatisse⁶, Maria Jasin⁹, Gabriel Livera², Emmanuelle Martini^{2*}, Bernard S. Lopez^{1*}

¹Institut Cochin, INSERM U1016, UMR 8104 CNRS, Université de Paris, Equipe Labellisée Ligue Contre le Cancer, France.

²Université de Paris and Université Paris-Saclay, Laboratory of Development of the Gonads, IRCM/IBFJ CEA, UMR Genetic Stability Stem cells and Radiations, F-92265 Fontenay aux Roses, France.

³ Université de Paris and Université Paris-Saclay, Inserm, IRCM/IBFJ CEA, UMR Genetic Stability Stem cells and Radiations, F-92265 Fontenay aux Roses, France.

⁴Genome Maintenance and Molecular Microscopy UMR8126 CNRS, Université Paris- Sud, Université Paris-Saclay, Gustave Roussy, F-94805, Villejuif Cedex, France.

⁵Cell Death and Aging Team, INSERM U1030, Laboratory of Molecular Radiotherapy. University Paris-Sud and Gustave Roussy. F-94805 Villejuif, France.

⁶CNRS UMR8200 Sorbonne Universités, UPMC University, Paris, and Institut Gustave Roussy, F-94805 Villejuif, France.

⁷CNRS UMR8200, Laboratory of Genetic Instability and Oncogenesis. University Paris-Sud and Gustave Roussy. F-94805 Villejuif, France.

⁸Leibniz Institute on Aging-Fritz Lipmann Institute, Jena, Germany.

⁹Developmental Biology Program, Memorial Sloan Kettering Cancer Center, New York, NY, 10065, USA.

Running title

In vivo disruption of mammalian RAD51 functions

***Corresponding authors:**

Emmanuelle Martini: emmanuelle.martini@cea.fr; Bernard S. Lopez: bernard.lopez@inserm.fr

Abstract

Genetic instability is a hallmark of cancer and aging. Homologous recombination (HR) is a prominent pathway maintaining genomic integrity and mutations in many HR genes are associated with cancer predisposition. Paradoxically, although RAD51 is the pivotal HR actor, its inactivation is not associated with cancer susceptibility. To overcome the fact that RAD51 is an essential gene in mammals, we engineered a mouse model carrying an inducible dominant negative form of RAD51 (SMRAD51) that inhibits endogenous RAD51 activity and HR, without stimulating alternative mutagenic repair pathways. We found that *in vivo* functional inactivation of RAD51 shifts the balance toward premature aging rather than tumorigenesis. Exhaustion of proliferating progenitors, resulting from replication stress, can account for these phenotypes. Our data underline the importance of the RAD51 activity for progenitors' homeostasis and aging prevention. However, in contrast to its HR partners, disruption of RAD51 function, which induces genetic instability, does not initiate tumorigenesis.

Keywords: Homologous recombination, RAD51, genome instability, mouse model, cancer predisposition

Introduction

Genetic instability is a hallmark of cancer and aging¹⁻⁵. To maintain genomic stability, cells have developed a DNA damage response (DDR) that coordinates cell cycle progression and DNA repair. Defects in the DDR lead to genomic instability and, frequently, to cancer predisposition and premature aging. In particular, activation of the DDR, which is proposed to occur in response to endogenous replication stress, has been observed at the preceding/early stages of cancer and senescence⁶⁻⁸, suggesting that genetic instability represents an initial step of tumor formation. Aging and cancer are interrelated since age is considered a risk factor for cancer^{2,3}. However, the mechanisms underlying the balance between tissue degeneration *versus* cell transformation that drive aging *versus* cancer upon alteration of DNA repair pathways remain to be unraveled^{3,9,10}.

Homologous recombination (HR) is a highly evolutionarily conserved repair pathway that plays essential roles in genomic plasticity. HR is involved in the repair of DNA double-strand breaks (DSBs) and DNA interstrand crosslinks (ICLs); importantly, it is also involved in the protection of arrested replication forks and the resumption of replication^{11,12}. HR is initiated by resection of DNA ends mediated by MRE11/CtIP and BRCA1, which generate 3' single-stranded DNA (ssDNA) tails. These 3' ssDNA tails are first covered and protected by replication protein A (RPA). Then, BRCA2/PALB2 displace RPA and replace it with RAD51, forming an ssDNA-RAD51 filament. This filament promotes homology searching and the invasion of a homologous sequence to form recombination intermediates that will be subsequently resolved. RAD51 thus plays a pivotal role in HR at the critical step. Therefore, the ssDNA- RAD51 filament, which must be properly structured in order to exhibit its activity, is the active species of HR.

Because of its importance in genomic stability maintenance, HR is generally considered a tumor suppressor pathway. Consistent with this theory, many HR genes are altered in tumors. For example, inactivating mutations of BRCA1, BRCA2, PALB2 and RAD51 paralogs confer predisposition to familial breast and ovarian cancers^{13,14}. HR gene mutations have also been described in sporadic tumors¹⁵. Intriguingly, although RAD51 plays a pivotal role in HR, inactivating mutations of RAD51 have not been found to cause carcinogenesis, although extensive studies have been performed. On opposition, a RAD51 mutation (hRAD51.G151D) that increases HR has been found in a patient with breast cancer^{16,17}, and RAD51 has been found to be overexpressed in various tumor types, and histopathological analysis have associated RAD51 overexpression with a poor prognosis on patients¹⁸⁻²⁶. Additionally, many HR genes are mutated in Fanconi anemia (FA) syndrome, a rare autosomal recessive syndrome in which developmental defects are associated with malignancy²⁷⁻²⁹. These genes include BRCA1 (FA-S), BRCA2 (FA-D1), PALB2 (FA-N), RAD51C (FA-O) and RAD51 (FA-R). Remarkably, among patients with mutations in HR genes, only patients with the Rad51 mutation (FA-R) do not develop cancer³⁰⁻³². Therefore, compared to all its HR partners, RAD51 is an enigmatic paradox, especially given its central role in HR.

Most HR genes are essential; thus, their inactivation leads to embryonic lethality in mice^{33,34}, hindering investigation into the role of HR *in vivo* in mouse models. Nevertheless, elaborated

strategies for partial or tissue-specific HR inactivation have been designed and have confirmed the correlation with cancer development. However, despite the paramount role of RAD51 in HR, alternative strategies have surprisingly not been designed to analyze the impact of RAD51 functional disruption *in vivo* and thus to address the “RAD51 paradox”.

The DSB repair process proceeds in two steps: 1) competition between canonical nonhomologous end-joining (cNHEJ) and resection at broken ends and 2) competition between the conservative HR pathway and the nonconservative and highly mutagenic single-strand annealing (SSA) and alternative end-joining (A-EJ) pathways on resected ends^{35,36}. Consequently, silencing RAD51 or BRCA2, which leads to the absence of RAD51 on the resected DNA, results in stimulation of the nonconservative SSA and A-EJ repair pathways³⁷⁻³⁹. At the second step in the repair pathway choice, RAD51 prevents the mutagenic SSA and A-EJ pathways from proceeding not only by triggering HR but also through DNA occupancy by nonenzymatically impairing annealing of the complementary ssDNA³⁹. The fact that inactivation of the partners of RAD51 leads to the absence of RAD51 from ssDNA or to formation of an unstable ssDNA-RAD51 filament raises the question of whether the cancer predisposition resulting from RAD51 partners inactivation actually results from HR inhibition or from nonconservative SSA and A-EJ stimulation (or both) and whether this might account for the “RAD51 paradox”.

To address these questions *in vivo*, we took advantage of an engineered form of RAD51 (*SMRad51*) that enables inhibition of conservative HR without stimulation of the alternative nonconservative SSA and A-EJ repair pathways³⁹⁻⁴⁴, thus allowing to focus on the impact of HR inhibition itself. We engineered two mouse models with ubiquitous expression of *SMRad51* or of exogenous wild-type mouse *Rad51* (exMmRad51) under doxycycline (Dox) induction. This strategy enabled us to overcome the embryonic lethality problem, since HR was inactivated after birth through Dox-mediated induction of SMRAD51. Thus, our mouse model represents a unique tool to analyze RAD51 functional inactivation *in vivo*. Using this tool, we investigated whether inactivating RAD51-mediated HR, without affecting its binding to damaged DNA, leads to oncogenesis and/or aging. We found that suppression of HR through SMRAD51 expression led to replicative stress, systemic inflammation, progenitor exhaustion, premature aging and reduced lifespan. Remarkably, although *SMRad51* expression induced genetic instability, it did not induce tumor formation, thus accounting for the “RAD51 paradox”.

Although repair deficiency is generally proposed to be a cause of cancer, this work shows that specific RAD51-mediated HR impairment leads primarily to aging rather than oncogenesis. These data shed light on the separation and potential competition rather than the cooperation between these two phenotypes.

Results SMRAD51 suppresses HR by altering RAD51-ssDNA filament organization.

SMRad51 is a yeast/mammalian *Rad51* chimera gene (Fig. 1a) whose ectopic expression suppresses HR in mammalian cells but still prevents nonconservative SSA and A-EJ³⁹⁻⁴⁴, unlike suppression of RAD51 expression or loading. To analyze the consequences of specific suppression of the HR function of RAD51 *in vivo*, we developed two mouse models:

one bearing Dox-inducible *SMRad51* and one bearing Dox-inducible exogenous wild-type mouse *Rad51* (*exMmRad51*). Both models still expressed endogenous wild-type *Rad51* (Fig. 1b).

In mouse embryonic fibroblasts (MEFs) derived from our mouse models, *SMRad51* expression decreased homology-directed gene targeting efficacy, increased sensitivity to DNA-damaging agents, and increased genomic instability (supplementary data S1a-d). All these phenotypes indeed reflect HR deficiency. To further elucidate the molecular basis of the SMRAD51 dominant negative effect, we purified SMRAD51 and mouse wild-type MmRAD51 proteins and performed a displacement loop (D-loop) *in vitro* assay. Adding SMRAD51 to MmRAD51 inhibited its D-loop activity, accounting for the dominant negative effect (supplementary data S2a). Transmission electron microscopy (TEM) revealed that the SMRAD51 protein was able to coat DNA *in vitro* and that mixing wild-type MmRAD51 with the SMRAD51 protein resulted in improper organization of the RAD51-ssDNA filament structure (supplementary data S2b). These data indicate that SMRAD51 inhibits HR by interfering with the RAD51-ssDNA filament structure, therefore affecting strand exchange activity. Importantly, SMRAD51 formed radiation-induced nuclear foci with assembly/disassembly kinetics similar to those of exMmRAD51 as well as endogenous MmRAD51 (supplementary data S2c and S2d), confirming that SMRAD51 can bind damaged DNA and that it is processed similarly to wild-type endogenous MmRAD51 in living cells.

Collectively, these data show that SMRAD51 inhibits the strand invasion activity of the RAD51/ssDNA filament, which accounts for its dominant negative effect on HR, and that the consequences of SMRAD51 expression result from RAD51-ssDNA filament activity disruption rather than unscheduled prolonged DNA occupancy by the SMRAD51 protein.

***In vivo* suppression of RAD51-mediated HR leads to premature aging but not to carcinogenesis.**

To analyze the *in vivo* consequences of specific inhibition of RAD51- HR activity, we induced the expression of *SMRad51* and *exMmRad51* in *rtTA+;SMRad51+* and *rtTA+;exMmRad51+* mice, respectively. These mice were compared to Dox-exposed control littermates (*rtTA-;SMRad51+* and *rtTA- ;exMmRad51+*) that bore the transgenes but not the transcription activator *rtTA* and thus did not express the transgenes in the presence of Dox. We fed 3-month-old adult mice *ad libitum* with Dox-containing food (Fig. 1c). After approximately 6 weeks of Dox exposure, *SMRad51*, but not *exMmRad51*, mice started to show features of premature aging, including reduced activity, hair loss, intermittent priapism and abnormal posture with protuberance of the upper back (Fig. 1c; supplementary data Table S1). X-ray imaging by micro-computed tomography (μ CT) after 4 months of Dox treatment revealed that these back changes were associated with curvature of the spine, consistent with kyphosis (Fig. 1d, Video S1 and S2). Prolonged expression of *SMRad51*, but not *exMmRad51*, decreased both body weight and life span (Figs. 1e and 1f). Collectively, these phenotypes support the induction of premature aging in *SMRad51*-expressing mice but not in *exMmRad51*- expressing mice.

To evaluate tissue morphological modifications caused by *SMRad51* expression, we performed anatomical and histopathological analyses. After 6 months of Dox treatment, we observed testis size reductions (Fig. 1g) and splenomegaly, as shown by increased spleen sizes

(Fig. 1h). Splenomegaly is a feature of systemic inflammation and aging in mice⁴⁵. We then performed histopathological analyses of different tissues from mice fed a Dox-supplemented diet for 6 months (supplementary data S3a). These analyses revealed edematous alveolitis in the lungs of *SMRad51*-expressing mice (supplementary data S3b), consistent with induction of inflammation. Moreover, *SMRad51* expression decreased capillary bulb density and led to hyperplasia in the epidermis (Fig. 1i). Subcutaneous skin fat layer thickness was reduced in *SMRad51*-expressing mice compared to control mice (Fig. 1i). Similar phenotypes are observed in mice with skin-specific CRE-LOX-mediated inactivation of *Brca1*⁴⁶. Given that BRCA1 and RAD51 share roles in HR, this finding suggests that the phenotypes observed here actually resulted from HR inactivation *in vivo*. Notably, reductions in subcutaneous fat have been observed in aged and prematurely aged mice⁴⁷. The other tissues that we analyzed did not present major histological modifications (supplementary data S3a). Importantly, although HR defects generated genetic instability (see supplementary data S1d), tumors were not detected in any of our samples; only one mouse had a precancerous lesion in the skin (supplementary data S3a). Altogether, these data show that *SMRad51* expression leads to premature aging but not to increased tumorigenesis.

Since we observed morphological modifications associated with inflammation in several organs, we evaluated whether *SMRad51* expression leads to a systemic inflammatory response. We measured the levels of cytokines in the serum of *SMRad51* and control mice after three months of Dox exposure. Using cytokine arrays, we showed that among the 111 proteins analyzed, 29 were upregulated in *SMRad51* mice, most of which were proinflammatory factors (Fig. 2). These data show that functional disruption of RAD51 leads to a systemic inflammatory response in adult mice.

Suppression of RAD51-mediated HR alters progenitor homeostasis.

We observed the presence of hematopoietic cells in the spleens of *SMRad51* mice after 6 months of Dox exposure, revealing extramedullary hematopoiesis (supplementary data S4). Splenomegaly associated with extramedullary hematopoiesis is a common feature of aged and prematurely aged mice and is a compensatory mechanism triggered by bone marrow progenitor exhaustion^{45,48,49}.

Then, we investigated whether these changes in spleen histology were associated with alterations in hematopoiesis. First, we analyzed the blood composition of mice with and without *SMRad51* expression. The proportions of red blood cells (RBCs) and platelets (PLTs), but not those of white blood cells (WBCs), in the blood were decreased in *SMRad51* mice compared to controls after three months of Dox treatment (Fig. 3a). Next, we evaluated whether these changes correlated with hematopoietic changes in the bone marrow. Although *SMRad51* expression did not reduce the global content of bone marrow stem cells (Lineage [Lin]-Sca-1+-c-Kit+-Flk2- or LSK, Flk2-), it reduced the proportion of common lymphocyte progenitors (CLPs; Lin-Sca-1-c-Kit+IL7R+) and B-cells (B220+). These data indicate that *SMRAD51* alters hematopoiesis by diminishing the expansion of progenitor cells (Fig. 3b). Altogether, our data show that expression of *SMRad51* disrupts blood cell production, leading to thrombocytopenia (a reduction in PLTs) and anemia (a reduction in RBCs) associated with compromised hematopoiesis.

Progenitor exhaustion is a prime cause of aging³. Since SMRAD51 suppresses HR, which is a prime DNA damage repair pathway, we evaluated whether DNA damage and apoptosis were correlated with progenitor loss upon *SMRad51* expression. Double immunostaining for Ki67 (a progenitor marker) and γ H2AX (a DNA damage marker) showed an increase in DNA damage in capillary bulb progenitors in the skin of *SMRad51*-expressing mice after 3 months of Dox treatment (Fig. 3c). In addition, cleaved caspase-3 (cCasp3) staining revealed an increase in apoptosis of capillary bulb progenitors (Fig. 3d). The increases in DNA damage and apoptosis were also associated with reductions in the numbers of SOX9+ cells, the progenitors of hair follicles, in mice expressing *SMRad51* for 3 months (Fig. 3e). Taken together, these data support the idea that apoptosis triggered by chronic DNA damage is an underlying cause of progenitor loss in mice expressing *SMRad51*, thus accounting for the premature aging phenotypes.

Suppression of RAD51-mediated HR strongly compromises the viability of young growing mice.

While suppression of RAD51 activity did not lead to tumorigenesis in adult mice, we considered it possible that HR inactivation in young growing mice could be necessary for tumor development in adults. We therefore expressed SMRAD51 in young growing mice and observed that it induced phenotypes much more rapidly than in adult mice without induction of tumorigenesis. Expression of SMRAD51 resulted in growth arrest (scored on the basis of body weight), hair loss and death as soon as day 7 of Dox exposure in mice at postnatal days 12-14 (P12-P14) (Fig. 4a-d). In contrast, *exMmRad51* expression did not cause hair loss or affect body weight or mouse survival, even after prolonged Dox treatment for up to 3 weeks (Figs. 4a-d). The presence of the SMRAD51 protein was observed in several tissues (supplementary data S5a and S5b). Histopathological analysis of young mice that survived 12 days of *SMRad51* expression (from P12-14 to P24-26) revealed morphological alterations in highly proliferative tissues, such as the skin and testes (Figs. 5a, 5b and supplementary data S5B). In accordance with our data for adult mice, *SMRad51* expression in the skin led to capillary bulb atrophy, subcutaneous fat loss, and epidermal hyperplasia (Fig. 5b). Moreover, the bone marrow of *SMRad51*-expressing mice exhibited a decreased cell number (supplementary data S5c). More specifically, *SMRad51* expression decreased progenitor cell populations in highly proliferative tissues: SOX9+ cells in the skin (Fig. 5b), PLZF+ cells in the testis (Fig. 5d), and Lin- Sca-1+c-Kit+ (LSK) stem cells/progenitors in the bone marrow (Fig. 5e). Thus, in growing mice, SMRAD51 affects progenitor homeostasis in different highly proliferative tissues.

***In vivo* HR disruption induces inflammation in young growing mice.**

Histopathological analysis of the skin revealed the presence of inflammatory infiltrates after 12 days of *SMRad51* expression in growing mice (Fig. 5a). Immunolocalization analysis revealed an increase in T-lymphocyte infiltration (as indicated by CD3 staining; Fig. 6a) and monocyte/macrophage aggregates (as indicated by F4/80 staining) in skin samples (Fig. 6b). Real-time RT-PCR showed that SMRAD51 stimulated the expression of proinflammatory cytokines in the skin (Fig. 6c). Thus, *SMRad51* expression leads to a tissue inflammatory response *in vivo*. These data are consistent with the induction of systemic inflammation observed in adult mice (see Fig. 2). We next investigated whether *in vivo* expression of

SMRad51 also induces a systemic inflammatory response in young growing mice. No differences in the density of WBCs, RBCs or hemoglobin (HGB) were observed between SMRad51-expressing and control growing mice (7 days of Dox treatment) (Supplementary Fig. 6). However, in agreement with the observed induction of inflammation 50,51, *SMRad51* expression decreased B-lymphocyte numbers and increased monocyte numbers (Fig. 6). To further analyze the systemic effects of *SMRad51* expression, we performed a serum cytokine array analysis (Fig. 6e). Proinflammatory factors that were upregulated in the serum of SMRad51 adult mice, namely, Lipocalin-2/NGAL, CCL17/TARC, E-selectin/CD62A and CCL22/MDC, were also among the most upregulated factors in the serum of young mice (compare Fig. 6e and Fig. 2). These data show that *SMRad51* expression leads to a systemic proinflammatory response in both adult and growing mice.

SMRAD51 affects replication dynamics.

Our data suggest that replication dynamics might be corrupted in *SMRad51*-expressing cells given (i) the pronounced effect of *in vivo* *SMRad51* expression on proliferative tissues; (ii) the fact that growing mice, in which many tissues are proliferating, are more sensitive than adult mice; and (iii) the role of HR in arrested replication fork resumption. In addition, the connections between replication stress and inflammation that are now clearly established could account for the observed inflammation 52–55. Therefore, we evaluated the impact of SMRAD51 on replication dynamics in our mouse models.

In the primary MEFs, the expression of *SMRad51*, but not *exMmRad51*, increased the number of pCHK1 (S317) and γ H2AX foci, indicating spontaneous activation of the DDR in response to endogenous replication stress (Figs. 7a and 7b). Molecular combing revealed that SMRAD51, but not *exMmRAD51*, decreased the velocity of DNA replication and concomitantly increased the frequency of asymmetric labeling, indicating the accumulation of arrested replication forks (Figs. 7c-e). This finding suggested that resumption of replication at the arrested forks, which normally involves RAD51-mediated strand exchange activity for template switching, was defective. To analyze the impact of *SMRad51* expression on fork restart, we performed a DNA spreading analysis (Fig. 7f) after blocking replication with hydroxyurea (HU), a ribonucleotide reductase inhibitor that generates replication stress through nucleotide pool exhaustion. SMRAD51 decreased replication restart efficiency after HU release (Fig. 7f), consistent with the inhibition of strand exchange by SMRAD51 (see supplementary data S2a).

Replication stress often results in the accumulation of micronuclei. Consistent with the impact on replication stress shown above, *SMRad51* expression also led to an increase in the number of cells carrying micronuclei (Fig. 7g).

Taken together, the data demonstrate that SMRAD51 affects replication fork dynamics, resulting in replication stress in MEFs derived from our mouse model.

In vivo, as in adult mice (see Fig. 3), DNA damage (indicated by γ H2AX staining) and apoptosis (indicated by cCasp3 staining) accumulated in young growing mice in different tissues upon *SMRad51* expression (Figs. 7h, 7i and supplementary data S7A, S7B). To evaluate whether SMRAD51 activates the DDR specifically in replicating cells *in vivo*, we quantified γ H2AX foci in BrdU+ capillary bulb (Sox9+) progenitor cells in the skin of growing mice after 5 days of Dox

treatment. *SMRad51* expression increased the numbers of γ H2AX foci in BrdU+/Sox9+ (proliferating) cells (Fig. 7j), revealing that it induced replicative stress *in vivo*. Altogether, these data show that RAD51 is essential for progenitor homeostasis *in vivo* and that its functional inactivation leads to replication stress and apoptosis, resulting in progenitor exhaustion in highly proliferative tissues and accounting for premature aging due to defective tissue renewal.

Discussion

Here, the expression of the RAD51 dominant negative form SMRAD51 was found to induce premature aging and reduce lifespan without increasing tumor prevalence in mice. This finding suggests that *in vivo*, functional inactivation of RAD51, which suppresses HR, shifts the equilibrium of aging *versus* cancer towards aging, which does not favor tumorigenesis, accounting for the “Rad51 paradox”.

To circumvent limitations in modeling due to the fact that most HR genes are essential, we took advantage of a dominant negative form of RAD51, SMRAD51, that we previously designed. Expression of SMRAD51 results in HR inhibition but without stimulation of the nonconservative repair mechanisms SSA and A-EJ, thus enabling us to focus on the impact of HR inhibition *in vivo*^{39–44}. Here, we also further characterized the molecular mechanisms of HR inhibition by SMRAD51 (supplementary data S1 and S2). RAD51 promotes the central step of HR through homology searching and strand exchange with an intact DNA partner. This activity requires a well-ordered RAD51-ssDNA filament, which is thus the active species of HR. We show that by altering the structure of the RAD51-ssDNA filament, SMRAD51 inhibits RAD51 strand invasion activity, ultimately inhibiting HR in a dominant negative way. In our mouse model, we showed that SMRAD51 suppresses HR and generates replication stress, genomic instability, and systemic inflammation, ultimately resulting in premature aging. Consistent with the induction of replication stress, proliferating tissues and progenitors (which are replicating) are particularly affected. This should lead to progenitor pool exhaustion that hampers tissue renewal, thus leading to accelerated aging. Additionally, other systemic effects, such as inflammation, can aggravate the aging phenotype (Fig. 8). Collectively, the associations of defects in different tissues with inflammation can account for the reduced lifespan upon disruption of RAD51 function *in vivo*. Of note, these defects more strikingly affect young mice than adult mice, as most cells are dividing, and thus replicating the genome, in young mice.

According to the intrauterine programming model, developmental issues generated by replication stress during embryogenesis are the underlying cause of tissue degeneration and malfunction that results in a premature aging-like phenotype in adulthood^{56,57}. Here, functional inactivation of RAD51 was performed in adults but still resulted in premature aging phenotypes. Therefore, the intrauterine programming model cannot account for the phenotypes observed in the current study. Instead, our results are consistent with data showing that genetic inactivation of the replicative stress response factor *Atr* leads to premature aging in adult mice⁵⁸.

Importantly, although SMRAD51 expression generated genetic instability, it did not favor tumorigenesis in the current study. Thus, our mouse model portrays the “RAD51 paradox” of human cancer. More precisely, our data indicate that inhibition of RAD51 strand

exchange activity itself does not confer cancer predisposition. A simple hypothesis is that mice with premature aging cannot support tumor development and die before tumors develop. A second hypothesis is that functional inactivation of RAD51 directly prevents the expansion of transformed cells. Indeed, transformed cells are highly proliferative, and RAD51 functional inactivation preferentially affects highly proliferative cells. Testing these hypotheses will be an exciting challenge for future studies.

The binding of RAD51 to ssDNA not only triggers HR but also prevents nonconservative DSB repair pathways such as SSA and A-EJ³⁹, thus preventing genetic instability resulting from these nonconservative repair processes. On the other hand, failure of RAD51 loading onto ssDNA (due to, for example, defective BRCA2 or PALB2) not only decreases HR efficiency but also stimulates the alternative repair pathways in parallel^{37–39}. Interestingly, mutations affecting factors that favor RAD51 loading onto ssDNA, such as BRCA1, BRCA2 and PALB2, confer cancer predisposition; in contrast, expression of SMRAD51, which is loaded onto ssDNA but cannot stimulate HR, while it still represses nonconservative repair, does not induce tumorigenesis. Therefore, we hypothesize that tumorigenesis is favored by the inhibition of HR associated with stimulation of mutagenic alternative pathways that rescue part of viability, but increase genome instability, whereas abolition of HR alone leads to accelerated aging (Fig. 8). Since SMRAD51 expression generated genetic instability, our data also provide evidence that genetic instability can be disconnected from oncogenesis and that HR alteration alone can be not sufficient *per se* to be protumorigenic.

Materials and methods

Mice

exMmRad51 (HA-tagged *Mus musculus Rad51*)- and *SMRad51*-containing mice were generated using the following strategy. *ExMmRad51* and *SMRad51* were derived from previously developed plasmid constructs⁴². Both transgenes were subcloned from a pcDNA3.1-puro plasmid containing *exMmRad51* and *SMRad51* to a pBI-4 plasmid containing the *tet* operators. The vectors were then linearized and electroporated into ES cells (129/SVEV). The clones were selected using puromycin and injected into blastocysts to enable germline transmission. For generation of the *rtTA* mouse line, mice containing the *lox-stop-lox rtTA-EGFP* transgene (B6.Cg- Gt(ROSA)26SorTM1(*rtTA*,EGFP)Nagy/J) were mated with *Vasa-Cre* mice (FVB-Tg(Ddx4- cre)1Dcas/J) to obtain mice that constitutively expressed *rtTA* (these mice were therefore called *rtTA* mice). Littermates obtained from crosses of *SMRad51* (*rtTA*;*SMRad51*) mice with control (*SMRad51*) mice or *exMmRad51* (*rtTA*;*ExMmRad51*) mice with control (*exMmRad51*) mice were used for experimental analysis.

All mice were kept in a mixed genetic background. In young growing mice, *in vivo* transgene expression was induced by intraperitoneal injections of Dox diluted in PBS (5 µg/g, Sigma #D9891) on Monday, Wednesday and/or Friday. In adult mice, *in vivo* transgene expression was induced by *ad libitum* feeding of a diet with 625 mg/kg Dox (Sigma #D9891). All mice used as controls were treated with Dox.

The experimental procedures with animals were performed in accordance with French government regulations (Services Vétérinaires de la Santé et de la Production Animale, Ministère de l'Agriculture).

Histology

Whole tissues or biopsies were fixed in 4% PFA immediately after dissection. The fixed tissues were then dehydrated and embedded in paraffin using a Tissue-Tek tissue machine (Sakura). The paraffin blocks were sectioned (5 μ m) and placed on slides. Before staining, the sections were dewaxed and rehydrated. Pathological analyses were performed on hematoxylin (Path #10047105)-, eosin (Path #10047001)- and alcoholic saffron (Path #10047028)-stained sections of at least three different mice. Colorimetric images were captured using an Olympus BX51 microscope.

Immunohistochemistry and immunofluorescence

For tissue immunostaining, the slides were washed with PBS, and antigen retrieval was performed using citrate buffer (pH=6). Antibodies were diluted in blocking buffer (5% NDS, 1% BSA and 0.1% Triton). For cultured cell immunostaining, cells were grown on glass coverslips and fixed with 4% PFA for 10 minutes at room temperature. The cells were then washed with PBS, permeabilized with 0.2% Triton and blocked with 1% BSA for 30 minutes. Primary antibodies were diluted in 1% BSA for immunostaining of cultured cells. The samples were incubated with the following primary antibodies overnight at 4°C: anti-SMRAD51 (directed against yeast N-terminal rad51) (1:100, Santa Cruz Biotechnology #SC33626), anti-Ki67 (1:100, BD Biosciences #556003), anti-SOX9 (1:100, Abcam #AB5535), anti- γ H2AX (1:1,000, Bethyl #A300-081), anti- γ H2AX (1:100, Millipore #05-636), anti-pCHK1 (S317) (1:100, Cell Signaling Technology #2344), anti-BrdU (1:100, Bio-Rad #OBT0030G), anti-PLZF (1:50, Santa Cruz #SC22839), anti-cCasp3 (1:100, Cell Signaling Technology #9661S) and anti-HA (1:200, Santa Cruz #7392). For immunofluorescence, the samples were incubated with Alexa-conjugated secondary antibodies for 2 h at room temperature, and the slides were mounted with DAPI ProLong Gold (Thermo Fisher #P36931). For immunohistochemistry, the slides were incubated for 30 minutes with HRP-conjugated secondary antibodies, and the staining was then revealed with DAB (Vector #SK4100). Fluorescence images were captured using a Nikon Eclipse Ti2 microscope, and colorimetric images were captured using an Olympus BX51 microscope. To label S-phase cells *in vivo*, we performed intraperitoneal BrdU injection (50 μ g/g of body weight) (Sigma Aldrich #B5002). Samples were collected 1 h after injection for analysis.

Blood and bone marrow analysis

Bone marrow cells from the femur and tibia were flushed with PBS. After hemolysis of blood or bone marrow samples, the cells were counted using an Abbott Cell Dyn 3700 machine. The cells were then labeled using the following antibodies: anti-Lin⁺ (MACS), anti-c-Kit (BioLegend), anti-Sca1 (Thermo Fisher), anti-IL7R (BD Bioscience), anti-CD3 (BioLegend), anti-B220 (Thermo Fisher), anti-Gr1 (BioLegend), and anti-FLK2 (Thermo Fisher). Data acquisition was performed on a FACSCanto II (BD Biosciences), and the data were analyzed with FlowJo software.

MEFs

MEFs were isolated from embryonic day 12.5 (E12.5) embryos and immortalized with SV40 (Addgene plasmid #21826). Primary MEFs were used up to passage 4. Immortalized MEFs

(iMEFs) and primary MEFs were cultured in DMEM (Gibco #41965-039) supplemented with 10% tetracycline-free FBS (Takara #631107) and penicillin-streptomycin (Gibco #15140122).

Colony formation assay

For a colony formation assay, one hundred exMmRad51 or SMRad51 iMEFs were plated per well in 6-well plates. After 24 h, the cells were treated or not treated with 10 µg/mL doxycycline, and 24 h later, the cells were treated or not with mitomycin C (MMC; Roche #10107409001) or olaparib (Selleckchem #S1060) for 10 days. The clones were stained with crystal violet and counted.

Homology-dependent gene targeting assay

The gene targeting procedure was derived from 59. This protocol consists of replacing the second exon of the 53BP1 gene with a hygromycin resistance (Hyg+) gene using a homology-dependent donor plasmid (here called pDonor) after Cas9-mediated production of a DNA DSB. A total of 300,000 cells were resuspended in 100 µL of nucleofection buffer (Lonza #VCA-1003) containing 1 µg of pCas9 and 2 µg of pDonor with or without 1 µg of pgRNA1 or pgRNA2. The cells were nucleofected using Amaxa (Lonza) protocol T30. Immediately after nucleofection, 500 µL of medium was added, and the cells were plated on a 10 mm petri dish. After 48 h, the targeted clones (Hyg+) were selected for 10 days with medium containing hygromycin that was renewed every 48 h. The clones were stained with crystal violet and counted.

RNA extraction, cDNA synthesis and real-time RT-PCR

RNA was extracted from skin biopsies (~1 cm²) taken from the upper backs of mice (Qiagen #74106). Each RNA sample was collected in 40 µL of ultrapure water (Thermo Fisher #10977). The RNA concentration and purity were determined using a NanoDrop spectrophotometer (Eppendorf). The RNA integrity was analyzed by 1% agarose gel electrophoresis. cDNA was generated using a high-capacity cDNA synthesis kit (Thermo Fisher #4368814) following the manufacturer's instructions.

We used 384-well optical plates to perform real-time RT-PCR using an Applied Biosystems 7900HT Fast Real-Time PCR System thermocycler. The primer sequences used for real-time RT-PCR are shown in Table S2. The real-time RT-PCR mix included 6.25 µL of 2× SYBR Green mix, 2 µL of diluted cDNA (1:10), 0.25 µL (5 µM) of each primer and 4.25 µL of ultrapure water (Gibco #10977). The cycling conditions included 50°C for 2 minutes, 95°C for 10 minutes and 40 cycles of 95°C for 15 s and 60°C for 60 s. The delta-delta Ct (2- $\Delta\Delta$ Ct) method was used to determine the relative quantities of the target genes compared to the reference genes. We used the average of the two reference genes (*Gapdh* and *β -actin*) as the final reference.

Cytokine array

For protein array analysis, approximately 150 µL of blood serum containing protease inhibitors (Thermo Fisher #78438) was used. The serum was stored at -80°C until analysis. Samples from two mice of each genotype (Ctrl or SMRad51) that had been fed a Dox-containing diet for 3 months were used. A Proteome Profiler Mouse XL Cytokine Array Kit (R&D Systems #ARY028) was used following the manufacturer's instructions. In Table S3 (adult

mice) and Table S4 (young growing mice), we present the results of densitometry analysis and the comparisons.

Replication dynamics analysis

For a DNA spreading assay, replicating DNA in immortalized MEFs was labeled using 50 μM CldU and 50 μM IdU for 20 minutes each. Cells were then harvested and resuspended in cold PBS. DNA spreads were performed using 1×10^3 cells. To extend DNA fibers, 2 μL of cells were incubated for 3 minutes with 7 μL of lysis buffer (0.5% SDS, 50 mM EDTA, 200 mM Tris-HCl) in the upper parts of microscope slides. To generate single-DNA-molecule spreads, the slides were turned at a 15° angle, which allowed the genomic DNA to spread by gravity. The DNA fibers were then fixed in methanol and acetic acid (3:1) and stored at 4°C .

For molecular combing, a single assay was performed as previously described⁶⁰. Briefly, primary MEFs were incubated or not incubated with Dox for 48 h and pulse-labeled with IdU for 20 minutes and then with CldU for 20 minutes. The cells were collected, and the DNA fibers were purified by enzymatic protein digestion in agarose blocks and subsequently stretched at a rate of 2 kb/ μm on silanized coverslips⁶⁰. Immunofluorescence detection for the DNA combing and DNA spreading experiments was performed with the following antibodies, in order: (1) mouse anti- BrdU (BD Biosciences #347583) and rat anti-BrdU (AbD Serotec #OBT 0030), (2) A488-conjugated goat anti-mouse (Invitrogen #A11029) and A555-conjugated goat anti-rat (Abcam #A21434), (3) mouse anti-ssDNA (Millipore #MAB3034), (4) Cy5.5- conjugated goat anti-mouse (Abcam #ab6947) and (5) Cy5.5-conjugated donkey anti- goat (Abcam #ab6951). Fluorescence images were acquired using an epifluorescence microscope (AxioImager Z2; Carl Zeiss). MetaMorph software (Roper Scientific) was used to acquire images and to build a large-scale mosaic of up to 100 images. This technique theoretically enabled us to recover long fibers up to approximately 3 Mb in length. We systematically used ssDNA staining to ensure that the replication signals belonged to the same fiber.

Western blot analysis

Proteins were extracted using RIPA buffer (Thermo Fisher #89900) supplemented with phosphatase inhibitors (Thermo Fisher #P0044 and #P5726) and a protease inhibitor (Thermo Fisher #78438). After SDS-PAGE protein separation, the proteins were transferred to a nitrocellulose membranes overnight at 30 V and 4°C . The membranes were incubated with the following primary antibodies, which were diluted in 5% milk prior to incubation: anti-RAD51 (1:1,000, Millipore #PC130), anti-STAT1 (1:10,000, Cell Signaling Technology #9164), anti-pSTAT1 (Tyr701) (1:10,000, Cell Signaling Technology #14994), anti-VINCULIN (1:10,000, Abcam #AB18058) and anti-HA (1:1,000, BioLegend #MMS-101R). HRP-conjugated secondary antibodies were purchased from Thermo Fisher (1:10000, anti-mouse IgG, #31430, anti-rabbit IgG, #31460). A Pierce (Thermo Fisher #32106) or Luminata (Thermo Fisher #WBLUF0500) ECL system was used according to the manufacturer's instructions, and chemiluminescence was captured using an Amersham Imager 600 (GE Life Sciences).

Protein purification

Previously generated pcDNA3.1-MmRad51 and pcDNA3.1-SMRad51 constructs⁴² encoding sequences were subcloned into a pCDF-His-SUMO backbone using a complementary

single-strand annealing-based method. His-SUMO-MmRAD51 and his-SUMO-SMRAD51 were both expressed in the *E. coli* strain BRL(DE3)pLysS. All of the protein purification steps were carried out at 4°C. Protein expression was induced in 3 L of cell culture medium with 0.5 mM isopropyl-1-thio- β -D- galactopyranoside overnight at 20°C, after which the cells were resuspended in PBS with 350 mM NaCl, 20 mM imidazole, 10% glycerol, 0.5 mg/mL lysozyme, complete protease inhibitor (Roche), and 1 mM 4-(2-aminoethyl)benzenesulfonyl fluoride (AEBSF). Then, the cells were lysed by sonication, and the insoluble material was removed by centrifugation at 150,000 $\times g$ for 1 h. The supernatant was incubated with 5 mL of Ni-NTA resin (Qiagen) for 2 h. The mixture was poured into an Econo-Column Chromatography Column (Bio-Rad), and the beads were washed with 80 mL of W1 buffer (20 mM Tris HCl pH 8, 500 mM NaCl, 20 mM imidazole, 10% glycerol, 0.5% NP40) followed by 80 mL of W2 buffer (20 mM Tris HCl pH 8, 100 mM NaCl, 20 mM imidazole, 10% glycerol, 1 mM DTT). His-SUMO-tagged proteins bound to the beads were then resuspended in 8 mL of W2 buffer and incubated with SUMO protease at a ratio of 1/80 (w/w) for 16 h. The proteins in which the His-SUMO tag was cleaved were then recovered in the flowthrough and directly loaded onto a HiTrap heparin column (GE Healthcare). The column was washed with W2 buffer, and then a 0.1-1 M NaCl gradient was applied. Fractions containing purified proteins were dialyzed against storage buffer (20 mM Tris HCl pH 8, 50 mM KCl, 0.5 mM EDTA, 10% glycerol, 1 mM DTT, 0.5 mM AEBSF), aliquoted and stored at -80°C. The concentrations of purified MmRad51 and SMRad51 were calculated using extinction coefficients of $1.664 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ and $1.813 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ at 280 nm, respectively.

D-Loop assay

For the D-loop assay, 0.2 μM molecules (36 μM nt) of a 5' junction DNA with a single-stranded overhang labeled with the Cy5 fluorophore were incubated with MmRAD51, SMRAD51 or both at a final concentration of 12 μM (1 protein per 3 nt) for 5 minutes at 37°C. RPA was then added to a final concentration of 0.6 μM (1 protein per 60 nt) over a span of 10 minutes in buffer containing 10 mM Tris-HCl (pH 8), 50 mM sodium chloride, 2 mM calcium chloride, 1 mM DTT and 1.5 mM ATP. Then, a homologous double-stranded DNA (dsDNA) pUC19 plasmid (purchased from New England Biolabs) was added to the reaction at a concentration of 30 nM molecules in a final volume of 10 μL over a span of 30 minutes. The total reaction was stopped by the addition of 1% SDS (w/v) plus 25 mM EDTA and deproteinized (by 30 minutes of incubation at 37°C with 2 mg/mL proteinase K). The samples were run in a 1% (w/v) agarose gel at 80 V for 45 minutes in 0.5 \times TAE buffer. Fluorolabeled DNA species were visualized by using a Typhoon FLA 9500 (GE Healthcare Life Sciences).

TEM analysis of RAD51 filaments

RAD51 presynaptic filaments were assembled on a 5' DNA junction with a single-stranded overhang (the construction of which has been described in (61)) using MmRAD51, SMRAD51 or a mix of both, as follows: 0.2 μM (36 μM nt) of 5' junction DNA molecules were incubated with MmRAD51, SMRAD51 or both at a final concentration of 12 μM (1 protein per 3 nt) for 5 minutes at 37°C. RPA was then added to a final concentration of 0.6 μM (1 protein per 60 nt) over a span of 10 minutes in buffer containing 10 mM Tris-HCl (pH 8), 50 mM sodium chloride, 2 mM calcium chloride, 1 mM DTT and 1.5 mM ATP. The reactions were quickly

diluted 25× in water, and a 5 µL drop was deposited on a 600-mesh copper grid previously covered with a thin carbon film and activated with pentylamine by glow discharge using a Dubochet device. Each grid was rinsed, positively stained with aqueous 2% (w/v) uranyl acetate, dried carefully with filter paper and observed in annular dark-field mode using a Zeiss 902 transmission electron microscope. Images were captured at a magnification of 85,000× with a MegaViewIII charge-coupled device (CCD) camera and analyzed with iTEM software (Olympus Soft Imaging Solution).

Whole-exome sequencing

Whole-exome sequencing was performed and analyzed with the genomic and bioinformatics platforms of the Institute Gustave Roussy. SMRad51 and control primary MEFs were treated or not treated with 10 µg/mL Dox for 6 days. DNA extraction and purification were performed via a standard phenol-chloroform method and RNase treatment. DNA quality was estimated with a Bioanalyzer (Agilent). Two hundred nanograms of genomic DNA was sheared with the Covaris S220 system to obtain a 150-base Gaussian distribution using a peak power of 140, a duty factor of 10, and a cycle/burst setting of 200 (LGC Genomics/KBioscience). DNA fragments were end-repaired, extended with an 'A' base on the 3' end, ligated with paired-end adaptors with the Bravo Platform (Agilent) and amplified. Adaptor-ligated libraries were hybridized for 40 h with biotinylated oligo RNA baits using murine SureSelect capture probes (Agilent) and enriched with streptavidin-conjugated magnetic beads. The final libraries were indexed, quantified by real-time RT-PCR, pooled and sequenced using the default cluster method in paired-end sequencing mode (2×100 bp reads) on an Illumina NovaSeq 6000 sequencer. The mean depth in the targeted regions was 110× for all samples. The reads were mapped to the reference genome mm10 using the Burrows–Wheeler Aligner (BWA) alignment tool version 0.7.10. PCR duplicates were removed using SAMtools version 1.9. Local realignment around indels and base quality score recalibration were performed using the Genome Analysis Tool Kit (GATK) 3.7. Somatic single-nucleotide variations (SNVs) and indels were called using VarScan (v2.3.9). Variants were adopted as candidate mutations when the somatic P value was <0.001 and when the allele frequency was <0.01 in the reference sample and >0.01 in the treated sample. Additionally, variants with a read depth less than 50 in both reference and treated samples were filtered out. The variants were annotated with ANNOVAR version 20180416. We excluded SV129 strain-specific polymorphisms using the results from the Mouse Genomes Project release v5: REL-1505-SNPs_Indels. Structural rearrangements were identified using Manta version 1.5.0 in exome mode with the default parameters. Variations greater than 500 bp were considered structural rearrangements. A summary of the data is presented in Table S5. A graphical representation of exome sequencing was created using the BioCircos R package. The whole-exome sequencing ArrayExpress accession number is E-MTAB-8625.

Statistical analysis

GraphPad Prism software was used for statistical analysis. One- or two-way ANOVA was performed as indicated. The p-values are based on two-sided tests.

Acknowledgments

We thank George Garinis for helpful and stimulating discussion and Didier Busso and Xavier Veaute from the CIGEX (CEA, Fontenay aux Roses) for providing us the purified SMRAD51 and MmRAD51 proteins. We acknowledge Life Science Editors for editorial assistance.

Funding

This work was supported by grants from the Ligue Nationale contre le cancer “Equipe labellisée”, ANR (Agence Nationale de la Recherche, ANR-16-CE12-0011-02, and ANR-16-CE18-0012-02), AFM-Téléthon and INCa (Institut National du Cancer, PLBIO18-232). GMR was supported by a fellowship from “La Ligue nationale contre le Cancer”.

Author contributions

Conceptualization: EM, BSL; Funding acquisition: BSL, PK, PD, ELC, J-L P, P-H R, MD, GL; Investigation: GMR, VB, MAA, AA, SK, DL, ED, JGB, LF, PD, and EM; Methodology: GMR, EM, BSL, SK, DL, ED, PD, ELC, J-LP, P-HR, MD, MJ; Project administration: EM, BSL; Resources: ELC, J-LP, P-HR, MD, GL, MJ, BSL; Supervision: EM, BSL; Validation: SK, DL, ED, LF, PD, ELC, J-LP, P-HR, EM, BSL; Visualization: JG-B, WY, EB, LD, BSL; Writing original draft: GMR, EM, BS. Writing – review & editing: All authors.

Competing interests:

Authors declare no competing interests

Data and materials availability:

Whole exome sequencing ArrayExpress accession number: E-MTAB-8625. Requests for materials and correspondence should be addressed to Emmanuelle Martini or Bernard Lopez.

References.

1. Negrini, S., Gorgoulis, V. G. & Halazonetis, T. D. Genomic instability--an evolving hallmark of cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol* **11**, 220–228 (2010).
2. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell* **144**, 646–674 (2011).
3. López-Otín, C., Blasco, M. A., Partridge, L., Serrano, M. & Kroemer, G. The hallmarks of aging. *Cell* **153**, 1194 (2013).
4. Garinis, G. A., van der Horst, G. T., Vijg, J. & Hoeijmakers, J. H. DNA damage and ageing: new-age ideas for an age-old problem. *Nat Cell Biol* **10**, 1241–1247 (2008).
5. Hoeijmakers, J. H. DNA damage, aging, and cancer. *N Engl J Med* **361**, 1475–1485 (2009).
6. Bartkova, J. *et al.* DNA damage response as a candidate anti-cancer barrier in early human tumorigenesis. *Nature* **434**, 864–870 (2005).
7. Gorgoulis, V. G. *et al.* Activation of the DNA damage checkpoint and genomic instability in human precancerous lesions. *Nature* **434**, 907–913 (2005).
8. Bartkova, J. *et al.* Oncogene-induced senescence is part of the tumorigenesis barrier imposed by DNA damage checkpoints. *Nature* **444**, 633–637 (2006).
9. Petr, M. A., Tulika, T., Carmona-Marin, L. M. & Scheibye-Knudsen, M. Protecting the Aging Genome. *Trends in Cell Biology* **30**, 117–132 (2020).
10. Tubbs, A. & Nussenzweig, A. Endogenous DNA Damage as a Source of Genomic Instability in Cancer. *Cell* **168**, 644–656 (2017).
11. Haber, J. E. *Genome Stability: DNA repair and recombination*. (Garland Science, 2014).
12. Feng, W. & Jasin, M. Homologous Recombination and Replication Fork Protection: BRCA2 and More! *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **82**, 329–338 (2017).
13. Walsh, T. *et al.* Mutations in 12 genes for inherited ovarian, fallopian tube, and peritoneal carcinoma identified by massively parallel sequencing. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**, 18032–7 (2011).
14. Chen, C.-C., Feng, W., Lim, P. X., Kass, E. M. & Jasin, M. Homology-Directed Repair and the Role of BRCA1, BRCA2, and Related Proteins in Genome Integrity and Cancer. *Annu. Rev. Cancer Biol.* **2**, 313–336 (2018).
15. Lord, C. J. & Ashworth, A. BRCAness revisited. *Nat. Rev. Cancer* (2016). doi:10.1038/nrc.2015.21
16. Chen, J. *et al.* Tumor-associated mutations in a conserved structural motif alter physical and biochemical properties of human RAD51 recombinase. *Nucleic Acids Res.* (2015). doi:10.1093/nar/gku1337
17. Marsden, C. G. *et al.* The Tumor-Associated Variant RAD51 G151D Induces a Hyper-Recombination Phenotype. *PLoS Genet.* **12**, (2016).
18. Tennstedt, P. *et al.* RAD51 overexpression is a negative prognostic marker for 32 colorectal adenocarcinoma. *Int. J. Cancer* **132**, 2118–2126 (2013).
19. Maacke, H. *et al.* DNA repair and recombination factor Rad51 is over-expressed in human pancreatic adenocarcinoma. *Oncogene* **19**, 2791–2795 (2000).

20. Maacke, H. *et al.* Over-expression of wild-type Rad51 correlates with histological grading of invasive ductal breast cancer. *Int. J. Cancer* (2000). doi:10.1002/1097-0215(20001215)88:6<907::AID-IJC11>3.0.CO;2-4
21. Qiao, G. B. *et al.* High-level expression of Rad51 is an independent prognostic marker of survival in non-small-cell lung cancer patients. *Br. J. Cancer* (2005). doi:10.1038/sj.bjc.6602665
22. Söderlund, K., Skoog, L., Fornander, T. & Askmalm, M. S. The BRCA1/BRCA2/Rad51 complex is a prognostic and predictive factor in early breast cancer. *Radiother. Oncol.* (2007). doi:10.1016/j.radonc.2007.06.012
23. Welsh, J. W. *et al.* Rad51 Protein Expression and Survival in Patients with Glioblastoma Multiforme. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* (2009). doi:10.1016/j.ijrobp.2009.03.018
24. Li, Y. *et al.* Elevated expression of Rad51 is correlated with decreased survival in resectable esophageal squamous cell carcinoma. *J. Surg. Oncol.* (2011). doi:10.1002/jso.22018
25. Mijic, S. *et al.* Replication fork reversal triggers fork degradation in BRCA2- defective cells. *Nat. Commun.* **8**, (2017).
26. Nagathihalli, N. S. & Nagaraju, G. RAD51 as a potential biomarker and therapeutic target for pancreatic cancer. *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer* (2011). doi:10.1016/j.bbcan.2011.07.004
27. Walden, H. & Deans, A. J. The Fanconi anemia DNA repair pathway: structural and functional insights into a complex disorder. *Annu. Rev. Biophys.* **43**, 257–78 (2014).
28. Kennedy, R. D. & D’Andrea, A. D. The Fanconi Anemia/BRCA pathway: new faces in the crowd. *Genes Dev* **19**, 2925–2940 (2005).
29. Auerbach, A. D. Fanconi anemia and its diagnosis. *Mutat Res* **668**, 4–10 (2009).
30. Ameziane, N. *et al.* A novel Fanconi anaemia subtype associated with a dominant-negative mutation in RAD51. *Nat. Commun.* **6**, 8829 (2015).
31. Takenaka, S. *et al.* A Japanese patient with RAD51-associated Fanconi anemia. *Am. J. Med. Genet. Part A* **179**, 900–902 (2019).
32. Wang, A. T. *et al.* A Dominant Mutation in Human RAD51 Reveals Its Function in DNA Interstrand Crosslink Repair Independent of Homologous Recombination. *Mol. Cell* **59**, 478–490 (2015).
33. Evers, B. & Jonkers, J. Mouse models of BRCA1 and BRCA2 deficiency: past lessons, current understanding and future prospects. *Oncogene* **25**, 5885–97 (2006).
34. Tsuzuki, T. *et al.* Targeted disruption of the Rad51 gene leads to lethality in embryonic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 6236–6240 (1996).
35. Rass, E. *et al.* Role of Mre11 in chromosomal nonhomologous end joining in 33 mammalian cells. *Nat Struct Mol Biol* **16**, 819–824 (2009).
36. Betermier, M., Bertrand, P. & Lopez, B. S. Is non-homologous end-joining really an inherently error-prone process? *PLoS Genet* **10**, e1004086 (2014).
37. Ahrabi, S. *et al.* A role for human homologous recombination factors in suppressing microhomology-mediated end joining. *Nucleic Acids Res.* **44**, 5743– 5757 (2016).

38. Han, J. *et al.* BRCA2 antagonizes classical and alternative nonhomologous end- joining to prevent gross genomic instability. *Nat. Commun.* **8**, (2017).
39. Ayeong, S. *et al.* Mammalian RAD51 prevents non-conservative alternative end- joining and single strand annealing through non-catalytic mechanisms. *bioRxiv* (2019). doi:<https://doi.org/10.1101/768887>
40. Lambert, S. & Lopez, B. S. Role of RAD51 in sister-chromatid exchanges in mammalian cells. *Oncogene* **20**, 6627-6631. (2001).
41. Lambert, S. & Lopez, B. S. Inactivation of the RAD51 recombination pathway stimulates UV-induced mutagenesis in mammalian cells. *Oncogene* **21**, 4065–4069 (2002).
42. Lambert, S. & Lopez, B. S. Characterization of mammalian RAD51 double strand break repair using non lethal dominant negative forms. *EMBO J.* **19**, 3090–3099 (2000).
43. Wilhelm, T. *et al.* Spontaneous slow replication fork progression elicits mitosis alterations in homologous recombination-deficient mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **111**, (2014).
44. Wilhelm, T. *et al.* Slow Replication Fork Velocity of Homologous Recombination-Defective Cells Results from Endogenous Oxidative Stress. *PLoS Genet.* **12**, (2016).
45. Pettan-Brewer, C. & M. Treuting, P. Practical pathology of aging mice. *Pathobiol. Aging Age-related Dis.* **1**, 7202 (2011).
46. Sotiropoulou, P. A. *et al.* Brca1 deficiency in skin epidermis leads to selective loss of hair follicle stem cells and their progeny. *Genes Dev.* **27**, 39–51 (2013).
47. Muñoz-Lorente, M. A., Cano-Martin, A. C. & Blasco, M. A. Mice with hyper-long telomeres show less metabolic aging and longer lifespans. *Nat. Commun.* (2019). doi:[10.1038/s41467-019-12664-x](https://doi.org/10.1038/s41467-019-12664-x)
48. French, R. A. *et al.* Age-associated loss of bone marrow hematopoietic cells is reversed by GH and accompanies thymic reconstitution. *Endocrinology* (2002). doi:[10.1210/endo.143.2.8612](https://doi.org/10.1210/endo.143.2.8612)
49. Mann, M. *et al.* Heterogeneous Responses of Hematopoietic Stem Cells to Inflammatory Stimuli Are Altered with Age. *Cell Rep.* (2018). doi:[10.1016/j.celrep.2018.11.056](https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.11.056)
50. Cain, D., Kondo, M., Chen, H. & Kelsoe, G. Effects of acute and chronic inflammation on B-cell development and differentiation. *J. Invest. Dermatol.* **129**, 266–277 (2009).
51. Shi, C. & Pamer, E. G. Monocyte recruitment during infection and inflammation. *Nat. Rev. Immunol.* **11**, 762–774 (2011).
52. Gasser, S. *et al.* Sensing of dangerous DNA. *Mechanisms of Ageing and Development* **165**, 33–46 (2017).
53. Gekara, N. O. DNA damage-induced immune response: Micronuclei provide key platform. *Journal of Cell Biology* **216**, 2999–3001 (2017).
54. Coquel, F., Neumayer, C., Lin, Y. L. & Pasero, P. SAMHD1 and the innate immune response to cytosolic DNA during DNA replication. *Current Opinion in Immunology* **56**, 24–30 (2019).
55. Ragu, S., Matos-Rodrigues, G. & Lopez, B. S. Replication stress, DNA damage, inflammatory cytokines and innate immune response. *Genes (Basel)*. **11**, 409, (2020).

56. Fernandez-Capetillo, O. Intrauterine programming of ageing. *EMBO Reports* (2010). doi:10.1038/embor.2009.262
57. Murga, M. *et al.* A mouse model of ATR-Seckel shows embryonic replicative stress and accelerated aging. *Nat. Genet.* (2009). doi:10.1038/ng.420
58. Ruzankina, Y. *et al.* Deletion of the Developmentally Essential Gene ATR in Adult Mice Leads to Age-Related Phenotypes and Stem Cell Loss. *Cell Stem Cell* (2007). doi:10.1016/j.stem.2007.03.002
59. Zhang, Y., Vanoli, F., LaRocque, J. R., Krawczyk, P. M. & Jasin, M. Biallelic targeting of expressed genes in mouse embryonic stem cells using the Cas9 system. *Methods* **69**, 171–178 (2014).
60. Técher, H. *et al.* Replication dynamics: Biases and robustness of DNA fiber analysis. *J. Mol. Biol.* **425**, 4845–4855 (2013).
61. Tavares, E. M., Wright, W. D., Heyer, W. D., Le Cam, E. & Dupaigne, P. In vitro role of Rad54 in Rad51-ssDNA filament-dependent homology search and synaptic complexes formation. *Nat. Commun.* **10**, (2019).

Figure legends

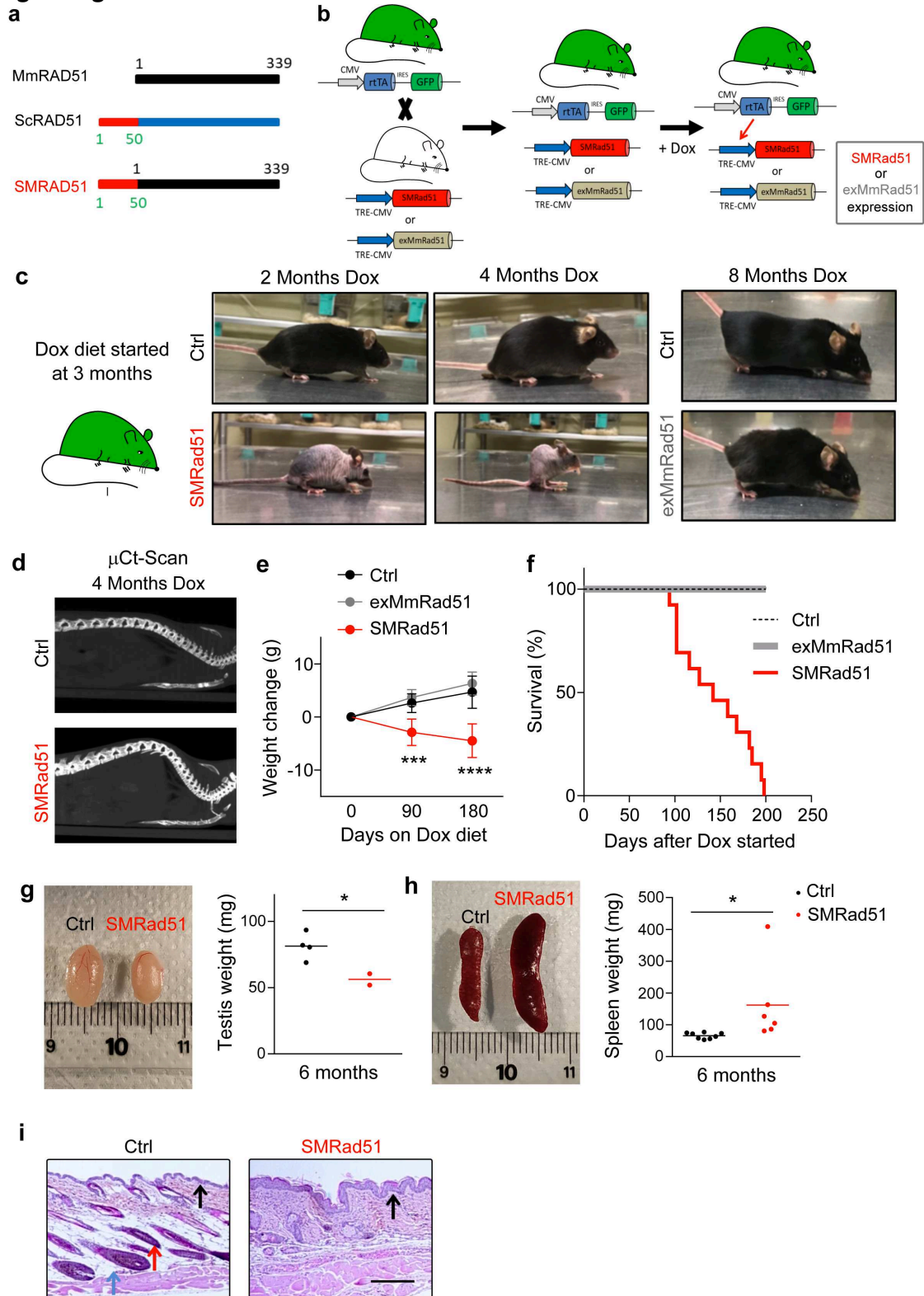


Fig. 1. Functional inactivation of RAD51 leads to premature aging.

(a) Schematic representation of SMRAD51. SMRAD51 is a chimeric construct composed of the full-length wild-type mouse MmRAD51 (black box) fused to the non-evolutionarily conserved N-terminal 55 amino acids (red box) of *Saccharomyces cerevisiae* Rad51 (ScRad51). **(b)** Schematic representation of SMRad51 and exMmRad51 mouse model generation. Two mouse models, one with SMRad51 and the other with exMmRad51 (HA-tagged) under the control of the Dox-inducible promoter (TRE-CMV), were designed. The induction of transgene expression by Dox requires the rtTA transcription activator. The two transgenic mouse models were thus crossed with a mouse bearing rtTA (and GFP) at the ubiquitous expression locus *Rosa26*. Expression of the transgene (*SMRad51* or *exMmRad51*) resulted from exposure of the *rtTA+;SMRad51+* or *rtTA+;exMmRad51+* models to Dox. The *rtTA-;SMRad51+* and *rtTA-;exMmRad51+* mice did not express the transgenes, even in the presence of Dox, and were thus convenient controls. **(c)** Experimental design and representative photos of Ctrl, exMmRad51 and SMRad51 mice fed a Dox-containing diet for 2, 4 or 8 months. **(d)** μ Ct scan images illustrating the spines of Ctrl and SMRad51 adult mice fed a Dox-containing diet for 4 months. **(e)** Quantitative analysis of body weight changes from the beginning of Dox treatment in Ctrl mice (n=9, 3 months; n=7, 6 months), exMmRad51 mice (n=5, 3 months; n=5, 6 months) and SMRad51 mice (n=10, 3 months; n=5, 6 months) fed a Dox-containing diet for 3 and 6 months. **(f)** Survival curves of Ctrl, exMmRad51 and SMRad51 mice fed a Dox-containing diet. Illustrative images (left) and quantification (right) of testis weights in Ctrl and SMRad51 adult mice fed a Dox-containing diet for 6 months. **(g)** Illustrative images (left) and quantification (right) of testis weights in Ctrl and SMRad51 adult mice fed a Dox-containing diet for 6 months. **(h)** Illustrative images (left) and quantification (right) of spleen weights in Ctrl and SMRad51 adult mice fed a Dox-containing diet for 6 months. **(i)** Representative pictures of skin histology for Ctrl and SMRad51 mice fed a Dox-containing diet for 6 months. Red arrow: capillary bulb, the density of which was decreased in SMRad51-expressing mice. Blue arrow: hypodermis in a Ctrl mouse, the thickness of which was decreased in *SMRad51*-expressing mice. Black arrow: epidermis, the thickness of which was increased in SMRad51 mutants. Statistical analysis: **(e)** Two-way ANOVA followed by Sidak's post-test. *** p<0.001; ****p<0.0001. **(g-i)** Student's t-test. *p<0.05.

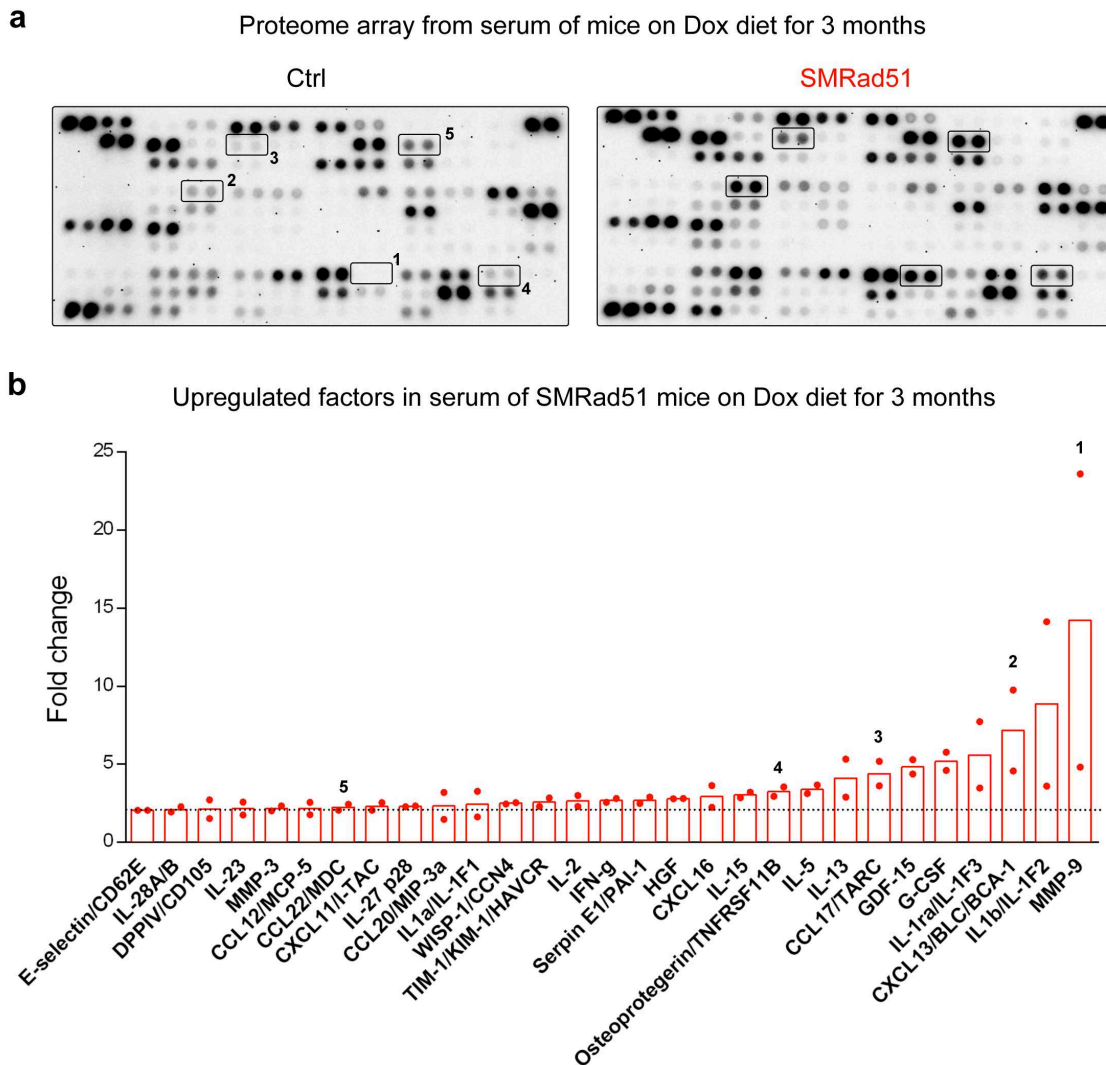
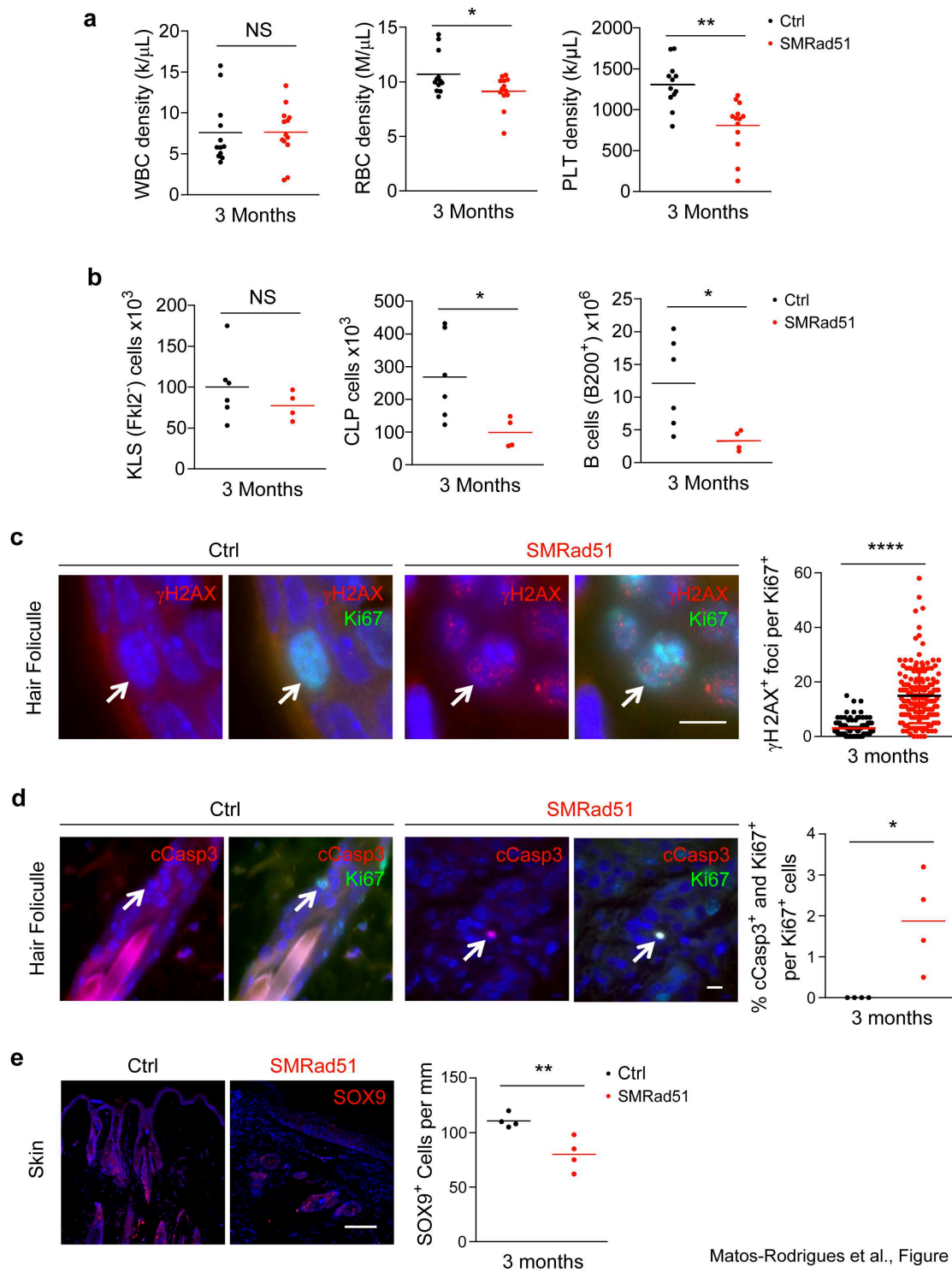


Fig. 2. Expression of *SMRad51* in adult mice increases serum levels of proinflammatory cytokines.

(a) Representative images of proteome array membranes of Ctrl and SMRad51 mice fed a Dox-containing diet for 3 months. **(b)** Graphical representation of the fold changes in upregulated factors in SMRad51 mouse serum compared to Ctrl mouse serum. Each dot in the graph represents a different biological replicate, and the horizontal dashed line marks a 2-fold change. Table S3 shows the quantification for the two independent biological samples of each group. In **(a)** and **(b)**, the numbers illustrate 5 different duplicate protein dots in the membranes and their quantification in two different experiments.



Matos-Rodrigues et al., Figure 3

Fig. 3. SMRad51 expression disrupts progenitor homeostasis.

(a) Analysis of the density of WBCs, RBCs and PLTs in the blood of Ctrl and SMRad51 adult mice 3 months after Dox treatment started. **(b)** Analysis of the proportion of hematopoietic stem cells (KLS cells, FLK2⁻), CLPs and B-lymphocytes (B-cells, B220⁺) in the bone marrow of Ctrl and SMRad51 adult mice 3 months after Dox treatment started. **(c)** Representative images (left) and quantification (right) of γ H2AX foci in Ki67⁺ (white arrow) capillary bulb cells in skin

sections of Ctrl and SMRad51 mice fed a Dox- containing diet for 3 months. **(d)** Representative images (left) and quantification (right) of cCas3+ and Ki67+ (white arrow) capillary bulb cells in skin sections of Ctrl and SMRad51 mice fed a Dox-containing diet for 3 months. **(e)** Representative images (left) and quantification (right) of SOX9+ cells in skin sections of Ctrl and SMRad51 mice fed a Dox-containing diet for 3 months. Statistical analysis: **(c)** Mann-Whitney test and **(a, b, c, d, e)** Student's t-test. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; **** $p < 0.0001$. Scale bars: **(c, d)** 10 μm and **(e)** 100 μm .

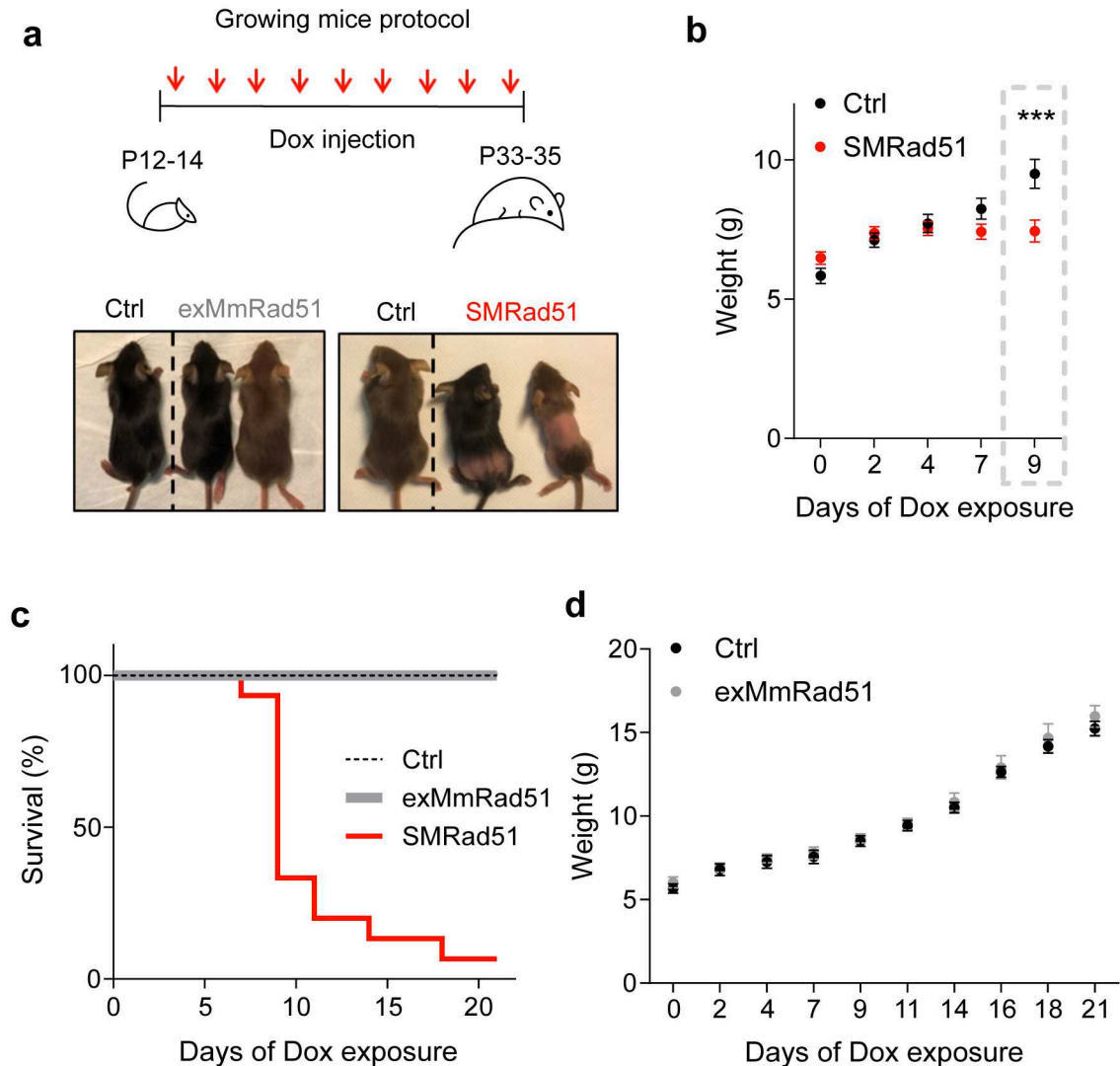
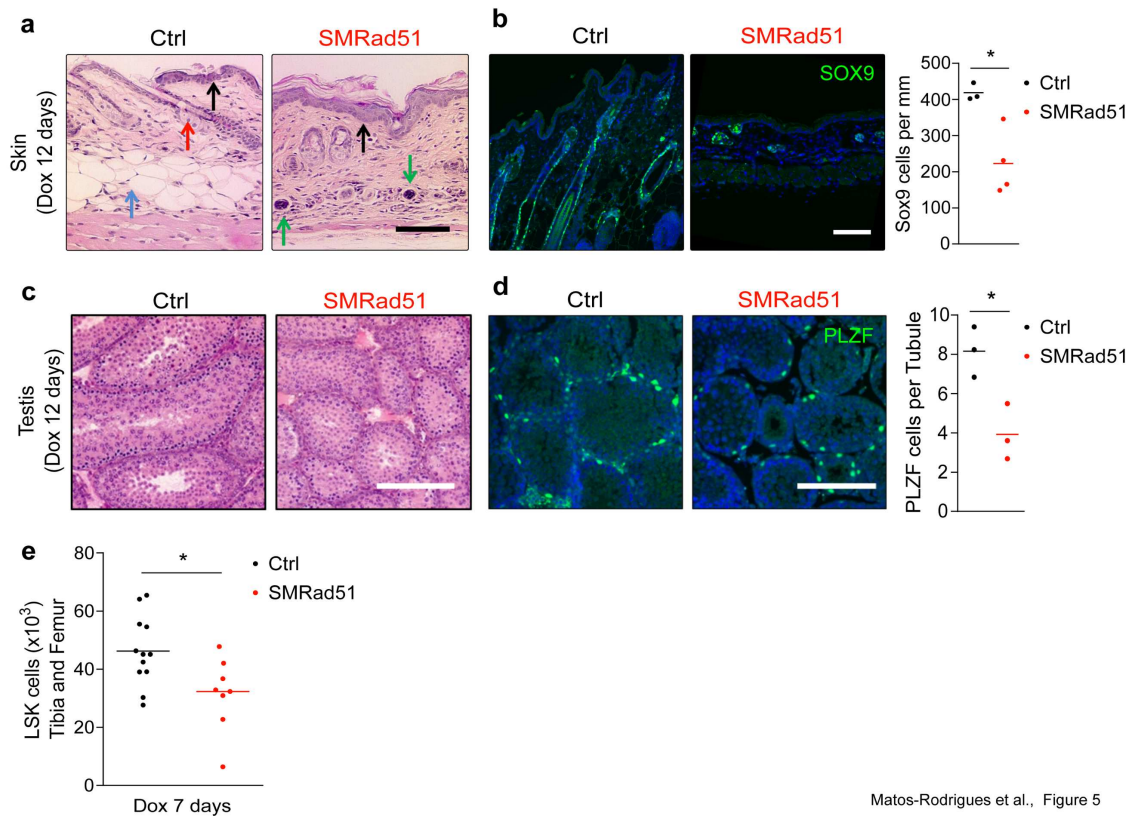


Fig. 4. SMRad51, but not exMmRad51, expression leads to rapid death in young growing mice.

(a) Representative scheme of the experimental designs for exMmRad51 and SMRad51 expression in growing mice (top) and representative photos (bottom) of Ctrl, exMmRad51 and SMRad51 growing mice after 12 days of Dox treatment. **(b)** Body weight measurements in SMRad51 (n=21) and Ctrl (n=15) littermate mice treated with Dox. **(c)** Survival curve from P12/14 to P33/35 in Ctrl (n=32), exMmRad51 (n=6) and SMRad51 (n=15) mice treated with Dox. **(d)** Body weight measurements in exMmRad51 (n=6) and Ctrl (n=10) littermate mice

treated with Dox. Statistical analysis: **(b)** Two-way ANOVA followed by Sidak posttest. *** $p < 0.001$. The error bars represent the \pm SEM. **(c)** Student's t-test. * $p < 0.05$.



Matos-Rodrigues et al., Figure 5

Fig. 5. SMRad51 expression in young growing mice decreases progenitor numbers in highly proliferative tissues.

(a) Representative pictures of histological analysis of skin from Ctrl and SMRad51 mice treated with Dox. Red arrow: capillary bulb, the density of which was decreased in SMRad51-expressing mice. Blue arrow: hypodermis, the thickness of which was decreased in SMRad51-expressing mice. Black arrow: epidermis, the thickness of which was increased in SMRad51 mutants. Green arrow: inflammatory infiltrates. **(b)** Representative pictures and quantification of capillary bulb progenitors stained for SOX9 in skin sections of Ctrl and SMRad51 mice treated with Dox. **(c)** Representative pictures of Ctrl and SMRad51 testis sections stained with H&E. **(d)** Representative images (left) and quantification (right) of testis sections immunostained for PLZF in Ctrl and SMRad51 mice after 12 days of Dox treatment. **(e)** Numbers of bone marrow stem cells (LSK, Lin-Sca1+c-kit+) in the tibias and femurs of Ctrl and SMRad51 mice treated for 7 days with Dox. Statistical analysis: **(b, d and e)** Student's t-test. * $p < 0.05$. Each point represents a biological replicate. Scale bar: 100 μ m.

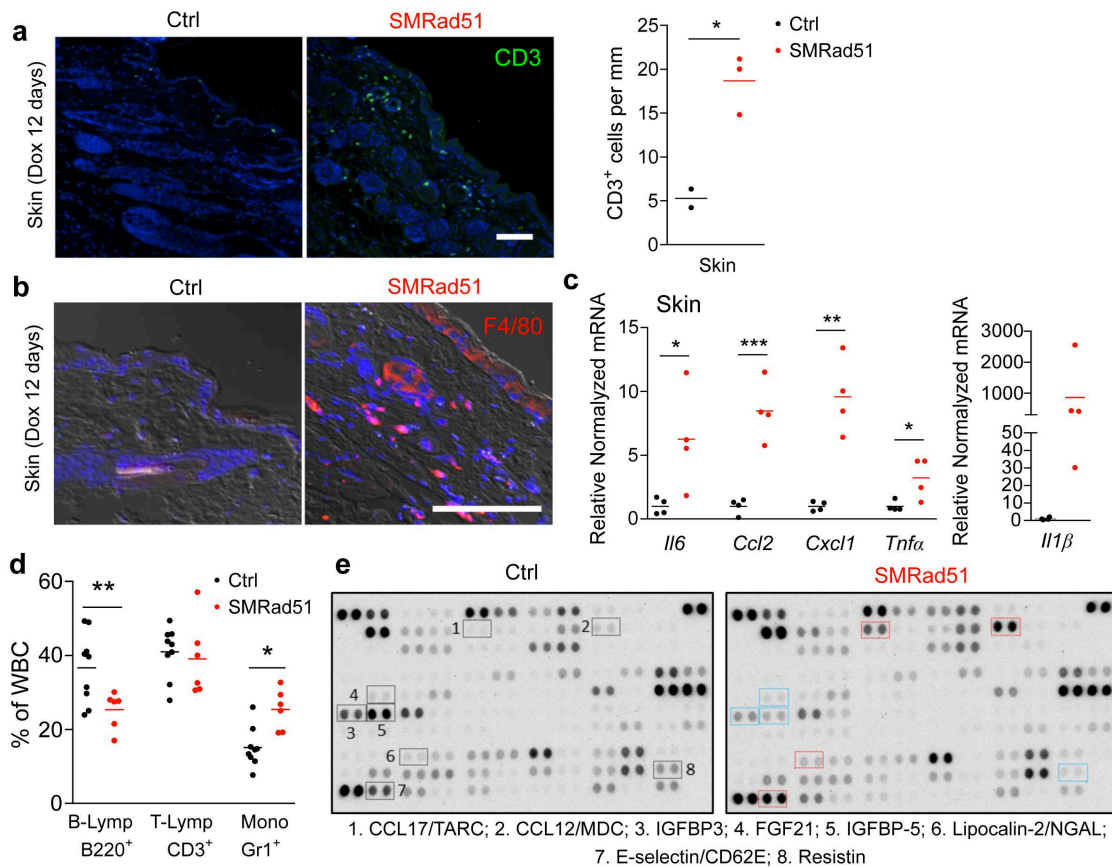


Fig. 6. Functional inhibition of *SMRad51* expression induces inflammation in young growing mice.

(a) Representative images (left panels) and quantification (right panel) of CD3⁺ cells (T-lymphocytes) in skin sections of Ctrl and SMRad51 mice treated with Dox for 12 days. **(b)** Representative images of staining for F4/80 (a monocyte/macrophage marker) in skin sections of Ctrl and SMRad51 mice treated with Dox for 12 days. **(c)** Real-time RT-PCR analysis of Ctrl and SMRad51 skin samples. **(d)** WBC proportions in growing mice after 7 days of Dox treatment. B-lymphocytes (B-Lymp) were revealed by B220 staining. T-lymphocytes (T-Lymp) were revealed by CD3 staining. Monocytes (Mono) were revealed by Gr1 staining. **(e)** Representative image of cytokine array analysis using serum from SMRad51 and Ctrl growing mice after 7 days of Dox treatment. The selected proteins highlighted in blue were downregulated (SMRad51 vs Ctrl), and those highlighted in red were upregulated (SMRad51 vs Ctrl). Table S4 shows the quantification results for two independent biological samples of each group. Statistical analysis: **(a, c, d)** Student's t-test. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$. Each point represents a biological replicate. Scale bar: 100 μ m.

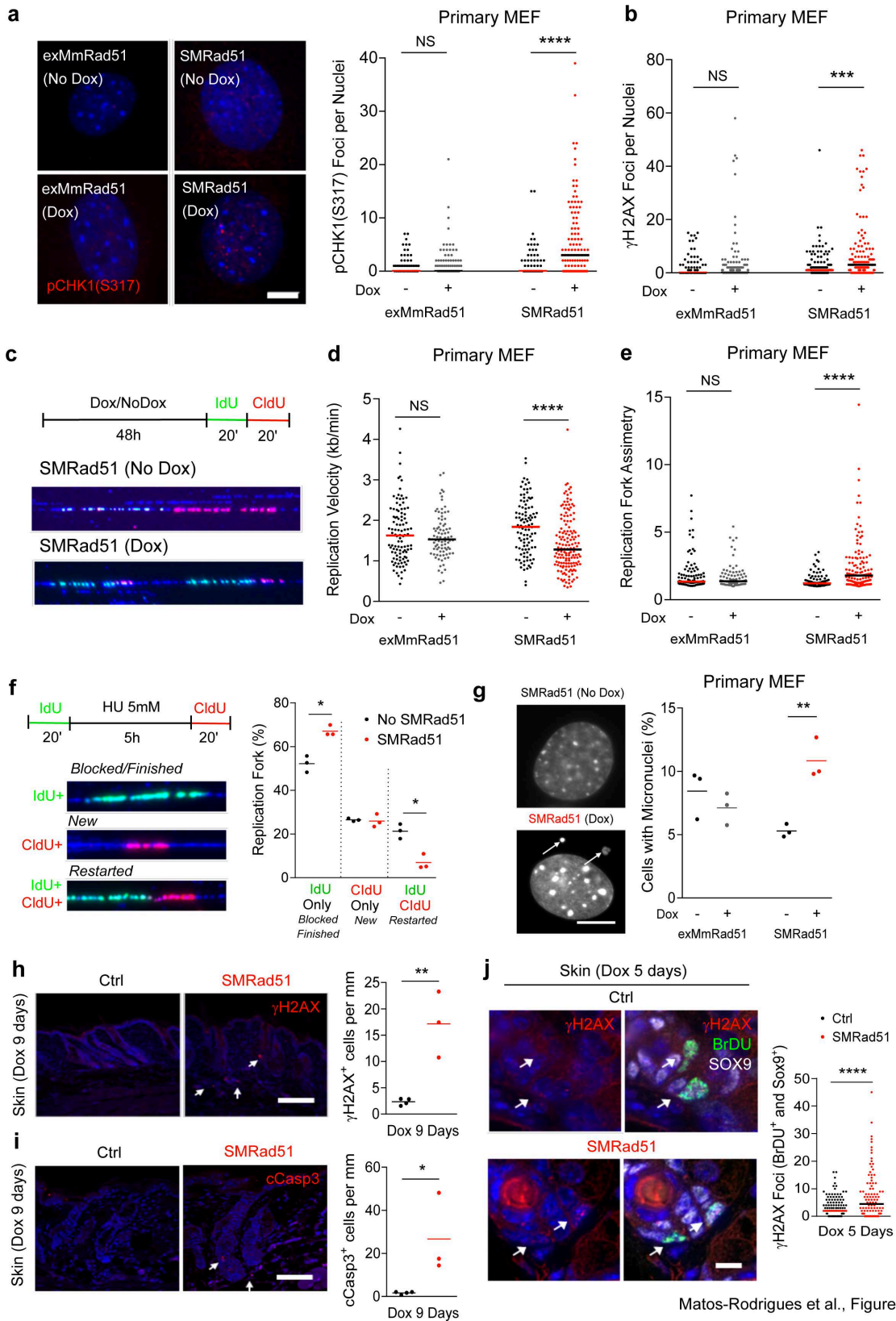


Fig. 7. SMRAD51 leads to replication stress during unchallenged replication *in vivo*. (a) Representative images (left panel) and quantification (right panel) of pChk1 (S317) foci in

exMmRad51 and SMRad51 primary MEFs treated or not treated with Dox for 6 days (n=3 per group). **(b)** Quantification of γ H2AX foci per nucleus in exMmRad51 and SMRad51 primary MEFs treated or not treated with Dox for 6 days (n=4 per group). **(c)** Representative scheme and pictures of molecular combing DNA fibers in SMRad51 primary MEFs treated or not treated with Dox (48 h). **(d)** Quantitation of replication velocity analyzed by molecular combing in exMmRad51 and SMRad51 primary MEFs treated or not treated with Dox for 48 h. **(e)** Replication fork asymmetry analysis by molecular combing in exMmRad51 and SMRad51 primary MEFs treated or not treated with Dox for 48 h. **(f)** Analysis of fork restart. A representative scheme (upper panel) and a picture (bottom left panel) of replication restart after fork blockage by HU are shown. After one pulse of IdU (green), replication was blocked with 4 mM HU for 5 h. Fresh HU medium was added to remove the HU, and a pulse of CldU (red) was applied. Forks that did not restart did not incorporate CldU (green without red labeling), while forks that restarted incorporated both IdU and CldU (both green and red labeling). New replication initiation was not labeled by the initial IdU but incorporated CldU (red without green). Right panel: Quantitative analysis of the percentage of replication forks containing only IdU, only CldU or both markers (right) in immortalized MEFs expressing or not expressing *SMRad51*. The graphs represent three independent experiments. **(g)** SMRAD51 expression induces micronucleus formation. Representative images (left) and quantification (right) of micronucleated cells after exMmRAD51 or SMRAD51 expression with Dox treatment (Dox +) or without Dox treatment (Dox -) for 6 days in primary MEFs are shown. White arrows: micronuclei. **(h)** Analysis of γ H2AX+ cells *in vivo*. Left panels: representative pictures. Right panel: quantification of γ H2AX+ cells in skin sections of Ctrl and SMRad51 mice after 9 days of Dox treatment. **(i)** Analysis of cCasp3 labeling *in vivo*. Left panels: representative pictures. Right panel: quantification of cCasp3+ cells in skin sections of Ctrl and SMRad51 mice after 9 days of Dox treatment. **(j)** Representative images (left) and quantification (right) of γ H2AX foci in BrdU+ (replicating) and Sox9+ (capillary bulb progenitor) cells (white arrow) in the skin sections of Ctrl and SMRad51 mice treated with Dox for 5 days. Statistical analysis: **(a, b, d, e, j)** Mann-Whitney test. ***p<0.001; ****p<0.0001; NS: nonsignificant. **(f, g, h, i)** Each point represents a biological replicate. Student's t-test. * p<0.05; ** p<0.01. Scale bars: **(a)** 5 μ m; **(h, i)** 100 μ m; **(j)** 10 μ m.

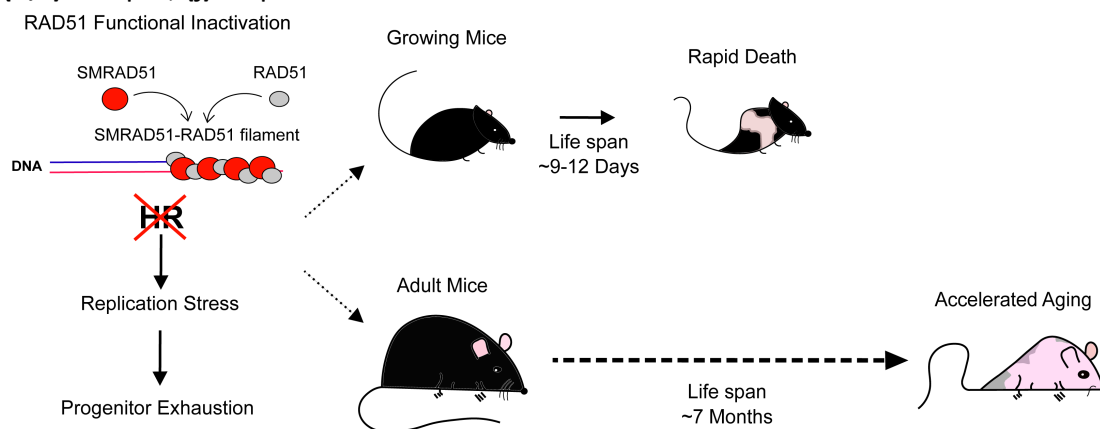


Fig. 8. Impact of RAD51 functional inhibition *in vivo*. Expression of *SMRad51*, which alters the structure of the RAD51/ssDNA filament and inhibits HR (left panel), strongly affects

mouse growth, hair and viability in growing young mice, leading to rapid mouse death. In adults, expression of *SMRad51* induces premature aging phenotypes and decreases lifespan.

Annexe III : Article II

RAD51 protects against RAD52-dependent non-conservative double-strand break repair, through non-enzymatic function

Ayeong So ^{1,2}, Ali Muhammad ³, Catherine Chailleux ⁴, Laura Sesma Sanz ^{5,6}, Sandrine Ragu ^{1,2}, Eric Le Cam ³, Yvan Canitrot ⁴, Jean Yves Masson ^{5,6}, Pauline Dupaigne ³, Bernard S. Lopez ^{1,2*} and Josée Guirouilh-Barbat ^{1,2*}.

¹ Institut Cochin, INSERM U1016, UMR 8104 CNRS, Université de Paris, Paris-Descartes, Equipe Labellisée Ligue Contre le Cancer 24 rue du Faubourg St Jacques, 75014 Paris, France

² CNRS UMR 8200, Gustave-Roussy, Université Paris-Saclay, 114 rue Edouard Vaillant, 94805 Villejuif, France.

³ Genome Maintenance and Molecular Microscopy UMR 9019 CNRS, Université Paris-Saclay, Gustave Roussy, F-94805, Villejuif Cedex, France.

⁴ CBI, CNRS UMR5088, LBCMCP, Toulouse University, Toulouse, France.

⁵ Genome Stability Laboratory, CHU de Québec Research Center, Quebec City, QC, Canada.

⁶ Department of Molecular Biology, Medical Biochemistry and Pathology, Laval University Cancer Research Center, Quebec City, QC, Canada.

* To whom correspondence should be addressed. Bernard S. Lopez. Tel: 33 1 53 73 27 40; Email: Bernard.lopez@inserm.fr Correspondence may also be addressed to Josée Guirouilh-Barbat Tel: 33 1 53 73 27 44; Email: josee.guirouilh-barbat@inserm.fr

ABSTRACT

The selection of the appropriate DNA double-strand breaks (DSBs) repair pathway is decisive for genetic stability. It acts according to two successive steps: 1-canonical non-homologous end-joining (C-NHEJ) *versus* resection that generates single-stranded DNA (ssDNA) stretches; 2- on ssDNA, gene conversion (GC) *versus* non-conservative single-strand annealing (SSA) or alternative end- joining (A-EJ). Here we addressed the molecular regulators of this second step, particularly the mechanisms by which RAD51 prevents non-conservative repair in human cells. We showed that silencing RAD51 or BRCA2 stimulated non-conservative repair (both SSA and A-EJ) but not C-NHEJ, validating the two-step model. Three different RAD51 dominant-negative forms (DN-RAD51s) with altered ATPase activity, failed to load efficiently onto damaged chromatin, repressed GC and stimulated non-conservative repair. A fourth DN-RAD51 that also represses GC, repressed SSA and A-EJ. Interestingly this fourth DN-RAD51 retains the full capacity to bind DNA, contrasting with the other DN-RAD51s. SSA and A-EJ are both dependent on resection and annealing. We show that RAD51 does not limit resection, but prevents spontaneous and RAD52-induced annealing of complementary ssDNA *in vitro*. Therefore, RAD51 controls the selection of the DSB repair pathway, protecting genome integrity from non-conservative DSB repair through ssDNA occupancy independently of catalytic activity that promotes GC.

INTRODUCTION

Genetic instability is a hallmark of ageing and cancer (1–3). DNA double-strand break (DSB) is a highly toxic lesion and, in addition, an important source of genome rearrangements and mutagenesis. However, DSB is also used by the cell to generate beneficial genetic diversity in processes such as meiosis, the establishment of the immune repertoire, and neuronal gene expression (for review, see (4)). Therefore, DSB repair should be tightly controlled to maintain genome stability while allowing diversity, and the choice of the appropriate DSB repair mechanism is thus a crucial issue for the maintenance of genome stability.

Two primary strategies repair DSBs: the first strategy relies on sequence homology with an intact DNA partner and thus refers to as homologous recombination (HR) including conservative gene conversion (GC) associated or not with crossing over. GC is (i) initiated by resection of the DSB producing 3'-single-stranded DNA (ssDNA); (ii) the loading of RAD51 onto the ssDNA by BRCA2 generates an ordered ssDNA/RAD51 filament that promotes the search for the homologous partner and strand invasion; (iii) DNA synthesis primed on the invading 3'-end; iv) resolution of the intermediate leading to GC with or without crossing over. The second DSB repair strategy, non- homologous end-joining (NHEJ), joins and ligates two DNA double-strand ends without requiring sequence homology; in canonical NHEJ (C-NHEJ), the Ku70/Ku80 heterodimer binds to the DSB and recruits DNA-PKcs, ligase 4 and its cofactors (4–9). Both GC and C-NHEJ are essential for genome stability maintenance, but other mechanisms that are exclusively mutagenic/non-conservative can also repair DSB: Single-strand annealing (SSA) is also initiated by resection but, instead of strand exchange with an homologous duplex DNA, anneals two revealed long complementary ssDNA sequences in a RAD51-independent but RAD52 dependent manner (10–12). In addition, another end- joining (EJ) process, A-EJ (alternative end-joining), also known as alt-NHEJ, B-NHEJ (back-up non- homologous end-joining) or MMEJ (microhomology-mediated end-joining) has been revealed in the absence of

KU or XRCC4/Ligase 4 in mammalian cells (4–8, 13–15). Like GC and SSA, A-EJ is initiated by ssDNA resection controlled by MRE11/CtIP (13, 16, 17); the joining of the two resected double-strand ends is then mediated by annealing of microhomologies (2 to 4 bp). Importantly, both SSA and A-EJ are non-conservative processes that inevitably lead to deletions of the intervening sequence (for review see (7, 18) or translocations (19).

Because HR, SSA and A-EJ are all initiated by resection, in opposition with C-NHEJ, we have proposed that, instead of a direct competition NHEJ *versus* HR, the selection of the DSB repair mechanism occurs in 2 steps (7, 13): 1-competition between C-NHEJ *versus* resection and, 2- on resected DNA ends, competition between GC, A-EJ and SSA. Consistent with this model studies in rodent cells showed that defects in C-NHEJ stimulate GC and A-EJ (5, 6, 20, 21) and depletion of 53BP1, a key factor in DNA ends protection that prevents resection, alleviates HR defect in BRCA1- deficient human cells (22). Moreover, inhibition of HR through expression of dominant negative forms of RAD51 or deficiency in BRCA2 leads to SSA stimulation (11, 23–25) and A-EJ (25, 26).

While the regulation of the first step of the repair pathway choice is well documented, the molecular mechanisms governing the second step, i.e. the selection between GC *versus* SSA or A-EJ, remain poorly explored and little is known about mechanisms that protect genome stability against non- conservative SSA and A-EJ. One hypothesis suggests that HR prevent non-conservative SSA and A- EJ solely through engaging DSB repair toward GC. Alternatively, the presence of RAD51 on resected ssDNA might protect against essential steps (resection and annealing) of SSA and A-EJ, independently of its GC enzymatic activity. Indeed, RAD51 has been shown to protect arrested replication forks from extensive resection (27–29).

Here, we address the molecular mechanisms by which RAD51 controls the choice of the DSB repair process at the second step, i.e. GC *versus* SSA or A-EJ, in human cells. We performed, in parallel, a systematic analysis of different DSB repair pathways, GC, SSA and EJ, comparing the impact of siRNA and dominant-negative forms of RAD51 (DN-RAD51) that differ in their DNA binding capacities. We found that all DN-RAD51 that had altered ATPase activity failed to bind damaged DNA in living cells and stimulate SSA. Another DN-RAD51 that poisons GC but retains the capacity to bind damaged chromatin, represses SSA and A-EJ, unveiling a non-enzymatic role of RAD51, independent of its GC activity. This protective role of RAD51 acts through the inhibition of the annealing of complementary ssDNA, rather than protection against extended resection. Collectively, our data reveal an additional molecular mechanism for RAD51 in genome stability maintenance in human cells: the repression of ssDNA annealing through ssDNA occupancy, impairing non- conservative repair. This process is separable from the RAD51 enzymatic GC activity.

MATERIAL AND METHODS

Cells. We used cell lines with intrachromosomal substrates monitoring either gene conversion, SSA, EJ (both C-NHEJ and A-EJ) after targeted induction DNA double strand breaks by the meganuclease I-SceI were used. The RG37 cell line (30) was derived from SV40-transformed GM639 human fibroblasts and stably contain the pDR-GFP, a gene conversion reporter, which restores a functional GFP gene upon I-SceI cleavage (31). GC92 cells (13) are also derived from SV40-transformed GM639 human fibroblasts and contain the pCOH-CD4/CD4-3200bp (je pense qu'on doit choisir un nom et pas deux : donc soit on recombine

“pCOH-CD4-3200bp” soit on choisit un des deux) substrate that monitors EJ by the expression of the membrane antigen CD4. Because I-SceI cleaves in two non-coding sequences, both error-prone and error-free repair are measured; *i.e.*, both C-NHEJ (conservative repair) and A-EJ (exclusively mutagenic repair) are recorded. Sequence of the repair junction allows the estimation of the C-NHEJ/A-EJ ratio (5, 6, 13, 32). U2OS-SSA cells were previously described (33, 34) . The DivA cell line (Asi-SI-ER-U2OS) is a U2OS cell line (human osteosarcoma) previously established and described by Iacovoni et al (2010). DNA double strand breaks are induced at located regions in the genome by the Asi-SI endonuclease. Asi-SI is sequestered in the cytoplasm, and after addition of hydroxy tamoxifen (300 nM) to the culture medium for 4 hours, Asi-SI translocates into the nucleus and cuts DNA. All cells were cultured in DMEM supplemented with 10% foetal calf serum (FCS) and 2 mM glutamine and were incubated at 37°C with 5% CO₂.

Transfection. The meganuclease I-SceI was expressed by transient transfection of the pCMV-HA-I-SceI expression plasmid (35) with Jet-PEI according to the manufacturer’s instructions (Polyplus transfection). The expression of HA-tagged I-SceI was verified by Western blotting, in each condition. For silencing experiments, 50,000 cells were seeded 1 day before transfection; these experiments were performed using INTERFERin following the manufacturer’s instructions (Polyplus Transfection) with 20 nM of one of the following siRNAs: Control (5'-AUGAACGUGAAUUGCUCAA-3'), RAD51-1 (cat# L003530-00-0010, Dharmacon), RAD51-2 (5'-GAAGCUAUGUUCGCCAUUA-3'), RAD51-3 (3'-UTR, 5'-GACUGCCAGGAUAAAGCUU-3'), RAD51-4 (3'UTR , 5'-GUGCUGCAGCCUAAUGAGA-3'), BRCA2 (5'-GCUGAUCUUCAUGUCAUAA-3') or RAD52 (5'-CCAACGCACAACAGGAAAC-3'), all of which (except those ordered from Dharmacon) were synthesized by Eurofins. Forty-eight hours later, the cells were transfected with the pCMV-HA-I-SceI expression plasmid.

Measure of gene conversion, SSA and EJ efficiency by FACS. After transfection with the pCMV-HA-I-SceI plasmid and incubation for 72 hours, the cells were collected 50 mM EDTA diluted in PBS, pelleted and fixed with 2% paraformaldehyde for 20 minutes. The percentage of GFP-expressing cells was scored by FACS analysis using a BD Accuri C6 flow cytometer (BD). The percentage of CD4- expressing cells was measured after incubation for 10 minutes with 1 µl of anti-CD4 antibody coupled to Alexa 647 (rat isotype, RM4-5, Invitrogen). For each cell line, at least 3 independent experiments were performed, and HA-I-SceI expression and silencing efficiency were verified each time by Western blot.

Western blotting. For Western blot analysis, the cells were lysed in buffer containing 20 mM Tris HCl (pH 7.5), 1 mM Na₂EDTA, 1 mM EGTA, 150 mM NaCl, 1% (w/v) NP40, 1% sodium deoxycholate, 2.5 sodium pyrophosphate, 1 mM β-glycerophosphate, 1 mM NA₃VO₄ and 1 µg/ml leupeptin supplemented with complete mini protease inhibitor (Roche). Denatured proteins (20-40 µg) were electrophoresed in 9% SDS-PAGE gels or MiniPROTEAN® TGXTM 4-15% Precast gels (BIORAD), or on 3-8% Tris-Acetate gels (ThermoFisher Scientific) transferred onto a nitrocellulose membrane and probed with specific antibodies, including anti-Vinculin (1/8,000, SPM227, Abcam), anti-RAD51 (1/1,000, Ab-1 Millipore), anti-RAD52 (1/500, sc-365341, Santa Cruz) anti BRCA2 (1/500, OP95, Millipore), anti-PALB2 (1/1000, GTX85263,

Genetex) and anti-HA (1/1,000, HA.11 clone 16B12, Covance). Immunoreactivity was visualized using an enhanced chemiluminescence detection kit (ECL, Pierce).

Junction sequence analysis. We amplified the junction sequences through PCR of genomic DNA using the CMV-6 (5'-TGGTGTATGCGGTTTTGGC-3') and CD4-int (5'-GCTGCCCCAGAATCTTCCTCT-3') primers. The predicted size of the PCR product is 732 nt. The PCR products were cloned with a TOPO PCR cloning kit (Invitrogen Life Technologies) and sequenced (Eurofins). For each sample, 2 to 5 independent experiments were analyzed. In each of these experiments, HA-I-SceI expression and the silencing efficiency were verified by Western blot.

Immunofluorescence. Cells were seeded onto slides and transfected with empty vector, Flag-SMRAD51, Flag-WTRAD51, Flag-RAD51 K133A and Flag-RAD51 K133R or HA-WTRAD51 or HA-RAD51-T131P. Forty-eight hours after transfection, the cells were washed with PBS, treated with CSK buffer (100 mM NaCl, 300 mM sucrose, 3 mM MgCl₂, 10 mM Pipes pH 6.8, 1 mM EGTA, 0.2X Triton, and protease inhibitor cocktail (Complete ULTRA Tablets, Roche)) and fixed in 2% paraformaldehyde for 15 min. The cells were then permeabilized in 0.5% Triton-X 100 for 10 min, saturated with 2% BSA and 0.05% Tween20 and probed with anti-Flag (1/400, F3165 Sigma-Aldrich), anti-HA (1/100, sc-7392, Santa Cruz), or anti-RAD51 (1/500, PC130, Merck Millipore) antibody for 2 h at RT or overnight at 4°C. After 3 washes in PBS-Tween20 (0.05%) at RT, the cells were probed with Alexa-coupled anti-mouse or anti-rabbit secondary antibody (1/1,000, Invitrogen) for 1 h at RT. After 3 washes, the cells were mounted in DAKO mounting medium containing 300 µM DAPI and visualized using a fluorescence microscope (Zeiss Axio Observer Z1) equipped with an ORCA-ER camera (Hamamatsu). Image processing and foci counting were performed using the ImageJ software.

Co-immunoprecipitation. GC92 cells grown on 75 cm² cell culture flasks were irradiated with an irradiator (XRAD320, 6 Gy) for 4 h before collection. Cells were washed in PBS and pellets were resuspended with 300 µl lysis buffer (150 mM NaCl, 25 mM Tris pH 7.5, 1 mM EDTA, 0.5% NP40, protease inhibitors (Complete ULTRA Tablets, Roche) and phosphatase inhibitors (phosphatase inhibitor cocktail 2/3, P5726/P0044, Sigma)) and then incubated for 1 h at 4°C. Cell extracts were centrifuged at 13,200 rpm for 20 min at 4°C. Following the measurement of the total protein amount, the supernatant fraction was incubated with 15 µl fetal bovine serum for 1 h at 4°C and then incubated with 10 µl pre-cleaned magnetic beads at 12 rpm for 30 min at 4°C. Next, 200 µg protein were incubated with DNase I (7.5 U) and 1 µg anti-Flag resin (cat# F3165, Sigma-Aldrich) at 12 rpm overnight at 4°C. Following an incubation with pre-cleaned magnetic beads at 12 rpm for 4 h at 4°C, the resin was washed three times with lysis buffer. Laemmli 2X (62.5 mM Tris-HCl, pH 6.8, 10% glycerol, 1% LDS, and 0.005% bromophenol blue) was added and the proteins were boiled for 5 min at 95°C. Denatured protein extracts were resolved using 4–15% Mini-PROTEAN[®] TGXTM Precast Protein Gels (Biorad) and then transferred to a nitrocellulose membrane.

Resection assay. Resection measurements on DivA Cells were performed as previously described (36). Briefly, after hydroxy tamoxifen treatment cells were collected for genomic

DNA extraction (DNeasy blood & tissue kit, Qiagen), 100-200 ng genomic DNA was treated with 16 U of the appropriate restriction enzyme overnight at 37°C. After enzyme inactivation, the digested genomic DNA was used for qPCR (TAKARA mix for qPCR) with the primers listed in the table below.

| DSB localization | Enzyme | Distance from DSB | FW sequence | REV sequence |
|------------------|--------|-------------------|---------------------------|-----------------------|
| chr 20 | BamI | 508 nt | GGGGCCATCTTCCTTTAAGA | CCAGACGCTGCCAAATAGTG |
| | | 740 nt | GTCCCCTCCCCACTATTT | ACGCACCTGGTTTAGATTGG |
| | | 2000 nt | G TTCCTGTTATGCGGGTGTT | TGGACCCCAAATTCCTAAAG |
| chr 1 | BamH1 | 364 nt | CCAGCAGTAAAGGGGAGACA GA | CTGTTCAATCGTCTGCCCTTC |
| | | 1754 nt | GAAGCCATCCTACTCTTCTCA CCT | GCTGGAGATGATGAAGCCCA |
| | | 3564 nt | GCCCAGCTAAGATCTTCCTTCA | CTCCTTTGCCCTGAGAAGTGA |

The percentage of ssDNA was calculated with the following equation: $ssDNA \% = 1 / (2^{(\Delta Ct - 1)} + 0.5) * 100$, where $\Delta Ct = Ct$ of the digested sample – Ct of the non-digested sample.

Single strand annealing assay. All reactions were performed in a buffer containing 10 mM Tris-HCl (pH 8), 50 mM sodium chloride, 2 mM calcium chloride, 1 mM DTT and 1 mM ATP γ s. In reaction A, 0.1 μ M (8 μ M nucleotides) of a 178-mer oligonucleotide (5'-ATCATCACCATCACCATTGAGTTTAAACCCGCTGATCAGCCTCGACTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGCGGTCCCAACGATCAAGGCGAGTTACATGATCCCCATGTTGTGCAAAAAGCGGTTAGCTCCTTCGGTCCCGATCGTTGTCAGAAGTAAGTTGGC-3') was pre-incubated with 2.6 or 8 μ M WTRAD51 (ratio protein/nt: 1/3 or 1/1, respectively) for 10 min at 37°C in a final volume of 5 μ l. In reaction B, 0.1 μ M of a 3'-Cy5-labeled 80-mer oligonucleotide, which is complementary to the 5'-portion of the 178-mer described in reaction A (5'-GCAAACAACAGATGGCTGGCAACTAGAAGGCACAGTCGAGGCTGATCAGCGGGTTAACTCAATGTGATGGTGATGAT-Cy5-3') was pre-incubated under the same conditions with 2.6 or 8 μ M WTRAD51 (ratio protein/nt: 1/3 or 1/1, respectively). Reactions A and B were mixed together for 5 min at 30°C. Then, 5 μ M of an unlabeled DNA (80-mer) was added to the reaction. The total reaction was stopped by the addition of 1% SDS (w/v) and 25 mM EDTA and deproteinized (30 min incubation at 37°C with 2 mg/ml proteinase K). Samples were run in a 3% (w/v) agarose gel at 80 V for 30 min in 0.5x TAE buffer. Fluorolabeled DNA species were visualized by fluorescent imaging using a Typhoon FLA 9500 (GE Healthcare Life Sciences).

Statistical Analysis. Unpaired t-tests were performed using GraphPad Prism 3.0 (GraphPad Software).

RESULTS

RAD51 and BRCA2 repress both SSA and A-EJ, in an epistatic way.

We used human cells lines containing reporter substrates monitoring GC, SSA or end-joining (EJ) (Figure 1A). First, we verified that silencing RAD51 (4 different siRNAs, Figure 1A) indeed inhibited GC, and stimulated SSA, as expected (Figure 1B and 1C). In addition, silencing RAD51 also stimulated EJ (Figures 1D). To discriminate between C-NHEJ and A-EJ, we sequenced the repair junctions. Indeed, deletions at the scar are a signature of A-EJ and the use of 3'PNT a signature of C- NHEJ (5, 6, 13, 32, 37). Silencing RAD51 increased the occurrence of deletions at EJ junctions, while it had no impact on the efficiency of the use of 3'PNT (Figure 1E and Supplementary Figure S1 and S2), showing that RAD51 preferentially suppresses A-EJ rather than C-NHEJ. These data contrast with those showing that ablation of BRCA2 stimulates both C-NHEJ and A-EJ in mouse ES cells (25). Therefore, this raises the question as whether RAD51 and BRCA2 actually act in an epistatic way also for the EJ stimulation, i.e. the selection of the DSB repair pathway. Here, in human cells, BRCA2 depletion inhibits GC and stimulates both SSA and EJ. Silencing both BRCA2 and RAD51 show that they acted in an epistatic way also on the stimulation of both SSA and EJ (Figure 1F and 1G). Moreover, by sequencing the EJ junctions, we found that in human cells BRCA2 depletion specifically stimulated deletions, i.e. mainly A-EJ, rather than C-NHEJ (Figure 1E and Supplementary Figure S1 and S2). Together these data show that RAD51 and BRCA2 act in an epistatic way not only on GC, as expected, but also on the repression of the non-conservative SSA and A-EJ.

Stimulation of SSA and A-EJ is separable from GC-inhibition.

To deepen the above data and to investigate whether RAD51 restrains SSA and A-EJ only by channelling DSB repair toward GC or through another putative mechanism, we expressed four different DN-RAD51s that exhibit different characteristics (Figure 2A).

Two of the DN-RAD51s are mammalian RAD51 mutated in the ATP binding/hydrolysis site (ATPm- RAD51s); one mutant (RAD51-K133A) does not bind ATP and the other (RAD51-K133R) binds but does not hydrolyse ATP (24). It was shown *in vitro* that RAD51-K133A binds to DNA but fails to form filaments, when RAD51-K133R forms organized filaments but is defective for RAD51 turnover (38). The third DN-RAD51 (SMRAD51 from *Saccharomyces*-Mammalian RAD51) corresponds to a yeast/mammalian RAD51 chimera that poisons GC (11, 39–42). More recently, the fourth DN-RAD51, RAD51-T131P, was described in patient suffering from Fanconi anaemia Group R, thus correspond to an existing pathological situation (43).

Remarkably, although all the DN-RAD51s inhibited GC (Figure 2B) as expected (11, 24, 43), they differently impacted SSA and EJ (Figure 2C and 2D). Similarly to the RAD51 siRNA, both ATPm- RAD51s increased SSA (compare Figure 1C and Figure 2C). Overexpression of RAD51-T131P, slightly but significantly stimulate SSA (Figure 2C). ATPm-RAD51s and RAD51-T131P had no impact on the EJ efficiency (Figure 2D). In contrast with both siRNA and ATPm-RAD51s or RAD51-T131P, SMRAD51 that represses GC (Figure 2B) stimulated neither SSA nor EJ, and even slightly decrease SSA (Figures 2B, 2C and 2D). These last data with SMRAD51 reveal that inhibition of GC does not systematically stimulate the alternative pathways SSA and A-EJ, and

thus that these two processes might functionally separable. Moreover, the stimulation of SSA and EJ resulting from silencing of endogenous RAD51 (siRNA targeting the 3'-UTR of RAD51) were both abolished by ectopic expression of SMRAD51, although it failed to restore GC (Figure 2E). This gives further evidence of a separation of function between GC proficiency and RAD51-mediated protection against non-conservative SSA and A-EJ.

One hypothesis to account for the differences between the DN-RAD51s proposes that, although the ATPm-RAD51 proteins have been shown to bind DNA *in vitro* (38, 44), SMRAD51, ATPm-RAD51s and RAD51-T131P may differ in their capacities to bind damaged DNA in living cells.

The loading of RAD51 on damaged chromatin requires ATP in living cells.

To address this hypothesis, we compared the capacities of the DN-RAD51s to bind damaged DNA *in vivo*. As anti-RAD51 antibodies revealed both endo- and exogenous RAD51 we constructed Flag-RAD51s to distinguish exogenous RAD51.

We first analysed the formation of RAD51 foci induced by ionizing radiation (IR) (Figure 3A). Flag-SMRAD51 efficiently formed IR-induced foci with the same kinetics of assembly/disassembly than endogenous RAD51 or overexpressed Flag-WTRAD51 (Figure 3A and 3B). By contrast, the two ATPm-RAD51s exhibited defects in IR-induced Flag foci formation (Figures 3A and 3B). Indeed, Flag-RAD51-K133A did not assemble into foci and the efficiency of foci formation was strongly decreased for Flag-RAD51-K133R (Figure 3B). These data were confirmed by ChIP experiments on endonuclease-induced DSBs, confirming the ability of SMRAD51 to bind the DSB, and the poor efficiency of a ATPm-RAD51 (Supplementary Figure S3). Moreover, in IF experiments, RAD51 antibody that recognizes both endogenous and exogenous RAD51 revealed that both ATPm-RAD51s affected the efficiency of all RAD51 foci formation, thus including endogenous RAD51, accounting for their dominant-negative effect (Figure 3C). As expected (43), HA-RAD51-T131P was defective for radiation induced foci formation (Figure 3D and 3E), but it also revealed an inhibitory effect on the formation of endogenous RAD51 foci (Figure 3F), even though this inhibitory effect was less pronounced than the one ATPm-RAD51 (compare Figure 3F and 3C). As ATPm-RAD51s have an impaired ATPase activity and as RAD51-T131P has a misregulated ATPase activity (43), these data directly couple the ATPase activity and the ability to form RAD51 foci *in vivo*.

As the ATPm-RAD51s do not bind efficiently to broken DNA *in vivo* and because BRCA2/PALB2 loads RAD51 onto the ssDNA, we hypothesized that ATP might be required for the binding of RAD51 to BRCA2/PALB2. In co-immunoprecipitation analyses the WT-RAD51, the SMRAD51, but also ATPm-RAD51 interacted with both BRCA2 and PALB2 showing that ATP hydrolysis is not required for the binding of RAD51 to BRCA2 and PALB2 (Figure 3G). This suggests that ATPm-RAD51s should titrate endogenous HR proteins such as BRCA2 and PALB2, providing an explanation for the inhibition of endogenous RAD51 foci formation and their dominant negative effect.

Altogether these data show that 1) DN-RAD51s that do not bind DNA in cells, stimulate SSA, while 2) SMRAD51 that binds damaged DNA, represses GC but also SSA and A-EJ. This supports the conclusion that the repression of SSA and A-EJ is correlated to the binding capacities of RAD51 to damaged DNA rather than to the GC proficiency (compare Figure 2 and 3).

RAD51 does not protect endonuclease-induced DSBs from resection.

To account for the above data, since both SSA and A-EJ require resection and annealing steps, one can propose that the binding of RAD51 on DNA protects against extended resection, as shown for arrested replication forks (27, 28), and/or impairs the annealing of complementary ssDNA as suggested by *in vitro* studies in yeast (45, 46). We first addressed the resection hypothesis using the DivA system that allows to quantify the resection at different distances of Asi-S1 cutting sites in the genome (36, 47). We measured resection on two different chromosomes (chromosomes 1 and 20) that have been previously mapped (36, 47). As expected, resection decreased with the distance from the Asi-S1-cleaved sites. Moreover, as a control, silencing CtIP, which is involved in resection initiation, significantly affected the resection efficiency (Figure 4A). Silencing RAD51 did not significantly impact the efficiency of resection at either site (Figure 4A). Of note, this result is consistent with the fact that silencing RAD51 did not affect the size distribution of deletions at the A- EJ repair junction (Supplementary Figure S4). Moreover, none of the tested DN-RAD51 affected the resection efficiency (Figure 4B).

Taken together, these data show that in contrast with blocked replication forks, RAD51 does not significantly protect against long resections at DSBs generated by endonucleases.

RAD51 prevents the annealing of complementary ssDNAs.

Therefore we investigated whether human WT-RAD51 and SMRAD51, which bind damaged DNA in living cells, retain the ability to inhibit the annealing of complementary ssDNA *in vitro*. Two complementary ssDNA (only one being radioactively labelled) were incubated *in vitro* with proteins and, after deproteinization, the products were analysed by agarose gel electrophoresis (Figure 4C). In absence of protein, the two complementary ssDNAs spontaneously slightly annealed (Figure 4D and 4E). Incubation with human RAD52 protein stimulated the efficiency of annealing (Figure 4D and 4E) as expected (48), thus validating our assay. Both RAD51 and SMRAD51 abolished spontaneous as well as RAD52-induced annealing (Figure 4D and 4E). Coherently, silencing RAD52 abolished the stimulation of SSA resulting from RAD51 depletion in living human cells, (Figure 4F), confirming thus the antagonistic roles of RAD51 and RAD52 on SSA.

DISCUSSION

Our data reveal multiple separable role(s) for RAD51 in the choice of the DSB repair pathway (at the second step), all favouring genome stability maintenance. In addition to trigger GC, RAD51 also prevents non-conservative SSA and A-EJ via the inhibition of the RAD52-stimulated annealing of complementary ssDNA. The increase of A-EJ and SSA upon HR deficiency has been separately reported in different studies (23, 25, 26), always proposing that the DSB repair was redirected to alternative mechanisms due to the lack of strand exchange activity. Here, we show that the stimulation of SSA and A-EJ in the absence of RAD51 is not a direct consequence of the inhibition of GC *per se*, but rather results from the absence of RAD51 protein on the DNA, thereby failing to repress the annealing of complementary ssDNA. PolQ has been shown to stimulate A-EJ and to remove RAD51 from the DNA (49). This is highly consistent with our data and with the inhibition of A- EJ by RAD51 bound on DNA. In budding Yeast, Rad51

suppresses Rad52-dependent ssDNA annealing, facilitating DNA strand invasion *in vitro* (45, 46). Here we show that GC and repression of annealing are in fact two separable processes. The resection step that generates ssDNA is essential to initiate HR but is also a prerequisite for the annealing of complementary ssDNA in non-conservative SSA and A-EJ, thus jeopardizing genome stability. The ssDNA binding protein RPA protects against annealing of microhomologies-mediated A- EJ (50) but favours the annealing of long homologies catalysed by RAD52 by preventing secondary structures formation (51, 52). RPA's function is then to direct repair to homology dependent processes, whether GC or SSA. Our data show that ssDNA occupancy by RAD51 finalizes the selection toward GC at a later step by favouring GC through its catalytic activity and by inhibiting SSA through ssDNA occupancy.

In vitro, RAD51-K133A does not form filaments when RAD51-K133R forms proper nucleofilaments but is deficient for RAD51 turnover (38, 44). We show here, in living cells, that ATPm-RAD51s are both inefficiently loaded onto damaged chromatin, suggesting that the primary role of ATP is the transfer of RAD51 to the damaged DNA. RAD51-T131P, a dominant negative form of RAD51 found in a patient with Fanconi anaemia (43), was also defective for DNA binding in living cells. This mutant has a misregulated ATPase activity, confirming the coupling between ATPase activity and DNA binding in human cells.

RAD51 has been shown to protect arrested replication forks from resection (27, 28). Indeed, several RAD51 mutants and separation of function alleles, including the RAD51-K133R used here, have been shown to be able to protect arrested replication forks from resection (29, 53). Since here RAD51- K133R poorly binds IR- and endonuclease-induced DSBs (Figure 3 and supplementary Figure S3), this suggests that arrested replication forks and DSB are differently processed by RAD51, in agreement with the resection measured here (Figure 4).

Altogether our data reveal a role of RAD51 at the second step of DSB repair mechanism selection. This role requires the loading of RAD51 onto DNA, which is ATP-dependent *in vivo*, and which impairs the annealing of complementary ssDNA without requiring to engage strand exchange enzymatic activity, thus GC. Therefore, RAD51 preserves genome stability by preventing non- conservative DSB repair through ATP-dependent but GC-independent role (summarized in Figure 5).

More generally, because HR has been shown to be deregulated in ageing- and/or cancer-prone pathological situations (Fanconi anaemia, familial breast and ovary cancers, sporadic cancers), these data raise the question of the relative impact of HR defect compared to the increase of non- conservative mechanisms (SSA, A-EJ) on genetic stability and ultimately on pathological repercussions. Remarkably, the impact on non-conservative DSB repair efficiency varies according the mechanism of HR suppression.

SUPPLEMENTARY DATA

Supplementary Data are available at NAR online.

ACKNOWLEDGEMENT

We would like to thank Dr. Jeremy Stark (COH, Duarte, CA, USA) for providing us the U2OS SA-GFP cells (containing the SSA reporter), Dr. Maria Jasin (MSKCC, NYC, NY, USA) for the ATPm-RAD51s expression vectors, Dr. Agata Smogorzewska for the RAD51-T131P and Dr. Gaëlle Legube (Toulouse, France) for sharing the DivA systems and technology.

FUNDING

This work was supported by grants from the Ligue Nationale contre le cancer “Equipe labellisée 2020”, Agence Nationale de la Recherche (ANR-16-CE12-0011-02, and ANR-16-CE18-0012-02) and Institut National du Cancer, (2018-1-PL BIO-07).

CONFLICT OF INTEREST

The author(s) declare no competing financial interests.

REFERENCES

1. 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.
2. Hanahan,D. and Weinberg,R.A. (2011) Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*, **144**, 646–674.
3. López-Otín,C., Blasco,M.A., Partridge,L., Serrano,M. and Kroemer,G. (2013) The hallmarks of aging. *Cell*, **153**, 1194.
4. So,A., Le Guen,T., Lopez,B.S. and Guirouilh-Barbat,J. (2017) Genomic rearrangements induced by unscheduled DNA double strand breaks in somatic mammalian cells. *FEBS J.*, [10.1111/febs.14053](https://doi.org/10.1111/febs.14053).
5. 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.
6. 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**.
7. Betermier,M., Bertrand,P. and Lopez,B.S. (2014) Is non-homologous end-joining really an inherently error-prone process? *PLoS Genet*, **10**, e1004086.
8. Deriano,L. and Roth,D.B. (2013) Modernizing the nonhomologous end-joining repertoire: alternative and classical NHEJ share the stage. *Annu. Rev. Genet.*, **47**, 433–55.
9. Scully,R., Panday,A., Elango,R. and Willis,N.A. (2019) DNA double-strand break repair-pathway choice in somatic mammalian cells. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **20**, 698–714.
10. Haber,J.E. (2014) Genome stability. DNA repair and recombination.
11. 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.
12. Rothenberg,E., Grimme,J.M., Spies,M. and Ha,T. (2008) Human Rad52-mediated homology search and annealing occurs by continuous interactions between overlapping nucleoprotein complexes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **105**, 20274–20279.
13. 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**, 819–24.
14. Wang,H., Perrault,A.R., Takeda,Y., Qin,W. and Iliakis,G. (2003) Biochemical evidence for Ku-independent backup pathways of NHEJ. *Nucleic Acids Res*, **31**, 5377–5388.
15. Audebert,M., Salles,B. and Calsou,P. (2004) Involvement of poly(ADP-ribose) polymerase-1 and XRCC1/DNA ligase III in an alternative route for DNA double-strand breaks rejoining. *J Biol Chem*, **279**, 55117–55126.
16. Dinkelman,M., Spehalski,E., Stoneham,T., Buis,J., Wu,Y., Sekiguchi,J.M. and Ferguson,D.O. (2009) Multiple functions of MRN in end-joining pathways during isotype class switching. *Nat Struct Mol Biol*, **16**, 808– 813.
17. Xie,A., Kwok,A. and Scully,R. (2009) Role of mammalian Mre11 in classical and alternative nonhomologous end joining. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **16**, 814–8.

18. Simsek,D., Brunet,E., Wong,S.Y., Katyal,S., Gao,Y., McKinnon,P.J., Lou,J., Zhang,L., Li,J., Rebar,E.J., *et al.* (2011) DNA ligase III promotes alternative nonhomologous end-joining during chromosomal translocation formation. *PLoS Genet*, **7**, e1002080.
19. Richardson,C. and Jasin,M. (2000) Frequent chromosomal translocations induced by DNA double-strand breaks. *Nature*, **405**, 697–700.
20. Delacote,F., Han,M., Stamato,T.D., Jasin,M. and Lopez,B.S. (2002) An xrcc4 defect or Wortmannin stimulates homologous recombination specifically induced by double-strand breaks in mammalian cells. *Nucleic Acids Res*, **30**, 3454–3463.
21. Pierce,A.J., Hu,P., Han,M., Ellis,N. and Jasin,M. (2001) Ku DNA end-binding protein modulates homologous repair of double-strand breaks in mammalian cells. *Genes Dev*, **15**, 3237–3242.
22. Bunting,S.F., Call??n,E., Wong,N., Chen,H.T., Polato,F., Gunn,A., Bothmer,A., Feldhahn,N., Fernandez- Capetillo,O., Cao,L., *et al.* (2010) 53BP1 inhibits homologous recombination in brca1-deficient cells by blocking resection of DNA breaks. *Cell*, **141**, 243–254.
23. Stark,J.M., Pierce,A.J., Oh,J., Pastink,A. and Jasin,M. (2004) Genetic steps of mammalian homologous repair with distinct mutagenic consequences. *Mol Cell Biol*, **24**, 9305–9316.
24. Stark,J.M., Hu,P., Pierce,A.J., Moynahan,M.E., Ellis,N. and Jasin,M. (2002) ATP hydrolysis by mammalian RAD51 has a key role during homology- directed DNA repair. *J Biol Chem*, **277**, 20185–20194.
25. Han,J., Ruan,C., Huen,M.S.Y., Wang,J., Xie,A., Fu,C., Liu,T. and Huang,J. (2017) BRCA2 antagonizes classical and alternative nonhomologous end-joining to prevent gross genomic instability. *Nat. Commun.*, **8**.
26. Ahrabi,S., Sarkar,S., Pfister,S.X., Pirovano,G., Higgins,G.S., Porter,A.C.G. and Humphrey,T.C. (2016) A role for human homologous recombination factors in suppressing microhomology-mediated end joining. *Nucleic Acids Res.*, **44**, 5743–5757.
27. 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.
28. Ying,S., Hamdy,F.C. and Helleday,T. (2012) Mre11-Dependent Degradation of Stalled DNA Replication Forks Is Prevented by BRCA2 and PARP1. *Cancer Res.*, **72**, 2814–2821.
29. Mason,J.M., Chan,Y.L., Weichselbaum,R.W. and Bishop,D.K. (2019) Non-enzymatic roles of human RAD51 at stalled replication forks. *Nat. Commun.*, **10**.
30. Dumay,A., Laulier,C., Bertrand,P., Saintigny,Y., Lebrun,F., Vayssiere,J.L. and Lopez,B.S. (2006) Bax and Bid, two proapoptotic Bcl-2 family members, inhibit homologous recombination, independently of apoptosis regulation. *Oncogene*.
31. 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.
32. 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**.
33. Gunn,A., Bennardo,N., Cheng,A. and Stark,J.M. (2011) Correct end use during end joining of multiple chromosomal double strand breaks is influenced by repair protein RAD50, DNA-

- dependent protein 16 kinase DNA-PKcs, and transcription context. *J. Biol. Chem.*, **286**, 42470–82.
34. Gunn,A. and Stark,J.M. (2012) I-SceI-based assays to examine distinct repair outcomes of mammalian chromosomal double strand breaks. *Methods Mol. Biol.*, **920**, 379–391.
35. Liang,F., Han,M., Romanienko,P.J. and Jasin,M. (1998) Homology-directed repair is a major double-strand break repair pathway in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 5172–5177.
36. Zhou,Y., Caron,P., Legube,G. and Paull,T.T. (2013) Quantitation of DNA double-strand break resection intermediates in human cells. *Nucleic Acids Res.*
37. Gelot,C., Guirouilh-Barbat,J., Le Guen,T., Dardillac,E., Chailleux,C., Canitrot,Y. and Lopez,B.S. (2016) The Cohesin Complex Prevents the End Joining of Distant DNA Double-Strand Ends. *Mol. Cell*, **61**, 15–26.
38. 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.
39. Saintigny,Y., Delacôte,F., Varès,G., Petitot,F., Lambert,S., Averbeck,D. and Lopez,B.S. (2001) Characterization of homologous recombination induced by replication inhibition in mammalian cells. *EMBO J.*, **20**.
40. Lambert,S. and Lopez,B.S. (2001) Role of RAD51 in sister-chromatid exchanges in mammalian cells. *Oncogene*, **20**.
41. Lambert,S. and Lopez,B.S. (2002) Inactivation of the RAD51 recombination pathway stimulates UV-induced mutagenesis in mammalian cells. *Oncogene*, **21**, 4065–4069.
42. Wilhelm,T., Magdalou,I., Barascu,A., Techer,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 U S A*, **111**, 763–768.
43. 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.
44. Brouwer,I., Moschetti,T., Candelli,A., Garcin,E.B., Modesti,M., Pellegrini,L., Wuite,G.J. and Peterman,E.J. (2018) Two distinct conformational states define the interaction of human RAD51-ATP with single-stranded DNA. *EMBO J.*, 10.15252/embj.201798162.
45. Sugiyama,T. and Kantake,N. (2009) Dynamic Regulatory Interactions of Rad51, Rad52, and Replication Protein-A in Recombination Intermediates. *J. Mol. Biol.*, **390**, 45–55.
46. Wu,Y., Kantake,N., Sugiyama,T. and Kowalczykowski,S.C. (2008) Rad51 protein controls Rad52-mediated DNA annealing. *J. Biol. Chem.*, **283**, 14883–14892.
47. 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**.
48. Reddy,G., Golub,E.I. and Radding,C.M. (1997) Human Rad52 protein promotes single-strand DNA annealing followed by branch migration. *Mutat. Res. - Fundam. Mol. Mech. Mutagen.*, **377**, 53–59.
49. Ceccaldi,R., Liu,J.C., Amunugama,R., Hajdu,I., Primack,B., Petalcorin,M.I.R., O'Connor,K.W.,

- Konstantinopoulos,P.A., Elledge,S.J., Boulton,S.J., *et al.* (2015) Homologous-recombination-deficient tumours are dependent on Pol θ -mediated repair. *Nature*, **518**, 258–62.
50. 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.
51. Shinohara,A., Shinohara,M., Ohta,T., Matsuda,S. and Ogawa,T. (1998) Rad52 forms ring structures and co- operates with RPA in single-strand DNA annealing. *Genes to Cells*, **3**, 145–156.
52. 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. U. S. A.*, **95**, 6049–6054.
53. Chaudhury,I., Stroik,D.R. and Sobeck,A. (2014) FANCD2-Controlled Chromatin Access of the Fanconi- Associated Nuclease FAN1 Is Crucial for the Recovery of Stalled Replication Forks. *Mol. Cell. Biol.*, **34**, 3939–3954.

FIGURES

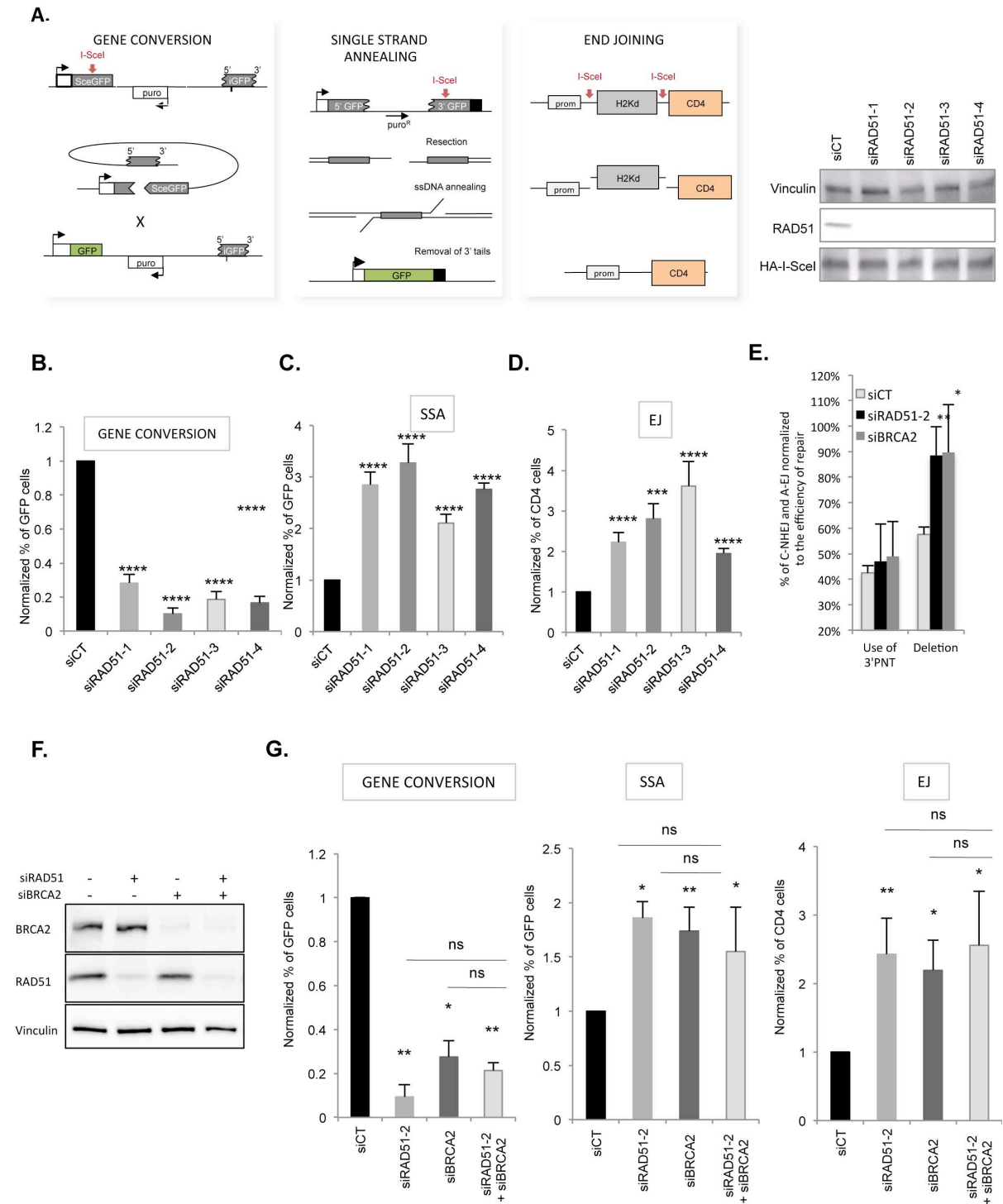


Figure 1. Impact of RAD51 and BRCA2 on the GC versus SSA and A-EJ balance. **A.** Three intrachromosomal substrates were used to monitor gene conversion, SSA or EJ (both C-NHEJ and A-EJ) on a DSB generated by the meganuclease I-SceI. Right panel: Efficiency of the four RAD51 siRNAs and expression of I-SceI. **B, C, and D.** Impact of RAD51 siRNAs on gene conversion (B) SSA (C) and EJ (D). The values are shown normalized to the control siRNA (in

black) and represent the average \pm SEM of at least 5 independent experiments. **E.** Sequences of the repair junctions from the EJ events after RAD51 or BRCA2 depletion. The use of the four 3'-protruding nucleotide generated by I-SceI corresponds to C-NHEJ, while A-EJ generates deletions at the junction (5, 6, 13, 32). **F.** Silencing of RAD51 and BRCA2. **G.** Impact of simultaneous depletion of RAD51 and BRCA2 on gene conversion, SSA, and EJ. The values are shown normalized to the control siRNA (in black) and represent the average \pm SEM of at least 5 independent experiments.

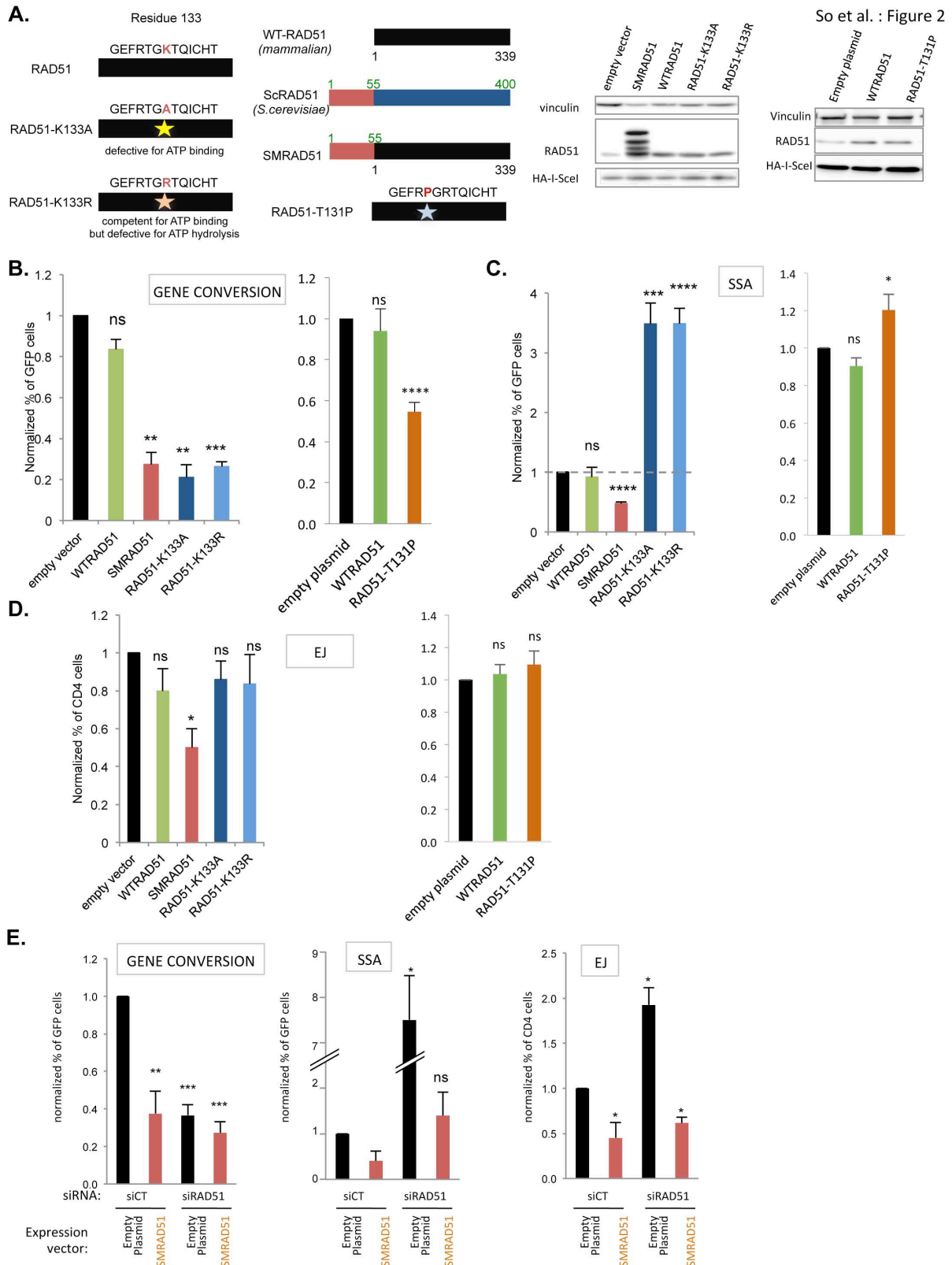


Figure 2. Impact of the different RAD51 dominant negative forms on DSB repair. A. The different RAD51 dominant negative forms: ATPm-RAD51s mutated on the K133 ATP binding

site, SMRAD51 chimera ; WT-RAD51 (mammalian), *Saccharomyces cerevisiae* ScRAD51 and the chimera SMRAD51 are aligned, revealing a block of 55 N-ter amino acids (AA) present in scRAD51 but absent from WTRAD51. SMRAD51 corresponds to the fusion of 55 N-ter from yeast to the full-length WTRAD51 (11). The RAD51-T131P corresponds to a mutation described in a patient suffering from Fanconi anemia group R (43). Right panel: Expression of the different RAD51 dominant-negative forms. **B, C, and D.** Impact of the different RAD51 dominant-negative forms on GC (B), SSA (C) and EJ (D). The values are shown normalized to the control transfected with an empty vector (in black) and represent the average \pm SEM of at least 5 independent experiments. **E.** Impact of mixed endogenous RAD51/SMRAD51 on gene conversion, SSA and EJ. SMRAD51 was expressed in cells silencing or not endogenous RAD51. The values are shown normalized to the control siRNA (in black) and represent the average \pm SEM of at least 5 independent experiments.

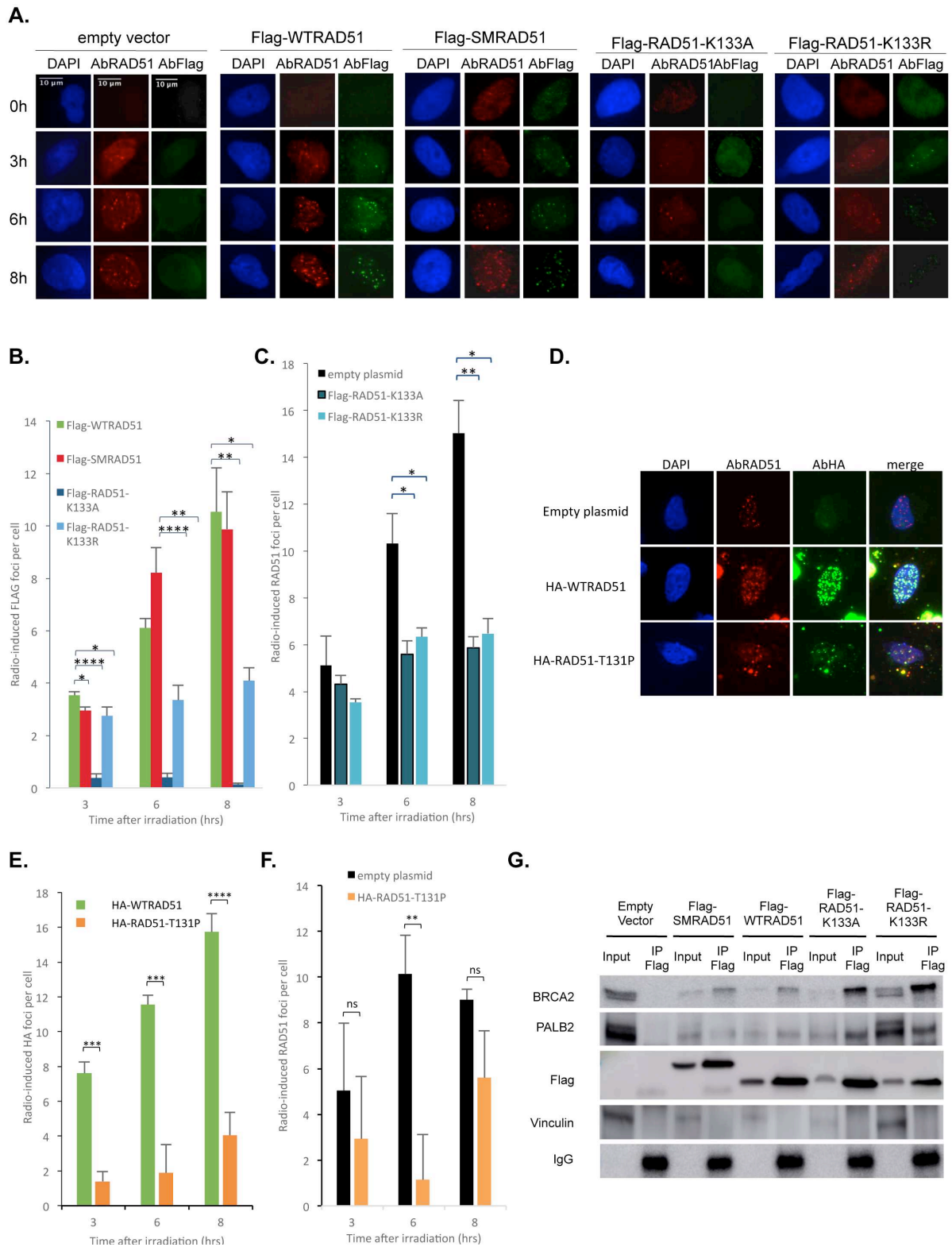


Figure 3. Binding of the different RAD51 dominant-negative forms on damaged DNA. A. Examples of RAD51 foci at different times after IR (6 Gy) revealed by anti-Flag or anti-RAD51 antibodies. **B, C.** Kinetics of IR-induced RAD51 foci revealed with an anti-Flag antibody (exogenous RAD51, panel C) or an anti-RAD51 antibody (endogenous + exogenous RAD51, panel B).

panel D). The values represent the average \pm SEM of at least 5 independent experiments. **D.** Co-immunoprecipitation experiments. 4hrs after 6Gy irradiation, cell extracts were immunoprecipitated with a Flag antibody. BRCA2 and PALB2 were then detected by Western blot . **E.** Examples of RAD51 foci at different times after IR (6 Gy) revealed by anti-HA or anti-RAD51 antibodies. **F,G.** Kinetics of IR-induced RAD51 foci revealed with an anti-HA antibody (exogenous RAD51, panel F) or an anti-RAD51 antibody (endogenous + exogenous RAD51, panel G). The values represent the average \pm SEM of at least 5 independent experiments.

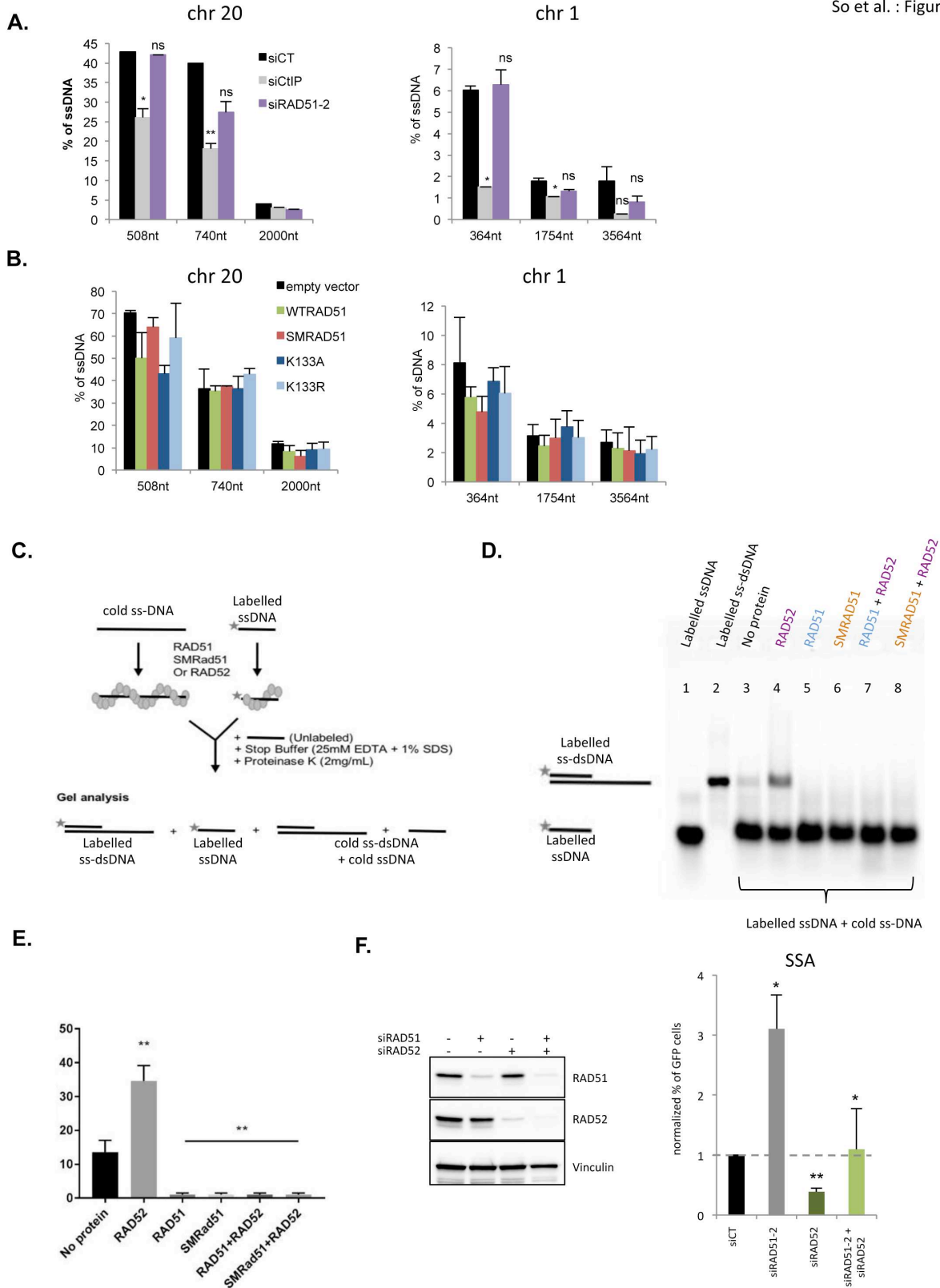


Figure 4. Impact of RAD51 on resection and annealing. A,B. Two Asi-SI sites were analysed on chromosomes 20 and 1, The values are the average \pm SEM of at least 5 independent

experiments. A. Impact of silencing RAD51 on resection. B. Impact of the dominant-negative forms of RAD51 on resection. C, D, E. Impact of RAD51 on the annealing of two complementary ssDNAs. C: Scheme of the experiments. D: Representative gel. Lanes 1 and 2 corresponds to markers (ssDNA or dsDNA). Lane 3: Incubation of two naked complementary ssDNAs. Spontaneous annealing gives a band migrating at the position of the dsDNA. Lane 4: Incubation with RAD52 favors the annealing of complementary ssDNA Lane 5,6: incubation with WTRAD51 (lane 5) or SMRAD51 (lane 6) inhibits spontaneous annealing. Lane 7,8: incubation with WTRAD51 (lane 7) or SMRAD51 (lane 8) inhibits RAD52 mediated annealing. E. Quantification of 3 experimentst (histograms represent the average \pm SEM). F. Impact of RAD52 and RAD51 depletion on SSA. The values are shown normalized to the control siRNA (in black) and represent the average \pm SEM of at least 3 independent experiments.

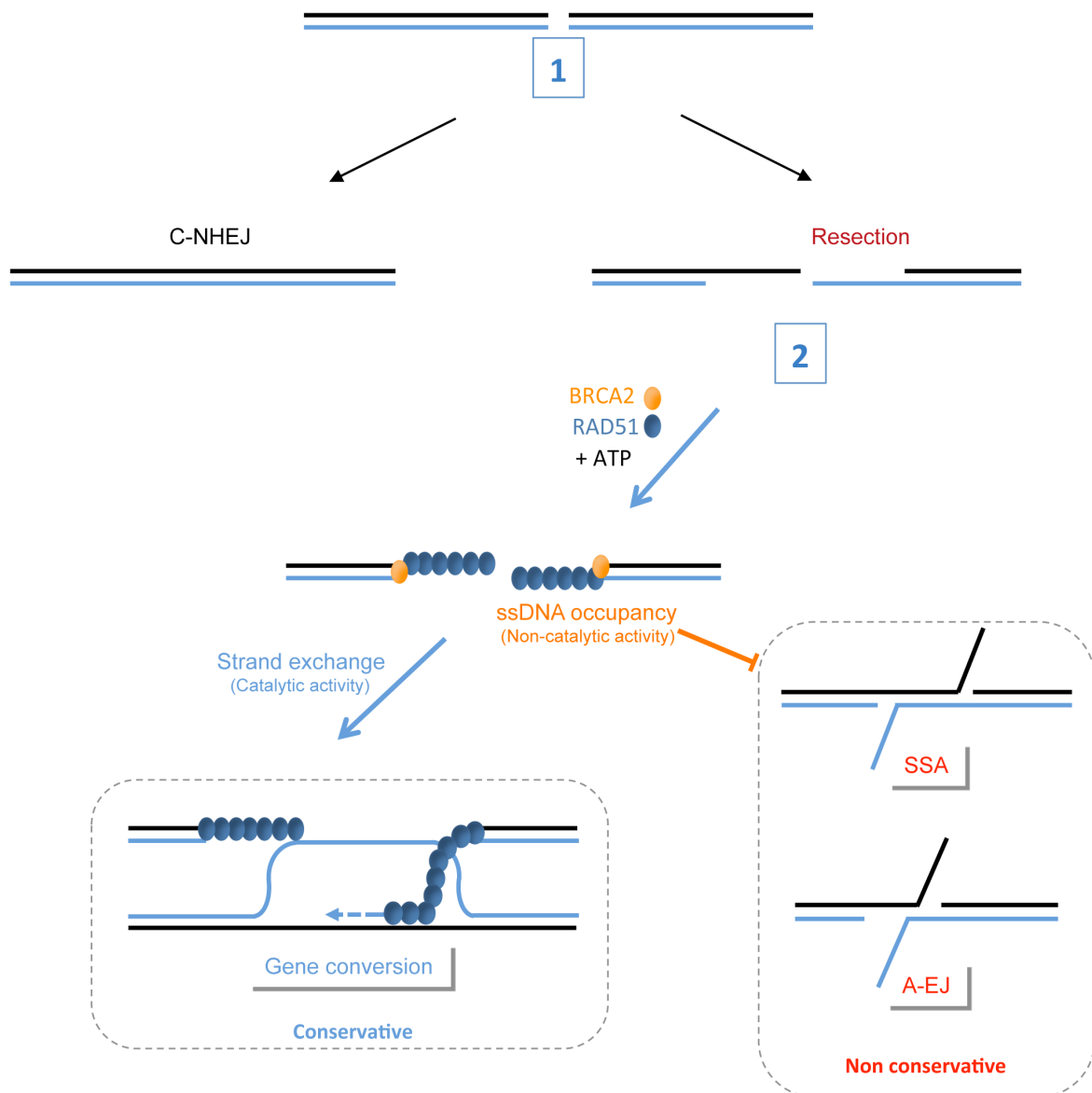


Figure 5. The roles of RAD51 for the selection of the DSB repair pathway. 1. C-NHEJ favoured by 53BP1 and Ku86/70 competes with resection on DSBs. **2.** After resection, BRCA2 loads

RAD51 onto the ssDNA in an ATP-dependent manner. The occupancy of the ssDNA by RAD51 triggers gene conversion (in a catalytic manner) and suppresses the annealing step (in a non-catalytic manner), which could be RAD52-dependent, of non-conservative SSA and A-EJ. The blockage of annealing by RAD51 does not require the strand exchange activity. Note that RAD52 might cooperate with RAD51 during GC in the capture of the second double-strand end (left panel).

Titre : Régulation des étapes précoces de la Recombinaison Homologue Humaine par BRCA2 et RAD52

Mots clés : Recombinaison Homologue, réparation de l'ADN, BRCA2, RAD52, Microscopie Moléculaire

Résumé : La recombinaison homologue (RH) est une voie majeure de réparation des CDB, elle intervient au cours de la réplication, dans le redémarrage des fourches dont la progression est bloquée par un obstacle physique tel qu'une lésion présente sur un des brins. Le mécanisme de RH est basé sur un échange génétique utilisant une séquence homologue comme modèle pour réparer, ce qui se caractérise au niveau moléculaire par la formation de structures synaptiques joignant les molécules d'ADN. Ce mécanisme se décompose en plusieurs étapes (présynaptiques, synaptiques et postsynaptiques) conservées dans l'évolution. Les recombinases (Rad51 chez les eucaryotes) sont les protéines centrales de la RH qui forment avec l'ADNsb néoformé le nucléofilament présynaptique capable de chercher et trouver les séquences homologues au

sein du génome entier. La recherche d'homologie et l'invasion de brin passent par la formation de complexes synaptiques. Une fois l'homologie trouvée, l'appariement homologue aboutit à la formation la structure de D-loop (Displacement-loop). J'ai étudié l'architecture des intermédiaires formés en microscopie électronique (ME), en présence de différents acteurs (RPA, RAD51, BRCA2, RAD52) afin de mieux comprendre leurs rôles et le jeu qui existe entre eux. J'ai montré que sans BRCA2, le nombre de filaments formés est négligeable, que RAD52 participe à la composition du filament RAD51 et augmente significativement la formation de complexes synaptiques ainsi que de D-loop. Il serait intéressant d'étudier par la suite le rôle de RAD52 dans la capture du second brin ainsi que dans la synthèse.

Title : Regulation of the early stages of Human Homologous Recombination by BRCA2 and RAD52

Keywords : Homologous Recombination, DNA repair, BRCA2, RAD52, Molecular Microscopy

Abstract : Homologous recombination (HR) is a major pathway for repairing DSB, it intervenes during replication, in the recovery of stalled and collapsed replication forks. The mechanism of HR is based on a genetic exchange using a homologous sequence as a template to accurately repair DNA, which is characterized at the molecular level by the formation of synaptic structures. This mechanism is divided into several stages (presynaptic, synaptic and postsynaptic) and they are well conserved throughout species. Recombinases (Rad51 in eukaryotes) are the core HR proteins that form the presynaptic nucleofilament capable of searching and finding homologous sequences within the entire genome. The search for homology and strand invasion involves the formation of synaptic complexes. Once homology is found, homologous

pairing results in the formation of Displacement-loop (D-loop). My thesis project aims to study the architecture of HR intermediates in the presence of different actors (RPA, RAD51, BRCA2, RAD52) in order to better understand their roles and the interplay between them. I used electron microscopy (EM) combined with biochemistry to study the different stages of HR and precisely determine the role of each actor. I showed that without BRCA2 the amount of filaments formed is negligible, RAD52 forms mixt filament with RAD51 in order to significantly increases the formation of synaptic complexes and D-loop. It would be interesting to study in the future the role of RAD52 in the capture of the second strand as well as in the synthesis.