



HAL
open science

Métabolisme des hybrides ARN ADN et sauvetage des fourches de réplication par la recombinaison homologue

Charlotte Audoinaud

► **To cite this version:**

Charlotte Audoinaud. Métabolisme des hybrides ARN ADN et sauvetage des fourches de réplication par la recombinaison homologue. Biochimie, Biologie Moléculaire. Université Paris-Saclay, 2021. Français. NNT : 2021UPASL085 . tel-03944338

HAL Id: tel-03944338

<https://theses.hal.science/tel-03944338>

Submitted on 18 Jan 2023

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.

Métabolisme des hybrides ARN:ADN et sauvetage des fourches de réplication par la recombinaison homologue

*RNA:DNA hybrids biology in the processing of dysfunctional replication
forks by homologous recombination*

Thèse de doctorat de l'université Paris-Saclay

École doctorale n° 577, structure et dynamique des systèmes vivants (SDSV)

Spécialité de doctorat : Sciences de la vie et de la santé

Graduate School : Sciences de la vie et santé. Référent : Faculté des sciences d'Orsay

Thèse préparée dans l'unité de recherche **Intégrité du Génome, ARN et Cancer**
(Université Paris-Saclay, CNRS),
sous la direction de **Sarah LAMBERT**, directrice de recherche

Thèse soutenue à Paris-Saclay, le 17 décembre 2021, par

Charlotte AUDOYNAUD

Composition du Jury

Simon SAULE Professeur, Université Paris-Saclay	Président
Jean-Charles CADORET Maître de conférences, HDR, Université Paris Diderot	Rapporteur & Examineur
Marie-Noëlle SIMON Directrice de recherche, Université Aix-Marseille	Rapporteur & Examinatrice
Sébastien BRITTON Chargé de recherche, Université de Toulouse	Examineur
Gaëlle LEGUBE Directrice de recherche, Université de Toulouse	Examinatrice
Sarah LAMBERT Directrice de recherche, Université Paris-Saclay	Directrice de thèse

Remerciements

Je tiens à remercier toutes les personnes qui ont contribué, de près ou de loin, à la réalisation de ces travaux, et qui m'ont épaulé durant ces quatre ans de thèse.

Je voudrais tout d'abord exprimer ma gratitude aux membres du jury pour avoir accepté d'évaluer mon travail. Merci à Marie-Noëlle Simon et Jean-Charles Cadoret, tous deux en charge de la relecture de ce manuscrit. Merci à Gaëlle Legube et Sébastien Britton pour leur contribution en tant qu'examineurs. Je remercie également Simon Saule d'avoir accepté de présider le jury.

Je souhaiterais aussi avoir un petit mot pour les membres de mon comité de thèse : Martin Dutertre, Stéphan Vagner, Stefania Francesconi et Philippe Pasero, mon tuteur de thèse. Merci à tous pour avoir suivi l'évolution du projet au fil des ans et pour tous vos commentaires constructifs qui ont grandement contribué à l'avancement de ces travaux.

Je remercie tous les membres de l'unité UMR3348 que j'ai eu le privilège de côtoyer durant ces années. Je ne peux tous vous citer, la liste est longue, mais je tenais à vous dire un grand merci pour tous les bons moments passés ensemble, les bons conseils et votre soutien au quotidien. J'ai une pensée pour Mounira Amor-Guéret et Stéphan Vagner, qui ont tous deux dirigés l'UMR3348 durant ma thèse, et qui m'ont confié la responsabilité d'organiser nos séminaires hebdomadaires pendant près de trois ans. Cette expérience a été très enrichissante pour moi. Merci pour la confiance que vous m'avez accordée.

Bien sûr, tout cela n'aurait pas été réalisable sans le soutien des membres de l'équipe de Sarah Lambert. Sarah, je tiens à te remercier chaleureusement de m'avoir permis d'intégrer ton équipe en tant qu'étudiante de M2, puis en tant de doctorante. Merci d'avoir cru en moi. Je te suis reconnaissante de m'avoir encadré et pour le soutien que tu as pu me témoigner dans divers projets. Tes nombreux conseils et le partage de tes connaissances au cours de ces quatre années m'ont grandement fait évoluer. Un grand merci.

J'ai eu la joie de partager le quotidien de nombreuses personnes au sein de cette équipe, et je tiens à leur témoigner à toutes mon amitié et ma gratitude. J'ai rejoint à mon arrivée un monde remplis de licornes, de Mignons et de petits cœurs... Merci Ana pour ta bonne humeur et ton aide pour la rédaction de mon mémoire de master. J'ai aussi une pensée particulière pour Anissia, qui m'a chaperonnée pendant mes premières années au sein de l'équipe. Je te suis très reconnaissante pour tout le temps que tu m'as consacré, pour ta gentillesse et pour la richesse des conseils et de l'enseignement que tu m'as prodigué.

J'ai eu la chance de passer la quasi-totalité de ces quatre années en compagnie de Karol et de Kamila. Je crains que cela n'ait malheureusement pas suffi à me faire parler un seul mot de polonais... Karol, nous sommes arrivés presque en même temps et nous avons beaucoup appris et ris ensemble. Il a été très agréable de travailler à tes côtés, je te remercie pour tout et te félicite pour le développement de ton équipe de recherche. Je tiens à souligner aussi la gentillesse et la bienveillance de Kamila, avec qui il a toujours été très facile de discuter. Je n'oublie pas Shrena, toujours souriante et agréable. Je vous souhaite à toutes les deux le meilleur pour la poursuite de vos thèses. Anne, je te remercie pour ta générosité et ta bienveillance. J'ai été ravie de pouvoir suivre avec toi les perspectives de ce projet de thèse chez les mammifères. Merci d'avoir toujours pris le temps d'en discuter avec moi, et pour tous les conseils, personnels comme professionnels, que tu m'as donné.

Même si la crise sanitaire que nous avons connue a pu menacer l'avancée du projet à un moment critique, j'ai pu maintenir le cap grâce à Karine. Nous avons commencé à travailler ensemble dans ce contexte particuliers, et je te suis extrêmement redevable de toute l'aide et du soutien que tu m'as apporté depuis au quotidien. Je suis bien consciente qu'il me faudra plusieurs vies pour arriver à rembourser ma dette en crêpes... Vincent, je t'en dois aussi une bonne quantité. Tu m'as d'ailleurs gentiment acheté une spatule pour les retourner avec soin... Je n'ai « plus qu'à » m'y mettre ! Plus sérieusement, je te remercie pour ton soutien et tous les bons moments que nous avons pu passer au labo comme en dehors.

Enfin j'ai une pensée forte pour tous les membres de ma famille et mes amis qui m'ont encouragé, soutenu, motivé tout au long de cette thèse. Votre présence et votre soutien sans faille ont été des plus précieux pour me permettre d'arriver au bout de cette aventure. Merci d'avoir cru en moi, j'espère vous avoir rendu fiers.

A tous, je vous dois beaucoup. Merci infiniment.

Table des matières

Remerciements	1
Table des matières	5
Abréviations	11
Introduction	21
I. Les dommages à l'ADN	23
1. Nature et sources des dommages à l'ADN.....	23
2. La réponse cellulaire aux dommages.....	23
2.1. Détection et signalisation.....	25
2.2. Des mécanismes de réparation adaptés.....	27
II. Zoom sur les cassures d'ADN double-brin	29
1. Comment sont-elles réparées ?.....	29
1.1. Le NHEJ ou jonction d'extrémités non-homologues.....	31
1.1.1. Le NHEJ canonique.....	31
1.1.2. Le NHEJ alternatif	33
1.2. La recombinaison homologue.....	35
1.2.1. Un modèle en trois étapes.....	35
1.2.1.1. La phase présynaptique.....	35
1.2.1.2. La phase synaptique.....	39
1.2.1.3. La phase post-synaptique.....	39
1.2.1.3.1. Le SDSA.....	41
1.2.1.3.2. Le DSBR.....	43
1.2.1.3.3. Le BIR.....	43
1.2.1.3.4. Le SSA.....	45
2. NHEJ versus HR : la régulation des deux voies de réparation.....	45
2.1. La reconnaissance des CDBs.....	45
2.2. La résection initiale.....	47
2.3. La résection extensive.....	51
III. La réparation de l'ADN lors de la réplication	53
1. Réplication et stress réplicatif.....	55
1.1. La réplication de l'ADN.....	55

1.1.1. Initiation.....	55
1.1.2. Elongation.....	59
1.1.3. Terminaison.....	61
1.2. Stress réplicatif.....	63
1.2.1. Les différentes sources de stress.....	63
1.2.2. La gestion du stress réplicatif.....	65
2. Rôle des facteurs du NHEJ dans la gestion du stress réplicatif.....	65
3. Rôle des facteurs de la RH dans la gestion du stress réplicatif.....	69
3.1. Les mécanismes de tolérance aux dommages.....	69
3.2. La réversion de fourche.....	71
3.3. La protection des fourches.....	73
3.4. La réparation des fourches cassées.....	75
IV. La présence d'ARN module la réparation des dommages de l'ADN.....	77
1. Comment et dans quels contextes sont-ils formés ?.....	77
1.1. La transcription induite par l'apparition de dommage.....	77
1.2. Un modèle très controversé.....	79
2. La composante ARN des mécanismes de réparation des CDBs.....	83
2.1. Formation de foyers de facteurs de DDR.....	83
2.2. La réparation associée à la transcription.....	85
3. Focus sur les hybrides ARN:ADN : des intermédiaires de réparation ?.....	89
3.1. Hybrides ARN:ADN et recombinaison.....	89
3.2. La dégradation des hybrides ARN:ADN.....	91
3.2.1. Les hélicases.....	91
3.2.2. Les RNase H.....	93
3.2.2.1. RNase H1.....	93
3.2.2.2. RNase H2.....	97
V. Réplication et hybrides ARN:ADN.....	101
1. Transcription et R-loop: un obstacle à l'avancée des fourches de réplication.....	101
1.1. Les collisions transcription-réplication.....	101
1.1.1. La résolution des conflits par contournement ou éviction de l'ARNPII.....	103
1.1.2. La résolution des R-loops aux sites de conflit.....	107
2. Rôle des R-loops dans la régulation de la réplication à certains loci.....	109

2.1. R-loops et maintenance des télomères.....	109
2.2. R-loops et réplication de l'ADN mitochondrial.....	113
3. Des hybrides ARN:ADN sont formés de manière canonique lors de la réplication.....	115
3.1. L'incorporation des ribonucléotides par les polymérase répliquatives.....	115
3.1.1. La voie de RER ou Ribonucleotide Excision Repair.....	115
3.1.2. Incorporation de ribonucléotides : des conséquences bénéfiques ?.....	117
3.2. Les amorces des fragments d'Okazaki.....	119
3.2.1. Modèles de maturation de courts et longs flaps.....	119
3.2.2. Le retrait des amorces ARN par RNase H2.....	121
VI. Objectif et système expérimental.....	123
1. Objectif principal.....	123
2. Système expérimental.....	125
2.1. <i>S. pombe</i> est un organisme modèle.....	125
2.2. Un système de blocage de fourche conditionnel chez <i>S. pombe</i>	127
3. Rôle des hybrides ARN:ADN à la <i>RTS1</i> -RFB ?.....	131
Résultats.....	133
I. Publication #1.....	137
II. Publication #2.....	217
III. Résultats supplémentaires.....	245
Discussion.....	249
I. En résumé.....	251
II. Influence de l'ARN sur le redémarrage des fourches bloquées.....	253
1. Ku se fixe aux extrémités double-brin de type ARN:ADN.....	253
2. La présence d'ARN module l'étape de résection des brins naissants.....	255
III. Origine des hybrides ARN:ADN en réponse au stress répliquatif : plusieurs types d'hybrides ?.....	259
IV. AGS : vers une meilleure compréhension des origines de la pathologie.....	263
V. Syndromes inflammatoires et DDR.....	269
1. Senseurs de dommage à l'ADN... et d'acides nucléiques cytoplasmiques.....	269
2. Stress répliquatif et réponse immunitaire.....	271
VI. Conclusion.....	273
Bibliographie.....	277

Abréviations

2DGE	Electrophorèse sur gel bidimensionnelle
53BP1	p53-binding protein 1
A	Adénine
ADAR1	Adenosine Deaminase Acting on RNA 1
ADN sb/db	Acide désoxyribonucléique simple ou double-brin
ADNc	ADN complémentaire
ADNmt	ADN mitochondrial
Ago	Argonaute
AGS	Syndrome d'Aicardi-Goutières
ALT	Alternative Lengthening of Telomeres
Alt-EJ	Alternative Non-Homologous End-Joining
APE1	AP endonucléase 1
Apn2	DNA-(apurinic or apyrimidinic site) endonuclease 2
ARN sb/db	Acide ribonucléique simple ou double-brin
ARNm	ARN messenger
ARNP (I, II, III)	ARN polymérase
ARS	Autonomously Replicating Sequences
ASTE1	Asteroid Homolog 1
ATAD5	ATPase Family AAA Domain Containing 5
ATM	Ataxia-Telangiectasia Mutated
ATP	Adénosine triphosphate
ATR	ATM- and Rad3-related
ATRIP	ATR-Interacting Protein
BER	Base Excision Repair
BIR	Break-Induced Replication
BLM	Bloom Syndrome RecQ Like Helicase
B-NHEJ	backup NHEJ
BRCA (1 et 2)	Breast cancer
C	Cytosine
C. elegans	Caenorhabditis elegans
CARD9	Caspase Recruitment Domain Family Member 9
CDB se/de	Cassure double-brin à simple ou double extrémités
Cdc (6, 7, 18...)	Cell Division Cycle
CDK (1 et 2)	Cyclin-dependent kinase
Cds1	CDP-Diacylglycerol Synthase 1

CDT1	Chromatin licensing and DNA replication factor 1
cGAS	Cyclic GMP-AMP synthase
ch (I, II, III)	Chromosome
ChIP	Chromatin-immunoprecipitation
CHK (1 et 2)	Checkpoint kinases
CMG	Cdc45-MCM-GINS complex
CO	Cross-over
CpG	dinucléotide CpG
CSA, CSB	Cockayne syndrome protein A ou B
CtIP	CtBP-interacting protein
DDK	DBF4-dependent kinase
DDR	DNA Damage Repair pathways
DDRNAs	DDR-RNAs
DDX (5, 21, ...)	DEAD-box
DHX9	DExH-Box Helicase 9
diIncRNAs	Damage-induced long non-coding RNAs
dJH	Double jonction de Holliday
D-loop	Displacement loop
DNA2	DNA Replication Helicase/Nuclease 2
DNA-PK	DNA-dependent protein kinase
DNA-PKcs	DNA-dependent protein kinase catalytic subunit
DNase	Désoxyribonucléase
dNTP	Désoxyribonucléoside triphosphate
DSBR	Double Strand Break Repair
E. coli	Escherichia coli
EME1	Essential Meiotic Structure-Specific Endonuclease 1
ERCC1	Excision repair cross-complementation group 1
Exo1	Exonucléase 1
FA	Fanconi anemia
FANC (J, M, ...)	Fanconi anemia complementation group
FBH1	F-Box DNA Helicase 1
FEN1	Flap endonucléase 1
Fft3	Fission yeast Fun Thirty
Fun30	Function unknown 30
G	Guanine
Gen1	Gen endonuclease homolog 1
GINS	Go-ichi-ni-san complex
GFP	Green Fluorescent Protein
H2A	Variant d'histone H2A
HBD	Hybride binding domain

HELQ-1	Helicase, POLQ Like 1
HU	Hydroxyurée
kb, Mb	Kilo et Mega-base
Ku	Ku70-Ku80 heterodimer
Lig (1, 3, 4)	ADN Ligase
LINP1	LncRNA In Non-Homologous End Joining Pathway 1
LRIK	LncRNA interacting with Ku
Mat	Mating type locus
MCM	Minichromosome maintenance protein complex
MCT-1	Monocarboxylate transporter 1
MDA5	Melanoma differentiation-associated protein 5
Mec1	Mitosis entry checkpoint 1
miARN	Micro-ARN
min	Minute
MLH1-PMS	MutL homolog 1 - Postmeiotic Segregation Increased 2
MMEJ	Microhomology-mediated end joining
MMR	MisMatch Repair
MPS1	Mat1 replication pause site 1
Mre11	Meiotic recombination 11
MRN/MRX	Mre11-Rad50-Nbs1 ou -Xrs2
MSH (2, 3, 6)	MutS homolog
MTS	Mitochondrial Targeting Sequence
NER (TC-NER et GG-NER)	Transcription-Coupled ou Global Genome Nucleotide Excision Repair
NHEJ	Non-Homologous End-Joining
Nbs1	Nijmegen breakage syndrome 1
ORC (1 à 6)	Origin recognition complex
PARP1	Poly(ADP-ribose) polymérase 1
pb	Paire de bases
PCNA	Proliferating cell nuclear antigen
Phase G1	Phase 'Gap 1'
Phase G2	Phase 'Gap 2'
Phase M	Phase de la mitose
Phase S	Phase de synthèse
PIF1	Petite Integration Frequency 1
PNUTS-PP1	Phosphatase 1 NUclear Targeting Subunit - Protein phosphatase 1
Pol $\alpha/\beta/\epsilon/\Delta$	ADN polymérase
POLRMT	Polymerase (RNA) mitochondrial
pré-IC	Complexe de pré-initiation
pré-RC	Complexe de pré-réplication

PRIMPOL	Primase and polymerase (DNA-directed)
PTIP	Pax transactivation domain-interacting protein
Rad (50, 51, ...)	Radiation sensitive
Rdh54	RAD homolog 54
rDNA	ADN ribosomal
REC	Recombination Execution Checkpoint
RecA	Recombinase A
RecQ5	RecQ-like type 5
RED	Ribonucleotide Excision-Defective
RER	Ribonucleotide Excision Repair
RFB	Replication Fork Barrier
RFC	Replication Factor-C
RH	Recombinaison Homologue
RIF (1 et 2)	Rap1-interacting protein
RISC	RNA-induced silencing complex
RITOLS	Ribonucleotide Incorporation ThroughOut the Lagging Strand
RNase	Ribonucléase
ROS	Reactive Oxygen Species
RPA	Replication Protein A
Rtf (1 et 2)	Replication termination factor
RT-PCR	Reverse Transcription - Polymerase Chain Reaction
RTS1	Replication Terminator Sequence 1
S. cerevisiae	Saccharomyces cerevisiae
S. pombe	Schizosaccharomyces pombe
Sae2	Sporulation in the absence of SPO11 protein 2
SAMHD1	SAM domain and HD domain-containing protein 1
SDSA	Synthesis Dependant Strand Annealing
Sgs1	Slow growth suppressor 1
site AP	Site apurique/apyrimidique
SLE	Systemic Lupus Erythematodus
SMARCAD1	SWI/SNF-Related, Matrix-Associated Actin-Dependent Regulator Of Chromatin, Subfamily A, Containing DEAD/H Box 1
SMARCAL1	SWI/SNF Related, Matrix Associated, Actin Dependent Regulator Of Chromatin, Subfamily A Like 1
Snf2	Sucrose Non-Fermentable
Srs2	Suppressor of Rad Six 2
SSA	Single-Stranded Annealing
STING	Stimulator of Interferon Genes
Swi (1, 2, 3)	SWItch
T	Thymine

TA-HRR	Transcription-Associated Homologous Recombination Repair
Tdp1	Tyrosyl-DNA phosphodiesterase 1
Tel1	TELOmere maintenance 1
TERRA	TElomeric Repeat-containing RNA
TIRR	Tudor interacting repair regulator
TLC1	TeLomerase Component 1
Top1	Topoisomerase I
TRC	Transcription-replication collisions
TREX1	Three Prime Repair Exonuclease 1
Ubc13	Ubiquitin-conjugating enzyme 13
Uls1	Ubiquitin ligase for SUMO conjugates protein 1
UV	Ultraviolet
UV-DDB	UV-damaged DNA-binding protein
WDR82	WD Repeat Domain 82
WRN	Werner
XAB2	XPA-interacting factor 2
XLF	XRCC4-like factor
XP (C, F, G)	Xeroderma pigmentosum group
XRCC (1 à 4)	X-ray repair cross-complementing protein
Xrn2	5'-3' Exoribonuclease 2
Xrs2	X-Ray Sensitive 2
Yra1	Yeast RNA Annealing protein 1
µm, nm	Micro- et nano- mètre

INTRODUCTION

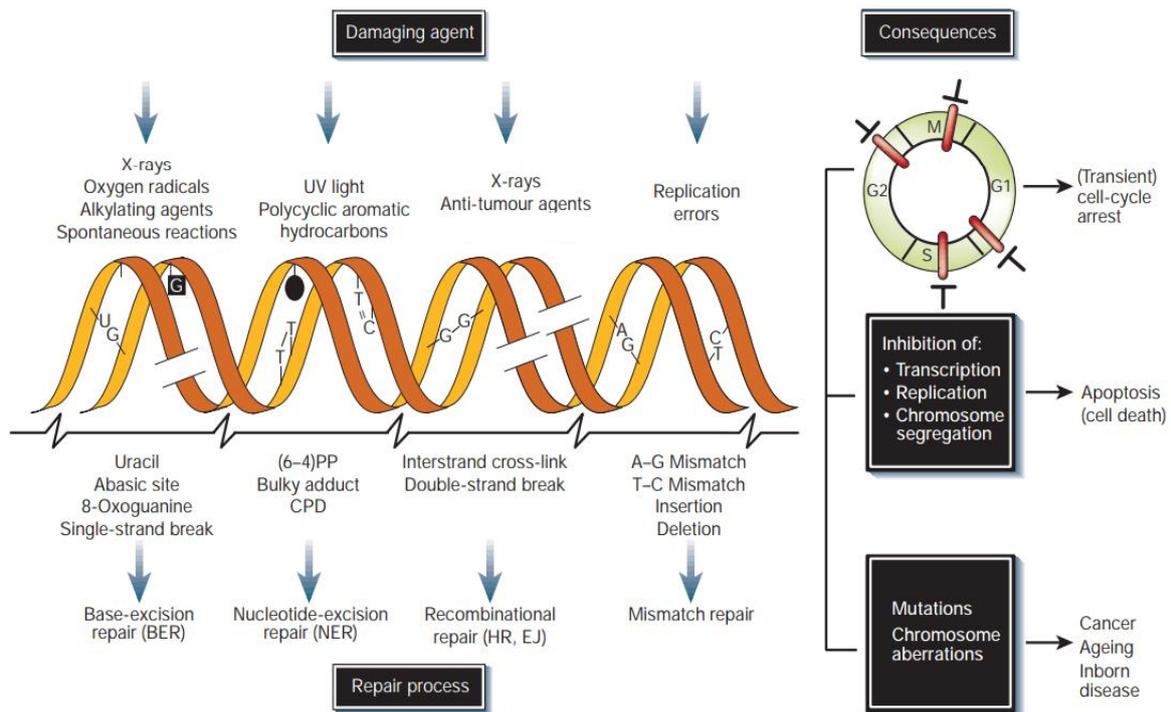


Figure 1. Nature et sources de dommages à l'ADN, et leurs principaux mécanismes de réparation.

La partie gauche représente les sources de dommages les plus communes ainsi que les différents types de lésions qu'elles induisent. Pour chaque type de lésion, les mécanismes de réparation principaux sont indiqués en dessous. Ces mécanismes de réparation seront détaillés par la suite dans le texte. La partie droite de la figure schématise les conséquences des dommages à l'ADN sur la progression du cycle cellulaire et le métabolisme de la cellule, et évoque dans sa partie basse les conséquences à plus long terme si les dommages persistent. Modifiée de (Hoeijmakers, 2001).

I. Les dommages à l'ADN

L'ADN est le support de l'information génétique chez tous les êtres vivants. Sa structure en double hélice se forme *via* l'appariement de deux brins complémentaires associés de manière antiparallèle. La bonne conservation et la transmission correcte de l'information génétique repose sur le maintien strict de cette structure hélicoïdale et de la complémentarité deux à deux des bases azotées qui la composent.

L'intégrité du génome est pourtant constamment mise à mal au cours de la vie des cellules. Ces dernières sont soumises à une grande variété de stress, d'origine exogène comme endogène, qui peuvent conduire à l'apparition de dommages à l'ADN et causer une instabilité génomique.

1. Nature et sources des dommages à l'ADN

Les lésions à l'ADN peuvent être causées par une diversité d'agents dits génotoxiques, à l'origine d'un large spectre de dommages. Ces dommages vont de la simple modification de base à l'altération de la structure de l'hélice d'ADN, *via* des pontages intra- ou inter-brins, jusqu'aux cassures simple ou double-brin ([Figure 1](#)). Parmi les sources de stress subies par l'environnement, on retrouve entre autres les rayonnements ultraviolets (UVs), les radiations ionisantes ou encore les agents chimiques mutagènes.

Il est intéressant de noter que certains agents génotoxiques sont des produits naturels du métabolisme cellulaire. On y compte ainsi les espèces réactives de l'oxygène ou 'ROS' générées lors du métabolisme aérobie ou en cas de réponse inflammatoire. De plus, le métabolisme de l'ADN lui-même est source de dommages. Ainsi, les polymérases en charge de la réplication fidèle de l'ADN commettent parfois des erreurs qui rompent la complémentarité entre les deux brins : mésappariement(s) ; insertion ou délétion de base(s) ; incorporation de ribonucléotide(s).

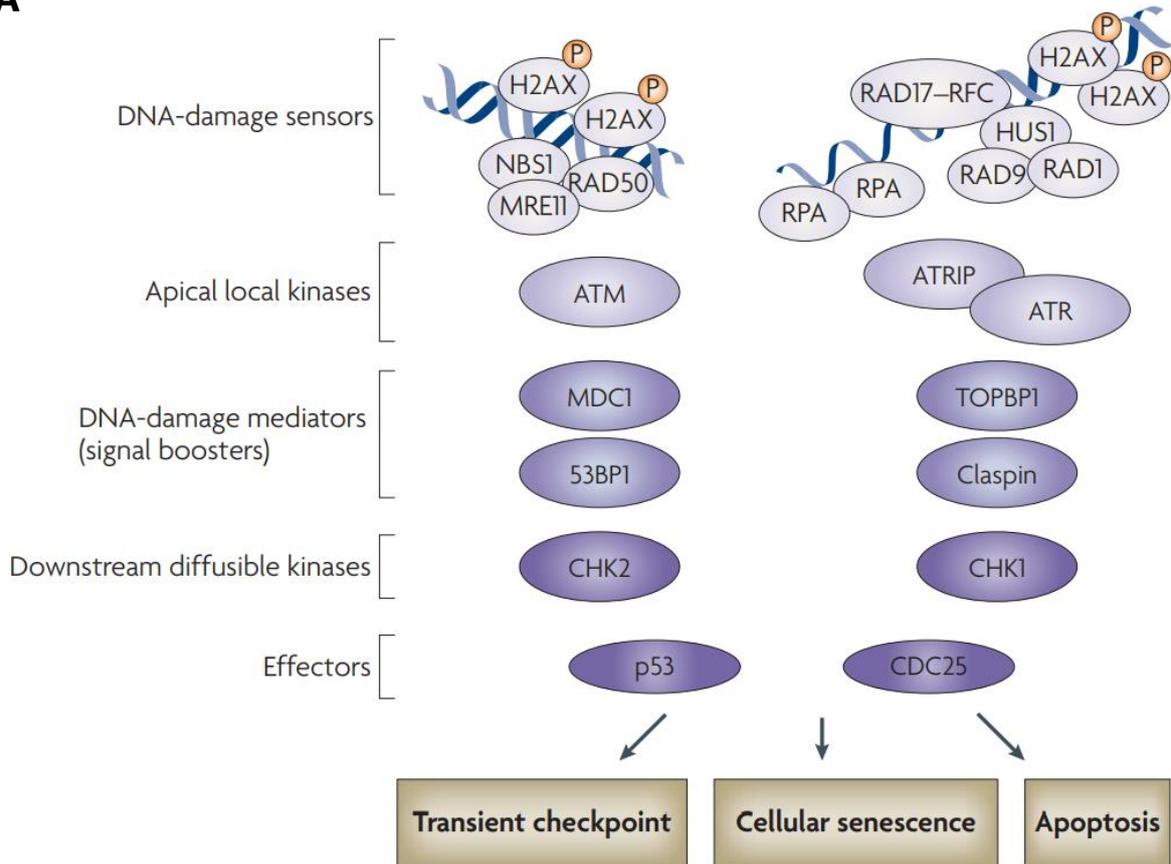
L'exposition au stress et l'apparition de dommages étant inhérents à la vie des cellules, il est indispensable pour ces dernières d'avoir la capacité de détecter, signaler et enfin réparer avec la plus grande efficacité les lésions à l'ADN.

2. La réponse cellulaire aux dommages

Afin de parer aux diverses menaces pesant sur le maintien de l'intégrité de leur génome, les cellules ont acquis au cours de l'évolution un ensemble de mécanismes de réponse aux dommages (DDR ; *DNA Damage Repair pathways*).

Des dérégulations dans ces mécanismes de signalisation et réparation résultent en la présence de dommages pas ou mal réparés. Dans certains cas, la persistance de ces

A



B

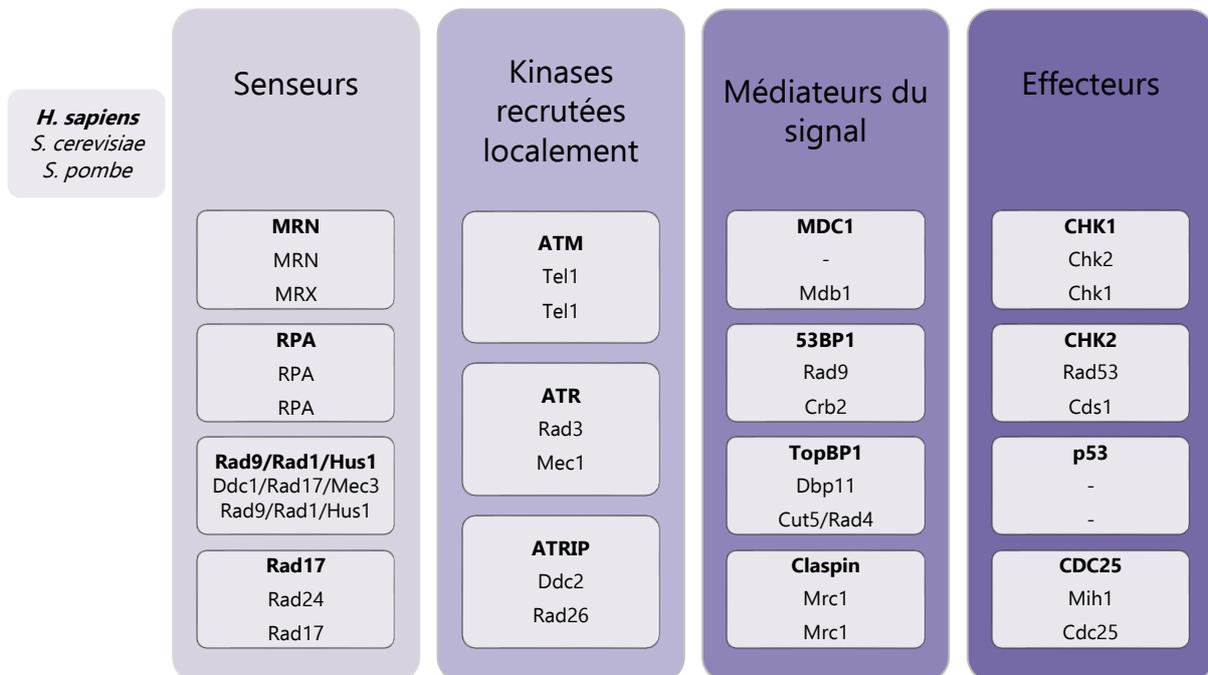


Figure 2. La signalisation des dommages à l'ADN : les facteurs clés de la voie du DDR. (A) D'après (D'Adda Di Fagagna, 2008). (B) Les protéines orthologues des facteurs humain (en gras) sont indiquées chez *S. cerevisiae* et *S. pombe*.

dommages se traduit par une instabilité génomique accrue, caractéristique de nombreuses maladies génétiques et cancers chez l'homme (Hoeijmakers, 2001).

Néanmoins, force est de constater que tous les dommages ne sont pas source d'instabilité et que parfois l'apparition et le maintien de mutations servent de moteur à l'évolution des espèces. A chaque formation de dommage, c'est donc un équilibre finement régulé entre diversité génétique et maintien de la stabilité du génome qui est remis en jeu.

2.1. Détection et signalisation

La reconnaissance d'un dommage à l'ADN met en place une voie de signalisation qui optimise les conditions cellulaires pour la réparation du dommage. Un réseau de protéines 'senseurs' identifie la lésion et active la transduction du signal jusqu'à un ensemble de protéines effectrices qui vont ralentir voire arrêter le cycle cellulaire et stimuler la réparation ([Figure 2](#)).

Les senseurs de la machinerie de surveillance vont reconnaître les distorsions de la double hélice, ainsi que des défauts d'intégrité comme les cassures d'ADN double-brin (ADNdb) et l'exposition d'ADN simple-brin (ADNsb). Une fois identifié par des senseurs spécialisés, on observe au site de dommage le recrutement et l'activation des kinases ATM (*Ataxia-Telangiectasia Mutated*) et ATR (*ATM- and Rad3-related*, kinase paralogue d'ATM; associée à *ATR-Interacting Protein* ou ATRIP). Plus précisément, les cassures double-brin sont détectées par le complexe MRN (Mre11-Rad50-Nbs1 chez les mammifères et *S. pombe*; Mre11-Rad50-Xrs2 ou MRX chez *S. cerevisiae*). Via son interaction avec la sous-unité Nbs1, la kinase ATM est recrutée au dommage et s'auto-phosphoryle (Uziel *et al.*, 2003). L'ADN simple-brin est lui recouvert de RPA (*Replication Protein A*), induisant le recrutement d'ATR-ATRIP (Zou & Elledge, 2003).

Le recrutement au site du dommage de ces kinases est une étape incontournable pour la nucléation des facteurs du DDR. Leur présence entraîne localement la phosphorylation du variant d'histone H2A (γ H2AX), formant ainsi une plateforme au recrutement de facteurs médiateurs de la transduction du signal (Paull *et al.*, 2000; I. M. Ward & Chen, 2001; Burma *et al.*, 2001). Ces facteurs vont permettre d'augmenter l'activité des kinases ATM et ATR en favorisant la propagation de la marque γ H2AX et le recrutement en masse de facteurs de signalisation. On assiste alors à la formation de foyers de facteurs du DDR.

ATM et ATR vont induire la phosphorylation de leurs cibles respectives, CHK2 et CHK1 (*CHeckpoint Kinase 1 et 2*). Une fois activées, ces kinases qualifiées d'effectrices vont diffuser dans le noyau et phosphoryler à leur tour des protéines cibles impliquées, entre

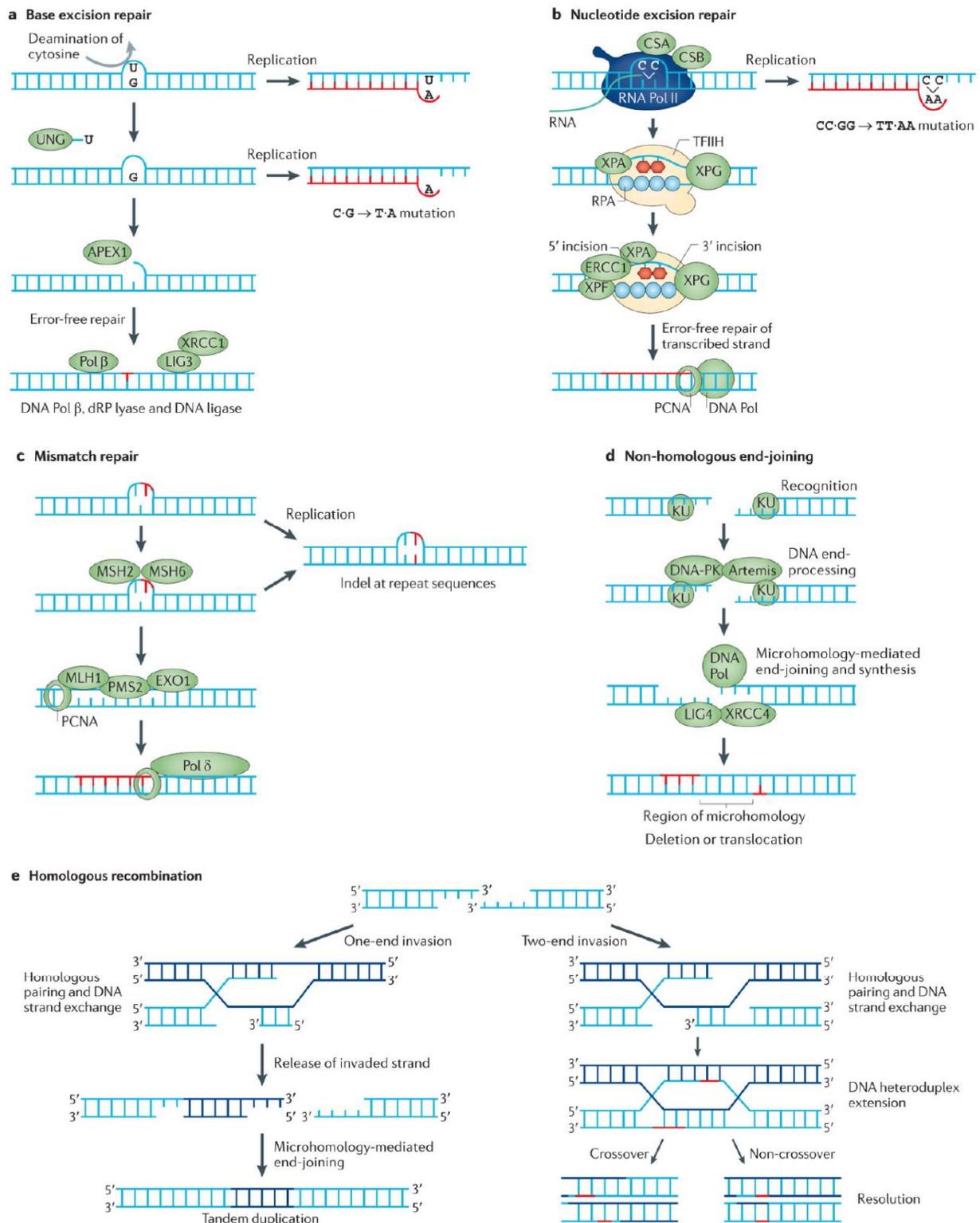


Figure 3. Les voies de réparation des dommages à l'ADN. (A) BER : réparation par excision de base (B) NER : réparation par excision de nucléotide (C) MMR : réparation de mésappariement de bases (D) NHEJ : réparation par ligature d'extrémités non-homologues (E) HR : réparation par recombinaison homologue. D'après (Helleday *et al.*, 2014).

autres, dans le ralentissement du cycle cellulaire et le recrutement/l'activation des facteurs de réparation (Bartek & Lukas, 2003).

2.2. Des mécanismes de réparation adaptés

En fonction du type de dommage détecté et signalé, différentes voies de réparation sont activées et prennent en charge la lésion ([Figure 3](#)). Chacune est spécifique à un type de dommage donné, mais elles n'en restent pas moins complémentaires entre-elles.

Plusieurs voies permettent de réparer des dommages nucléotidiques et simple-brin de l'ADN : la réparation par excision de base (BER; *Base Excision Repair*), la réparation par excision de nucléotide (NER; *Nucleotide Excision Repair*) et la réparation des mésappariements (MMR; *MisMatch Repair*). Les dommages peuvent être également des cassures double-brin (CDB) de l'ADN. Les mécanismes de réparation des CDBs seront présentés plus en détails dans la section suivante.

BER ([Figure 3a](#)). Les bases endommagées par des modifications de type alkylation ; désamination ou oxydation sont excisées et remplacées par le BER. Ces lésions, bien qu'elles n'altèrent pas le squelette de l'hélice d'ADN, n'en sont pas moins toxiques car elles peuvent interférer avec les processus de réplication et de transcription. Le BER est initié par des ADN glycosylases, dont l'identité est spécifique à chaque type de modifications, et dont le mode d'action consiste à exciser la base endommagée, créant des sites apuriques/aprimidiques (sites AP) (Krokan *et al.*, 1997). Ces sites sont reconnus et clivés par l'AP endonucléase 1 (APE1). L'ADN polymérase β peut ainsi incorporer un (*short-patch* BER) ou plusieurs nucléotides (*long-patch* BER, jusqu'à 13 nucléotides, avec l'aide de l'ADN polymérase δ) (Fortini & Dogliotti, 2007). Dans le cas du *short-patch* BER, le complexe XRCC1 (*X-ray Repair Cross-Complementing protein 1*) – ADN ligase 3 (Lig3) permet de relier le nucléotide nouvellement incorporé au nucléotide adjacent. L'intégration de plusieurs nucléotides lors du *long-patch* BER requiert l'intervention de la flap endonucléase 1 (FEN1) pour enlever l'ancien brin, déplacé par la polymérase δ . La ligature du brin nouvellement synthétisé se fait dans ce cas-là grâce à l'ADN ligase 1 (Lig1).

NER ([Figure 3b](#)). Les facteurs du NER reconnaissent une grande variété de lésions (dimères de thymines, pontages intra-brin...) se traduisant par une distorsion de la double hélice d'ADN. Il existe deux modes de réparation par le NER, divergents sur le mode de reconnaissance du dommage : le TC-NER (*Transcription-Coupled* NER) et le GG-NER (*Global Genome* NER) (Marteijn *et al.*, 2014). Le premier mode est initié par les protéines CSB et CSA (*Cockayne Syndrome B / A*) lorsque l'ARN polymérase II (ARNPII) rencontre et bloque sur une lésion au niveau des gènes transcrits. Le second élimine

les lésions sur tout le génome à travers l'activation de XPC (*Xeroderma Pigmentosum C*) ou UV-DDB (*UV-Damaged DNA Binding protein*). Indépendamment du mode de NER engagé, la réparation consiste dans un premier temps à exciser un court fragment simple-brin contenant la lésion, *via* l'action des endonucléases XPF-ERCC1 et XPG. Le brin d'ADN complémentaire restant sera alors utilisé comme matrice par des ADN polymérases (Pol δ , Pol ϵ , Pol κ). Le site de lésion retrouvera son intégrité après ligature par Lig1 ou le complexe XRCC1– Lig3. Le NER a été beaucoup étudié chez l'homme car c'est le mécanisme majeur de réparation des lésions induites par les irradiations UVs. Des mutations de la voie de GG-NER prédisposent à l'apparition de cancers de la peau, et les défauts de TC-NER sont à l'origine d'un large spectre de pathologies allant d'une forte sensibilité aux UVs jusqu'au syndrome de Cockayne.

MMR (Figure 3c). Le MMR est la voie de réparation des erreurs d'incorporation de bases qui se produisent lors de la réplication ou la recombinaison de l'ADN (Kunkel & Erie, 2005). Ces erreurs incluent les mésappariements, les insertions et les délétions de bases. Les composants principaux de cette voie de réparation sont les protéines homologues de MutS (MSH) et de MutL (MLH-PMS), très conservées au cours de l'évolution. Chez l'homme, les hétérodimères MSH2-MSH6 et MSH2-MSH3 (appelés MutS α et MutS β , respectivement) forment des anneaux glissants qui sondent l'ADN jusqu'à détecter une lésion. MutS α détecte les mésappariements et insertion/délétion courtes (un ou deux nucléotides) alors que MutS β va reconnaître les sites d'insertion/délétion plus longs. La détection de ces lésions induit le recrutement du complexe MLH1-PMS, dont l'activité endonucléase permet de faire un clivage et offrir un point d'entrée à l'exonucléase Exo1, qui dégrade le brin endommagé. La synthèse d'un nouveau brin d'ADN est assurée par les polymérases répliquatives Pol δ et Pol ϵ . Ce brin est ensuite relié au duplex matrice par Lig1.

II. Zoom sur les cassures d'ADN double-brin

1. Comment sont-elles réparées ?

La réparation correcte des CDBs est d'une importance majeure pour les cellules. Le cas échéant, elles peuvent conduire à l'apparition d'aberrations chromosomiques comme l'aneuploïdie, la perte d'hétérozygotie ou encore des translocations chromosomiques. Ces événements sont intimement liés à l'apparition et au développement des cancers. Il existe deux moyens de réparer les CDBs chez les eucaryotes. La réparation peut se faire par réassociation des extrémités séparées par la cassure (*PTIT*NHEJ), (Figure 3d). Aussi, la réparation repose sur le mécanisme plus complexe de Recombinaison Homologue (RH), où une séquence homologue non-endommagée sert de matrice à la réparation (Figure 3e).

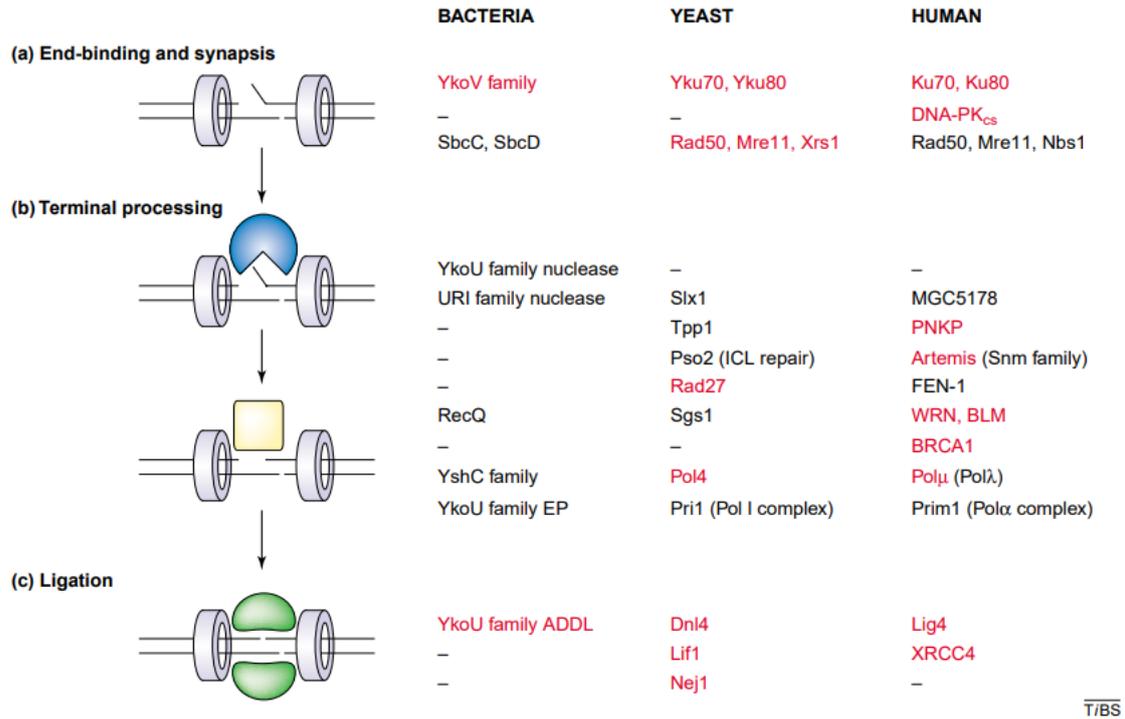


Figure 4. Principe du NHEJ et liste non exhaustive des facteurs clés associés, chez les procaryotes et eucaryotes. L'implication directe des protéines/domaines indiqués en rouge a été montré par des analyses génétiques ou biochimiques. Il est à noter que la plupart des ligases bactériennes associées à Ku contiennent des domaines nucléase et primase putatifs et sont donc multifonctionnelles. Abréviations : ADDL, ATP-dependent DNA ligase; BLM, Bloom syndrome helicase; EP, eukaryotic-type primase; ICL, inter-strand cross-link; PNKP, polynucleotide kinase–30 phosphatase complex; URI, UvrC-intron-type endonuclease; WRN, Werner syndrome helicase. D'après (Wilson *et al.*, 2003).

1.1. Le NHEJ ou jonction d'extrémités non-homologues

Le NHEJ repose sur la ligature de deux extrémités double-brin, ne présentant que peu ou pas d'homologie (0-4pb). Ce mécanisme de réparation est très bien conservé au cours de l'évolution, puisqu'il existe chez certains procaryotes (Weller *et al.*, 2002) et chez les eucaryotes (Figure 4). C'est la voie de réparation principale des CDBs chez les mammifères, mais la présence de ses facteurs clés chez tous les eucaryotes rend son étude possible dans différents organismes modèles, notamment chez les levures (Dudášová *et al.*, 2004).

1.1.1. Le NHEJ canonique

Lorsqu'une cassure double-brin à double extrémités (CDB-de) survient, les deux extrémités peuvent s'éloigner. Le processus de réparation doit alors être initié par la reconnaissance et le rapprochement de ces extrémités, formant une synapse propice à la ligature. Il est proposé que cette synapse se forme en deux temps, avec d'abord la reconnaissance des extrémités puis leur rapprochement/alignement. A ce jour, les modèles diffèrent encore quelque peu concernant l'identité des facteurs impliqués à chaque étape et leur rôle précis (Graham *et al.*, 2016; B. Zhao *et al.*, 2019).

Il est néanmoins communément admis que le facteur de reconnaissance initial des CDBs est l'hétérodimère Ku70-Ku80 (Ku). Ku est présent chez tous les eucaryotes, où il est très abondamment exprimé, ainsi que chez les procaryotes (Downs & Jackson, 2004). Ku se fixe avec une très bonne affinité sur les extrémités d'ADNdb, indépendamment de leur séquence. Grâce à sa structure en anneau, il peut glisser le long du double-brin. Sur une structure linéaire, on peut ainsi en observer plusieurs à la suite *in vitro* (Dyran & Yoo, 1998). Chez les vertébrés, Ku sert de plateforme au recrutement de DNA-PKcs (*DNA-dependent Protein Kinase catalytic subunit*) : ensemble, ils forment le complexe DNA-PK. Leur association induit l'auto-phosphorylation de DNA-PKcs et la phosphorylation de protéines cibles, participant au recrutement d'autres facteurs du NHEJ.

L'absence d'homologue de DNA-PKcs chez la levure *S. cerevisiae* a pu néanmoins remettre en question sa nécessité dans le processus du NHEJ. Les études menées dans l'optique d'éclaircir ce point ont mis en évidence une voie indépendante de l'activité de DNA-PKcs, mais dépendante du complexe MRX (Udayakumar *et al.*, 2003). Ces observations n'ont initialement pas été partagées chez *S. pombe* (Manolis *et al.*, 2001). Cependant, des études plus récentes suggèrent l'implication du complexe MRN pour

la réparation par NHEJ d'extrémités ayant une structure tige-boucle (Y. Li *et al.*, 2017) ou encore la fusion de télomères (Reis *et al.*, 2012). Enfin, il semblerait que chez les mammifères comme chez les levures, MRN puisse contribuer au NHEJ de différentes manières, dépendamment ou non de ses activités nucléases (Xie *et al.*, 2009; X. Zhang & Paull, 2005).

Enfin, la réassociation des extrémités se fait grâce au complexe XRCC4-Lig4 (*X-ray Repair, Complementing defective repair in Chinese hamster* – ADN Ligase 4), dont l'activité peut être stimulée par XLF (*XRCC4-like factor*, également nommé Cernunnos) (Gu *et al.*, 2007).

1.1.2. Le NHEJ alternatif

Il existe un mécanisme de NHEJ alternatif (Alt-EJ). Ce mécanisme a été initialement désigné par les termes de '*microhomology-mediated end joining*' (MMEJ) ou '*backup NHEJ*' (B-NHEJ) (B. Zhao *et al.*, 2020), et décrit comme une voie de sauvetage ne fonctionnant que dans un contexte où les facteurs clés de la voie canonique étaient absents. Malgré cela, il est maintenant admis que l'Alt-EJ peut être actif, bien que modérément, en présence de la voie de NHEJ canonique.

L'Alt-EJ requiert une courte résection des extrémités de la cassure. Cette résection est assurée par la *CtBP-interacting protein*, CtIP, et MRN. CtIP (Ctp1 et Sae2 chez *S. pombe* et *S. cerevisiae* respectivement) stimule l'activité endonucléase de MRN, qui va faire une incision proche de l'extrémité du site de cassure (Cejka *et al.*, 2010; Jensen & Russell, 2016; Rass *et al.*, 2009; X. Zhang & Paull, 2005). MRN possède également une activité exonucléase 3'→5', ce qui va lui permettre de dégrader l'ADN entre son point d'incision et l'extrémité de la cassure. Ensemble, CtIP et MRN sont capables de générer de courtes extrémités simple-brin 3' sortantes. Ces extrémités s'apparient au niveau de régions de micro-homologies ainsi exposées (<20pb). L'activité de diverses polymérases (Black *et al.*, 2016; K. Lee & Lee, 2007; D. W. Wyatt *et al.*, 2016) va permettre de synthétiser les régions manquantes dont la ligature des extrémités va s'effectuer par le biais du complexe XRCC1-Lig3 ou Lig1 (Audebert *et al.*, 2004; G. Lu *et al.*, 2016).

L'Alt-EJ est indépendant de la présence de Ku, dont la présence constitue un blocage de l'étape de résection par l'exonucléase Exo1 (H. Wang *et al.*, 2003). Ce point sera développé plus amplement dans la seconde partie de ce chapitre. Il est proposé que la protéine PARP1 (*poly(ADP-ribose) polymerase 1*) participe à la formation de la synapse de ligature et au recrutement de facteurs de l'Alt-EJ (Audebert *et al.*, 2004; Mansour *et al.*, 2010; M. Wang *et al.*, 2006).

Il est à noter que ces mécanismes de réparation basés sur la ligature d'extrémités sont mutagènes et source de translocations et réarrangements chromosomiques. L'Alt-EJ

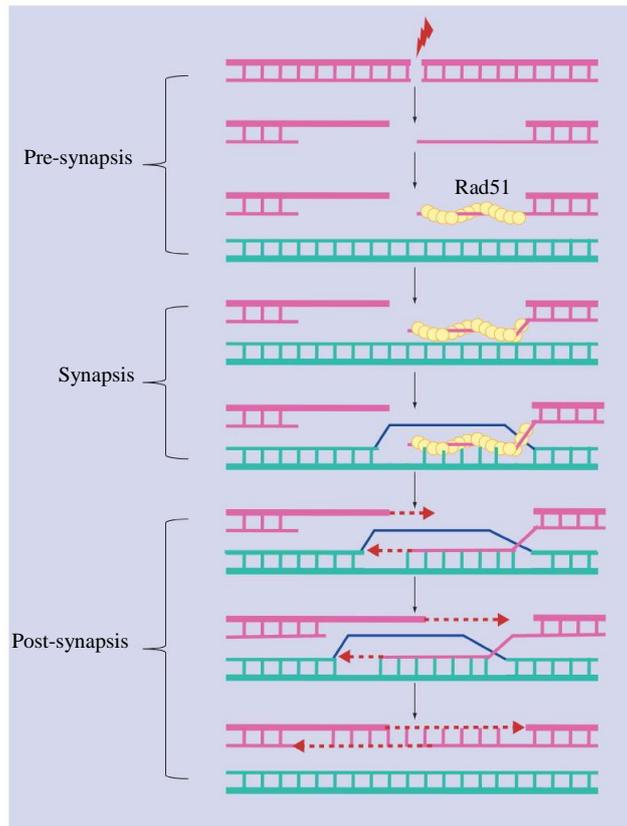


Figure 5. La recombinaison homologue en trois phases. Modifiée de (Sinha & Peterson, 2009).

peut aboutir à l'apparition de mutations locales, comme des délétions en cas de dégradation excessive des extrémités, ou à l'inverse des insertions inappropriées par les polymérases.

1.2. La recombinaison homologue

Ce mécanisme de réparation repose sur la présence d'une molécule d'ADN homologue à celle du site de cassure dont la copie va permettre de restaurer la séquence endommagée/manquante. La matrice de réparation utilisée est préférentiellement la chromatide sœur (Johnson & Jasin, 2000), mais peut aussi être le chromosome homologue. La recombinaison homologue (RH) assure le maintien de l'intégrité du génome chez tous les organismes vivants, ce qui peut s'expliquer par sa capacité à prendre en charge des dommages complexes et importants (Kuzminov, 1999; X. Li & Heyer, 2008). En effet, elle permet notamment d'assurer la réparation des CDBs et des pontages inter-brins, tout en étant impliquée dans la gestion du stress réplicatif (Costes & Lambert, 2012) et le maintien de la taille des télomères (Simon *et al.*, 2016). Ces diverses fonctions de la RH se traduisent par le besoin d'un grand nombre de facteurs médiateurs, qui dépendamment du contexte, vont agir en conjonction avec les facteurs clés, pour adapter au mieux le processus de réparation. Le focus sera fait dans cette partie sur le rôle de la RH dans la réparation des CDBs. Le rôle des facteurs de recombinaison homologue dans la gestion du stress réplicatif sera particulièrement détaillé dans le troisième chapitre de cette introduction.

1.2.1. Un modèle en trois étapes

Toute réaction de RH repose sur la capacité des facteurs de recombinaison à utiliser une molécule d'ADNsb comme matrice pour la recherche d'homologie. Durant une phase dite présynaptique, les extrémités 5' des CDBs sont dégradées pour générer de longues molécules simple-brin qui, une fois recouvertes par la protéine recombinase Rad51, serviront de base à la recherche d'homologie. L'aboutissement de cette recherche se traduit par la formation d'une synapse propice à l'échange de brin, c'est-à-dire une connexion physique entre le simple-brin du filament nucléoprotéique et le duplex matrice. C'est la formation de la D-loop. Durant la dernière phase ou phase postsynaptique, la séquence perdue est synthétisée et les intermédiaires de recombinaison sont résolus (Figure 5).

1.2.1.1. La phase présynaptique

C'est la phase de reconnaissance des CDBs, où les facteurs de recombinaison sont recrutés et le traitement des extrémités, *i.e.* la résection, de la cassure est initié. Ce point est un facteur décisif pour le choix du mécanisme de réparation des CDBs, et pour la

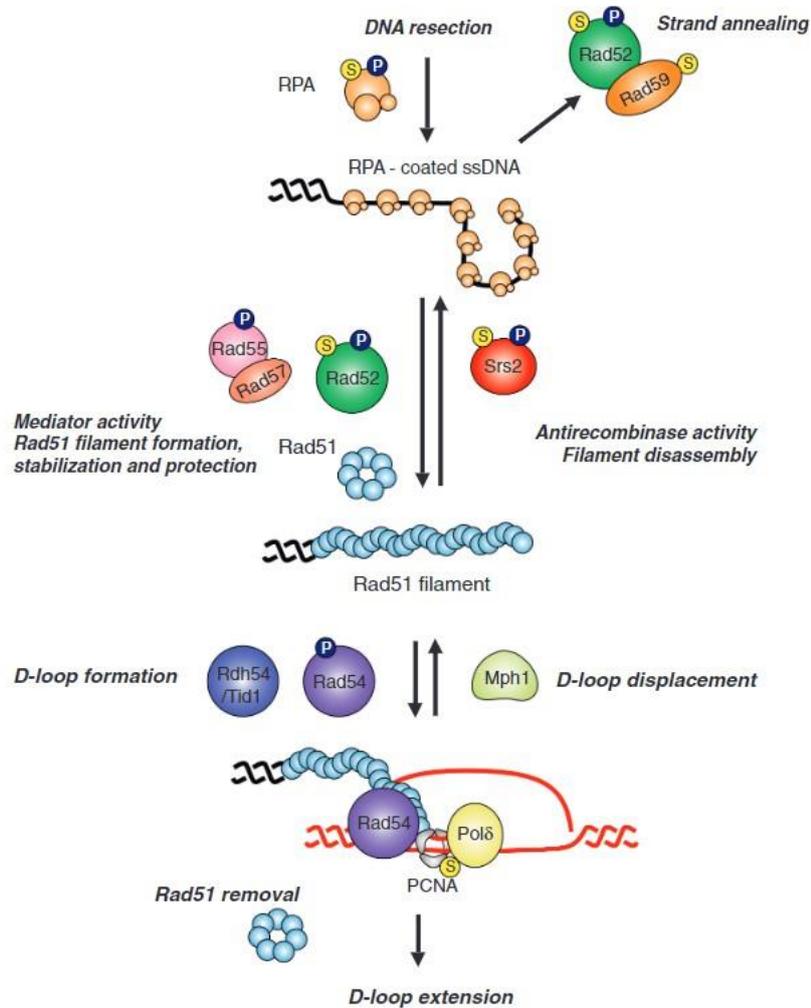


Figure 6. Etapes et régulation des phases présynaptique et synaptique de la recombinaison homologue, chez *S. cerevisiae*. La régulation des phases présynaptique et synaptique repose sur la gestion d'un équilibre d'action de protéines aux rôles antagonistes. L'évolution de cette balance va conditionner la formation du filament Rad51 et la capacité à faire l'échange de brin. Les fonctions de la plupart des protéines impliquées y sont notamment régulées par des modifications post-traductionnelles de type phosphorylation (P) et/ou SUMOylation (S). Modifiée de (Krejci *et al.*, 2012).

RH, c'est une étape critique pour former une base pour la recherche d'homologie. De ce fait, de nombreuses protéines sont impliquées dans la régulation de la résection chez les eucaryotes, comme il le sera présenté par la suite.

Les extrémités de la CDB subissent une résection générant des extrémités simple-brin 3' sortantes. Cette résection s'effectue en deux temps. Brièvement, MRN-Ctp1 amorce la dégradation, exposant ainsi un court fragment d'ADNsb. Cela crée un point d'entrée aux exonucléases Exo1 ou Dna2, médiatrices d'une étape de résection plus extensive, pouvant aboutir à la formation de molécules d'ADNsb de plusieurs milliers de bases (Langerak *et al.*, 2011; Mimitou & Symington, 2008; Zhu *et al.*, 2008).

L'ADN simple-brin nouvellement exposé est recouvert par RPA (Figure 6), dont le rôle est ici à double-tranchant (Krejci *et al.*, 2012). D'une part, il promeut la réaction de RH en inhibant la formation de structures secondaires qui pourraient compromettre la fixation de Rad51. Néanmoins, dû à sa plus grande affinité pour l'ADNsb, RPA est lui-même compétiteur à la fixation de Rad51. Le remplacement de RPA par Rad51 est assuré par l'action de protéines médiatrices comme Rad52 ou l'hétérodimère Rad55-Rad57 chez les levures (Benson *et al.*, 1998; Shinohara & Ogawa, 1998; Sung, 1997a, 1997b). Chez l'homme, les médiateurs nécessaires à la nucléation sont BRCA2 et son partenaire DSS1, ainsi que les paralogues de Rad51 (RAD51B, RAD51C, RAD51D, XRCC2, et XRCC3) (J. Liu *et al.*, 2010). Si cette étape d'échange est compromise, la persistance de RPA inhibe la réaction d'échange de brin, critique pour la réussite de la réparation (Kantake *et al.*, 2003).

Une fois formé, le filament nucléoprotéique de Rad51 est stabilisé et protégé grâce à l'action d'un ensemble de protéines support. On peut citer à nouveau Rad55-Rad57 / RAD51B-RAD51C ou encore les membres de la famille Swi2/Snf2 : Rad54, Rdh54/Tid1 et Uls1/Tid4 chez les levures ; RAD54, RAD54B chez l'homme (Ceballos & Heyer, 2011; Krejci *et al.*, 2012). Ces protéines permettent de contrer l'action d'un ensemble d'hélicases favorisant la dissociation de Rad51 du simple-brin d'ADN. Le rôle de ces protéines, qualifiées d'anti-recombinases, est de limiter l'initiation de réactions de recombinaison inappropriées. Par exemple, chez les levures, les hélicase Srs2 et Fbh1 sont connues pour avoir de tels effets (Osman *et al.*, 2005; Veaute *et al.*, 2003). Chez les mammifères, c'est essentiellement FBH1 qui assure ce rôle. Aucun homologue de Srs2 n'a été identifié à ce jour, mais plusieurs hélicases partagent des fonctions similaires comme RecQ5, BLM et FANCI (Bugreev *et al.*, 2007; Y. Hu *et al.*, 2007; Sommers *et al.*, 2009).

1.2.1.2. La phase synaptique

Une fois le filament nucléoprotéique de Rad51 assemblé et stabilisé, la recherche d'homologie peut débuter. Cette étape peut être facilitée par l'hyper-mobilité des chromosomes, favorisée entre autres par certains facteurs de recombinaison (Dion *et al.*, 2012; Miné-Hattab & Rothstein, 2012). De plus, il est proposé que plusieurs courtes synapses puissent se former, de façon dynamique et instable, permettant de sonder plus efficacement et accélérer la détection d'homologie (Renkawitz *et al.*, 2013). La formation de multiples synapses est d'autant plus favorisée que la taille du filament nucléoprotéique est importante (Forget & Kowalczykowski, 2012).

Dans la synapse, Rad51 facilite la formation d'une connexion physique entre l'ADNsb invasif et le duplex d'ADN homologue. Le duplex matrice est légèrement ouvert pour effectuer la recherche d'homologie. Lorsque la séquence homologue est trouvée, le filament d'ADNsb s'apparie à son brin complémentaire, formant la D-loop. Il en résulte le déplacement du brin non-complémentaire (*i.e.* étape d'échange de brin).

Les étapes de recherche d'homologie et de réaction d'échange de brin sont encore mal caractérisées. Néanmoins très récemment, un modèle basé sur des données structurales recueillies chez la bactérie a été proposé pour clarifier la formation de la D-loop (H. Yang, Zhou, *et al.*, 2020). Brièvement, 3 nucléotides de l'ADNsb invasif sont comparés à une séquence de 5 nucléotides sur un brin du duplex matrice. C'est sur cette courte séquence que l'homologie peut être trouvée, et que l'appariement des brins complémentaires est initié. L'appariement va être étendu sur toute la longueur du filament une fois l'homologie validée. Ainsi la D-loop s'étend, et le processus d'ouverture du duplex matrice est alors favorisé par la capture du brin non-complémentaire à la surface du filament invasif RecA-ADNsb.

La validation de ce modèle chez les eucaryotes va nécessiter un travail approfondi non seulement sur Rad51, l'homologue de RecA, mais aussi sur ses nombreux médiateurs/co-facteurs dont la recombinaison dépend. A ce jour, c'est notamment le rôle des protéines de la famille Swi2/Snf2, présentes depuis la phase présynaptique, qui a été mis en lumière chez les eucaryotes (Sung *et al.*, 2003). En effet, Rad54 et Rdh54 possèdent une activité ATPase dépendante de la présence d'ADNdb, fonction stimulée par leur interaction physique avec Rad51 (Petukhova *et al.*, 1999, 2000). Cette fonction leur permet de faciliter l'accessibilité au duplex homologue pour le filament, en y induisant un remodelage topologique de la chromatine (Wolner & Peterson, 2005).

1.2.1.3. La phase post-synaptique

L'ultime phase du processus de recombinaison, ou phase post-synaptique, débute avec l'extension de l'extrémité 3'-OH du brin d'ADN invasif. Ce dernier est utilisé comme

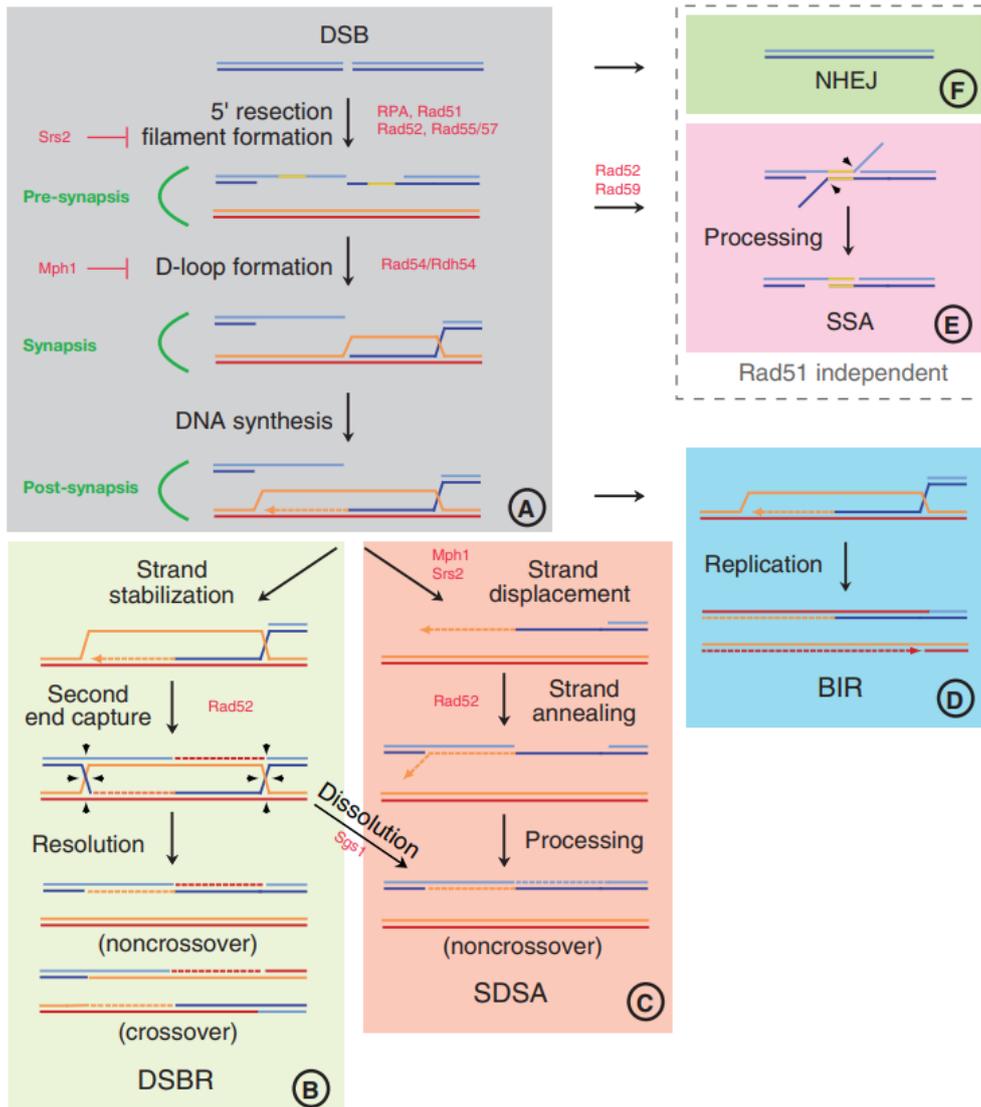


Figure 7. Modèles de résolution d'intermédiaires de recombinaison. D'après (Krejci *et al.*, 2012).

amorce par des ADN polymérase pour synthétiser la séquence manquante, à partir de la séquence lue sur le brin complémentaire d'ADN matrice.

Pour se faire, Rad51 doit être dissocié de l'ADNdb pour en libérer l'accès aux ADN polymérase. Rad54 joue ici un nouveau rôle clé : il dégage les protéines Rad51 qu'il rencontre le long du duplex nouvellement formé. Sans son aide, Rad51 ne pourrait s'en dissocier seul (Solinger *et al.*, 2002). Cette fonction de Rad54 favorise notamment le recyclage des protéines Rad51. Il n'est pour l'instant pas connu si Rdh54/Tid1 possède une telle fonction. Une étude chez *C. elegans* propose que deux autres protéines nommées HELQ-1 et RFS-1 permettrait également d'assurer le retrait de Rad51 de l'ADNdb, selon des mécanismes distincts (J. D. Ward *et al.*, 2010). Il reste cependant encore plusieurs zones d'ombre à clarifier pour dessiner un modèle solide et précis, conciliant ces diverses activités.

Chez les levures, c'est principalement l'ADN polymérase δ qui effectue ensuite l'extension de l'extrémité 3', avec l'aide de ses co-facteurs PCNA/RFC (X. Li *et al.*, 2009; Maloisel *et al.*, 2008). Ces observations sont partagées chez les vertébrés, chez qui il semblerait que l'ADN polymérase η puisse avoir un rôle support (McIlwraith *et al.*, 2005; Sneed *et al.*, 2013). A partir de ce stade, les intermédiaires de RH peuvent être restructurés, de façon variable, dépendamment du contexte de réparation, par un procédé de migration de brins. Ils passent alors d'une forme de D-loop à une forme plus complexe nommée jonction de Holliday (JH). Différentes voies de résolution, décrites ci-après, prennent en charge ces derniers intermédiaires. Les produits de recombinaison peuvent alors varier, en fonction du mode de résolution. On y observera des évènements de conversion génique, *i.e.* un transfert unilatéral de matériel génétique de la séquence matrice à la séquence endommagée acceptrice, mais aussi des évènements d'échanges réciproques de molécules recombinées appelés crossover (COs).

1.2.1.3.1. Le SDSA

Dans le cas du *Synthesis Dependant Strand Annealing* ou SDSA, le brin néo-synthétisé va quitter le duplex matrice et s'apparier directement sur la seconde extrémité de la cassure ([Figure 7, panel C](#)). Pour cela, un ensemble d'hélicases et translocases assiste la dissolution de la JH. La synthèse d'ADN se poursuit pour combler la brèche restante, suivie d'une ligature pour restaurer l'intégralité du duplex d'ADN initialement endommagé. Les produits de réparation qui en résultent sont donc exclusivement des évènements de conversion génique. Il a été mis en évidence chez *S. cerevisiae* que c'était la voie principale de résolution des JHs, notamment du fait que les séquences néo-synthétisées lors de la réparation se trouvaient sur le duplex à réparer et non sur le duplex matrice de la réparation (Ira *et al.*, 2006).

1.2.1.3.2. Le DSB

Le DSB (*Double Strand Break Repair*) est le modèle de résolution qui a fait consensus durant plusieurs décennies. Il implique que dès la phase présynaptique, les deux extrémités d'une CDB-de soient prises en charge par la machinerie de résection. En conséquence, l'ADNsb formé sur la seconde extrémité de la cassure peut s'apparier à la D-loop, une fois que l'extension de la synthèse d'ADN aura permis d'en exposer la zone d'homologie. Cette réaction est médiée par Rad52 (McIlwraith & West, 2008). On parle alors d'un phénomène de capture de la seconde extrémité de la cassure, formant une double jonction de Holliday (dJH). Chez les eucaryotes, les dJHs sont principalement dissoutes par l'action conjointe d'activités hélicases et topoisomérases (Manthei & Keck, 2013). Aussi, les dJHs peuvent être résolues *via* l'action de diverses résolvases (H. D. M. Wyatt & West, 2014). Les résolvases identifiées à ce jour chez les eucaryotes sont Mus81-Mms4 (MUS81-EME1 chez l'homme et *S. pombe*), Slx1-Slx4, et Yen1 (GEN1 chez l'homme ; absent chez *S. pombe*). Aucune ne présente de spécificité de séquence et elles fonctionnent dans des contextes de résolution différents. Les produits de recombinaison du DSB peuvent contenir ou non des événements de crossover (COs) ([Figure 7, panel B](#)). La majorité des produits de RH mitotiques correspondant à des événements sans COs, ce modèle unique ne pouvait pas expliquer à lui seul la faible fréquence des COs observés en mitose.

1.2.1.3.3. Le BIR

Le BIR, ou *Break-Induced Replication*, s'applique dans un contexte où une seule extrémité de la cassure est disponible pour la recherche d'homologie ([Figure 7, panel D](#)). On peut notamment observer une telle situation aux télomères ou lorsqu'une fourche de réplication se casse. C'est au niveau de l'étape de synthèse d'ADN que ce mécanisme diffère des précédents. L'initiation de cette étape y est plus lente, dû à la mise en place d'un système de surveillance nommé REC, pour *Recombination Execution Checkpoint* (Jain *et al.*, 2009). Le REC va inhiber la réparation par les voies de DSB et SDSA, dans les cas où soit la cassure ne présente qu'une seule extrémité ou bien si les deux extrémités ciblent deux duplex matrice différents ou trop éloignés. Une fois initiée, la synthèse d'ADN lors du BIR requiert tous les facteurs de réplication, à l'exception de ceux impliqués aux origines de réplication dans l'assemblage du complexe de pré-réplication (L. Liu *et al.*, 2021). Elle est néanmoins beaucoup plus mutagène que la synthèse d'ADN en phase S (Saini *et al.*, 2013). Cela s'explique notamment car la dynamique de réplication du BIR est plus lente et plus susceptible d'engendrer de l'instabilité en cas de rencontre d'un obstacle (L. Liu *et al.*, 2021). Il est à noter que de par l'absence d'une seconde extrémité disponible, la synthèse lors du BIR peut s'étendre jusqu'au télomère du chromosome matrice. Ce mode de réparation favorise donc la perte d'hétérozygotie.

1.2.1.3.4. Le SSA

Enfin, le modèle de *Single-Stranded Annealing* (SSA) s'applique uniquement lorsque la CDB a lieu dans une région de séquences répétées directes (Figure 7, panel E). L'étape de résection entraîne l'exposition d'extrémités d'ADNs complémentaires, qui peuvent donc s'apparier directement entre elles. Ce processus est très mutagène car il en résulte inmanquablement la perte d'information génétique. Le SSA requiert la présence de Rad52 et son partenaire Rad59, en revanche, puisqu'il ne dépend pas du processus d'invasion de brin, il est indépendant de Rad51 (Ivanov *et al.*, 1996).

2. NHEJ versus HR : la régulation des deux voies de réparation

Les sources d'apparition des CDBs sont diverses. Elles peuvent résulter entre autres de l'exposition aux radiations ionisantes, à un stress mécanique ou du passage d'une fourche de réplication sur d'une lésion simple-brin de l'ADN. De plus, les CDBs peuvent être formées délibérément (ou non) lors de la mise en place de processus physiologiques comme le changement de type sexuel chez la levure ou encore la recombinaison V(D)J dans les lymphocytes. Il résulte de cela une certaine hétérogénéité dans la structure des extrémités des CDBs : présence d'une ou deux extrémités, franches ou sortantes, variations de la polarité de ces extrémités sortantes (5' ou 3') ou des lésions de nucléotide(s) en position interne ou externe. Enfin, on peut aller jusqu'à observer une perte d'information génétique si une ou plusieurs paires de nucléotides sont touchées. De ce fait, dans certains cas, les extrémités sont incompatibles, ce qui empêche leur ligature directe. Un paramètre crucial pour le choix du mécanisme de réparation va donc être l'évolution de la balance entre les activités de protection versus les activités de dégradation des extrémités des CDBs. Il est à noter que l'engagement dans une voie de réparation n'est jamais définitif. Depuis la reconnaissance de la cassure jusqu'à la résection des extrémités, les intermédiaires de réparation pourront être repris en charge par l'une ou l'autre des deux voies (Ingram *et al.*, 2019). Les grandes étapes de la régulation de la réparation des CDBs sont discutées ci-dessous.

2.1. La reconnaissance des CDBs

Le NHEJ est actif tout au long du cycle cellulaire. Chez les mammifères, c'est le mécanisme de réparation prédominant en phase G1. Cette phase est la plus courte du cycle cellulaire chez *S. pombe*. Pour autant, les niveaux de NHEJ y sont 10 fois supérieurs que dans les autres phases du cycle cellulaire (Ferreira & Cooper, 2004). La RH y est fortement réduite, essentiellement car la phase de résection y est réprimée. La RH peut néanmoins être sollicitée en phase G1, bien que préférentiellement active en phase S/G2 (Arnoult *et al.*, 2017; Aylon *et al.*, 2004; Fabre, 1978).

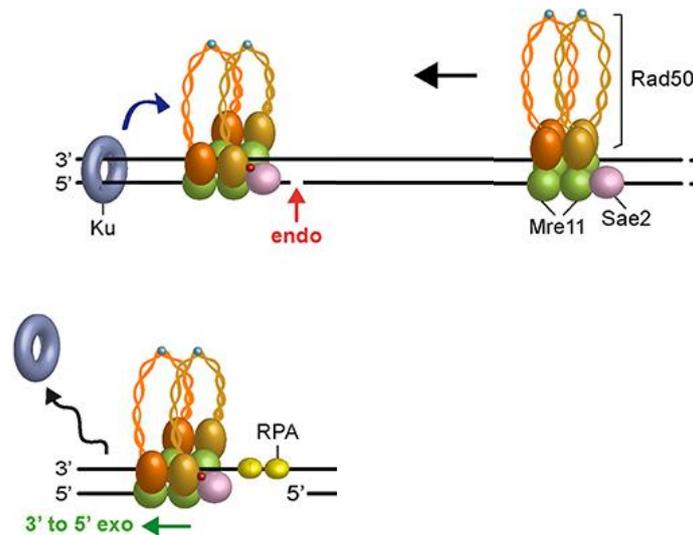


Figure 8. Mécanisme d'éviction de Ku par MRX, chez *S. cerevisiae*. L'anneau Ku70-Ku80 (Ku) se fixe à l'extrémité des cassures double-brin. MRX est lui associé à l'ADN sous forme de dimère, et scannerait le duplex à la recherche des sites de cassure. Leur reconnaissance promeut la phosphorylation (point rouge) de Sae2 et l'hydrolyse de l'ATP par Rad50, ce qui entraîne le clivage endonucléolytique (flèche rouge) par MRX du brin 5'. La présence de Ku à l'extrémité stimule ce clivage (flèche bleue). Mre11 entame une résection 3'→5' vers l'extrémité de la cassure, ce qui promeut l'éviction de Ku. La présence d'ADNs à l'extrémité empêche Ku de se fixer à nouveau. Modifiée de (Casari *et al.*, 2019).

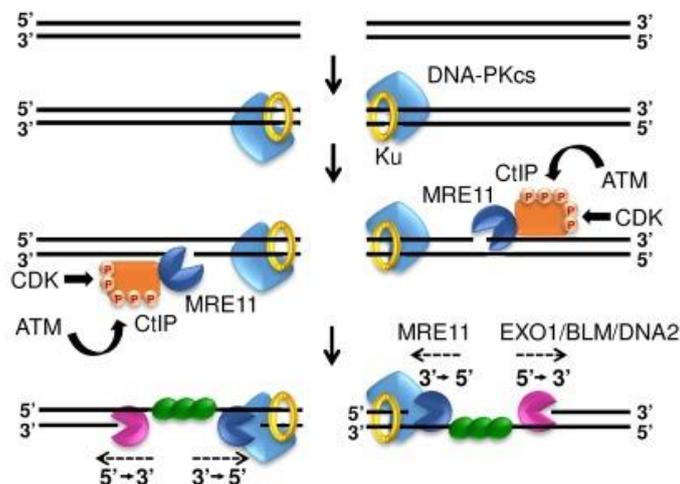


Figure 9. Modèle de résection bidirectionnelle, chez les mammifères. Modifiée de (Shibata *et al.*, 2018).

Les senseurs des CDBs sont Ku et MRN, traditionnellement associés au NHEJ et à la RH, respectivement. En présence de CDBs, ces deux senseurs sont donc potentiellement en compétition tout au long du cycle cellulaire. Ku est un hétérodimère dont la structure forme un anneau. Sa fixation autour d'une extrémité double-brin en bloque physiquement l'accès à d'autres protéines, mais requiert en elle-même que l'extrémité soit au préalable libre. Ku est considéré comme un facteur anti-résection. S'il n'est pas retiré des extrémités, la réparation sera engagée en faveur du processus de NHEJ canonique. Sa dissociation des CDBs peut être médiée par différents facteurs : des modifications post-traductionnelles de type phosphorylation ou ubiquitination (L. Feng & Chen, 2012; Ismail *et al.*, 2015; K.-J. Lee *et al.*, 2016), ou il peut en être dégagé par MRN (Chanut *et al.*, 2016; Langerak *et al.*, 2011; Myler *et al.*, 2017) (Figure 8).

En effet, MRN reconnaît les CDBs, que les extrémités en soient bloquées ou non, et en promeut la résection. Il a été proposé dans une étude *in vitro* que MRN glisse le long du duplex d'ADN à la recherche de CDBs. Cette méthode de 'scan' serait préférée à la recherche d'un accès direct aux extrémités (Myler *et al.*, 2017). Ce modèle implique que MRN pourrait former un dimère et entourer le duplex d'ADN. Le passage au travers des nucléosomes se ferait alors par micro-dissociation/réassociation, jusqu'à la détection d'un site de cassure. Suite à leur détection par MRN, les extrémités des CDBs subissent un remodelage de la chromatine, nécessaire à la réparation future (Adkins *et al.*, 2013). MRN y promeut l'éviction des nucléosomes *via* le recrutement et l'activation de complexes de remodelage de la chromatine (Shim *et al.*, 2005; Tsukuda *et al.*, 2005).

2.2. La résection initiale

Une fois que MRN a détecté la cassure, la résection des extrémités est initiée. MRN possède à la fois une activité endonucléase et une activité exonucléase 3'→5', toutes deux portées par la sous-unité Mre11 et stimulées par Rad50 et Nbs1/Xrs2 (Trujillo *et al.*, 1998). Cette polarité de l'activité exonucléase de MRN peut sembler à première vue contradictoire avec la formation d'extrémités 3' sortantes, comme il est requis pour la RH. Pour autant, il a été montré que la résection est un processus bidirectionnel, reposant essentiellement sur l'incision du brin 5' *via* l'activité endonucléase de MRN (Garcia *et al.*, 2011; Shibata *et al.*, 2014). MRN peut ensuite médier la résection 3'→5' en direction de la cassure, et ainsi créer un point d'entrée pour d'autres exonucléases agissant dans le sens opposé, 5'→3' (Figure 9). Lorsque les extrémités sont bloquées par Ku, l'activité endonucléase de MRN est stimulée (Reginato *et al.*, 2017). MRN ferait une incision à environ 30 nucléotides de la bordure de la cassure. Cette taille correspond à la zone d'occupation de Ku sur l'extrémité (environ 15 pb), ajoutée à celle de MRN (Myler *et al.*, 2017). Cette étape de résection initiale est principalement critique pour médier l'éviction de Ku (Figure 8). Si Ku est absent, la résection ne se fait plus de

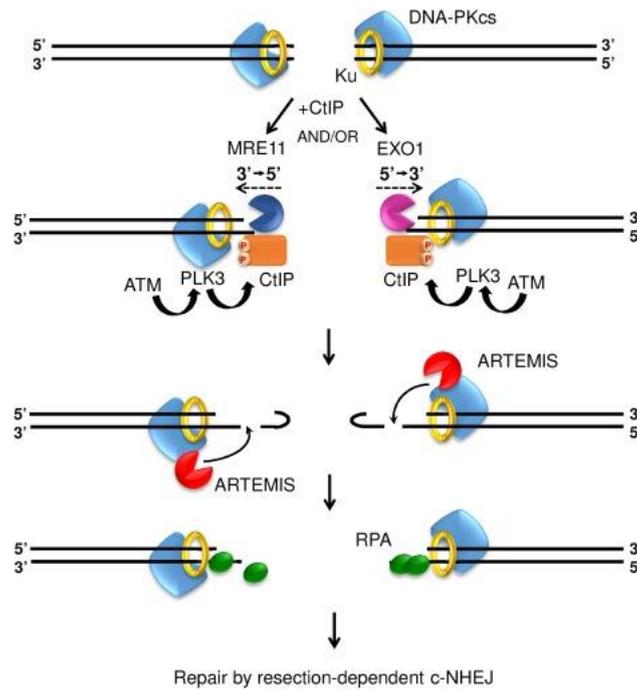


Figure 10. Un modèle du mécanisme de NHEJ dépendant de la résection en phase G1, chez les mammifères. Ku et DNA-PKcs se fixent au CDBs. La réparation de certains de ces CDBs est médiée par un mécanisme de NHEJ dépendant d'une courte résection. Ce processus est indépendant de l'activité endonucléase de Mre11 et il est médié par la phosphorylation de CtIP par PLK3. Il est proposé ici que KU transloque afin de permettre une courte résection de l'extrémité par des exonucléases. ARTEMIS est requise notamment pour retirer les lésions induites par ces exonucléases, comme présentées ici sous forme de structure tige-boucle. D'après (Shibata *et al.*, 2018).

manière séquentielle et MRN devient facultatif à son initiation (Langerak *et al.*, 2011; Mimitou & Symington, 2010).

L'activité endonucléase de MRN est grandement stimulée grâce au recrutement de CtIP. Deux modes de stimulation sont possibles, dépendamment de l'état de phosphorylation de CtIP (Anand *et al.*, 2016, 2019). La phosphorylation par les CDKs (*Cyclin Dependent Kinases*; Cdk1 chez les levures, et Cdk2 chez les mammifères) est un prérequis pour que CtIP puisse être phosphorylé par ATM en présence de dommage. Cette seconde vague de phosphorylation entraîne le recrutement de CtIP à la chromatine, où il peut interagir avec la sous-unité Nbs1 (H. Wang *et al.*, 2013; R. S. Williams *et al.*, 2009). L'activité des CDKs étant régulée au cours du cycle cellulaire, ce scénario est restreint aux phases S/G2. Le second scénario est que CtIP interagit directement avec Mre11 et Rad50, indépendamment de la présence de Nbs1 et de son état de phosphorylation. Néanmoins, il est proposé que dans ce cas, la stimulation de l'activité de MRN soit plus faible (Anand *et al.*, 2019). Il a été proposé chez *S. cerevisiae* que Cdk1 puisse aussi réguler le niveau de phosphorylation de MRX au cours du cycle cellulaire, ce qui inhiberait l'utilisation du NHEJ en G2/M au profit de la RH (Simoneau *et al.*, 2014).

Chez l'homme, CtIP possède une activité endonucléase, requise pour l'élimination d'adduits et structures secondaires qui peuvent se former autour de la cassure (Makharashvili *et al.*, 2014). Il est à ce jour encore controversé de dire que cette activité nucléase est retrouvée chez *S. cerevisiae* ou *S. pombe* (Andres *et al.*, 2015; Arora *et al.*, 2017; Cannavo & Cejka, 2014). Néanmoins, cette fonction est indépendante de son rôle dans l'initiation de la résection, qui, lui, a été montré chez ces trois organismes (Andres & Williams, 2017).

Il est à noter que pour faciliter la réaction de NHEJ, une très courte résection peut être requise, et permettre l'exposition de petites régions de micro-homologies (≤ 4 nucléotides). Cette résection diffère de la résection initiale de la RH (≥ 20 nucléotides). Dans ce contexte, c'est la nucléase ARTEMIS qui est recrutée et activée par DNA-PK chez les mammifères (Riballo *et al.*, 2004). ARTEMIS prend en charge plusieurs types d'extrémités comme les extrémités 5' et 3' sortantes ou encore celles de forme tige-boucle (Chang *et al.*, 2015, 2017). Le modèle de fonctionnement de la résection associée au NHEJ est un sujet encore débattu. Ses acteurs, pouvant différer selon les phases G1 ou G2, comprendraient également les facteurs de la machinerie de résection de la RH mais avec un mode d'action différent (Biehs *et al.*, 2017) ([Figure 10](#)).

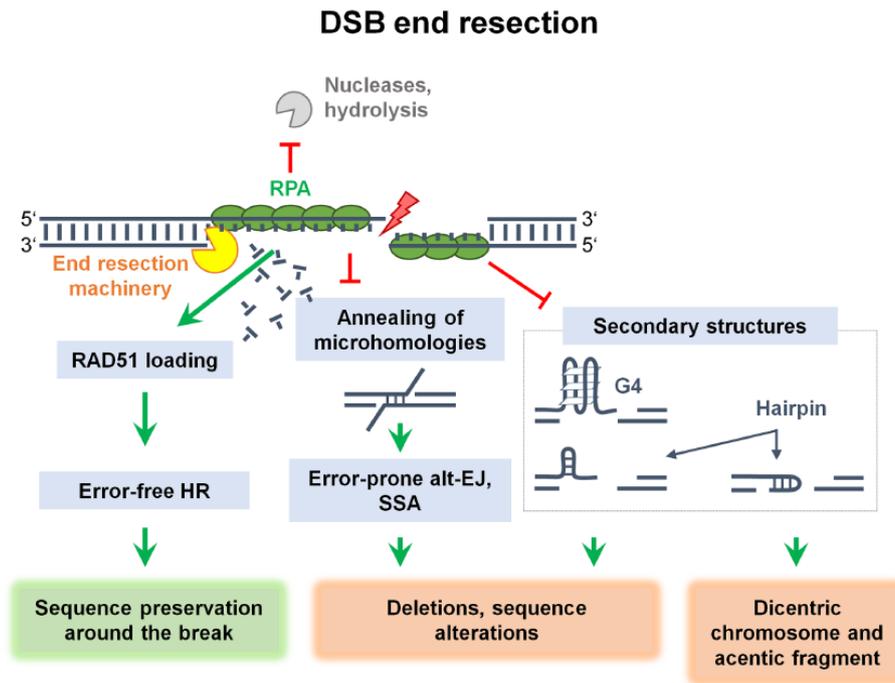


Figure 11. Rôles de RPA dans la régulation de la résection. D'après (Dueva & Iliakis, 2020).

2.3. La résection extensive

La résection limitée par MRN-CtIP permet la formation d'une courte séquence simple-brin, sur laquelle RPA peut se fixer. Une seconde étape de résection qualifiée de résection extensive va induire l'agrandissement de cette séquence d'ADNsb. C'est cette étape qui va permettre d'induire la réponse cellulaire aux dommages par ATR (Zou & Elledge, 2003). Deux voies sont impliquées dans la résection extensive. Indépendamment de la voie choisie, un remodelage de la chromatine va être requis au préalable pour en augmenter l'accessibilité aux nucléases. C'est Fun30 chez *S. cerevisiae*, et ses homologues Fft3 et SMARCD1 chez *S. pombe* et les mammifères respectivement, qui prennent en charge ce rôle (X. Chen *et al.*, 2012; Costelloe *et al.*, 2012; Eapen *et al.*, 2012).

La première voie de résection extensive repose sur l'exonucléase Exo1, de polarité 5'→3'. C'est la voie de résection extensive majoritaire chez *S. pombe* (Langerak *et al.*, 2011). Exo1 a pour substrat les brèches d'ADNsb, qu'elles soient localisées en position interne du duplex ou bien aux extrémités des CDBs. Son recrutement et son activité sont stimulés par MRN-CtIP (Eid *et al.*, 2010; Nicolette *et al.*, 2010; Nimonkar *et al.*, 2011). Comme évoqué précédemment, en cas d'absence de Ku, ce rôle devient dispensable (Langerak *et al.*, 2011; Mimitou & Symington, 2011; Shim *et al.*, 2010).

La seconde voie dépend des activités nucléase et hélicase de Dna2 et BLM, respectivement. Dna2 est une endonucléase, dont l'activité est spécifique au clivage de flap (*i.e.* décollement de brin). Ne possédant pas d'activité exonucléase, et ayant une faible activité hélicase, elle requiert l'assistance d'hélicase pour effectuer une ouverture de l'ADN. Cette fonction est assurée par les hélicases RecQ : BLM et WRN chez les mammifères, Sgs1 chez *S. cerevisiae* et Rqh1 chez *S. pombe* (Cejka *et al.*, 2010; Gravel *et al.*, 2008; Langerak *et al.*, 2011; Nimonkar *et al.*, 2011; Zhu *et al.*, 2008). BLM pourrait être acteur de ces deux procédés de résection, puisqu'il pourrait stimuler l'activité de EXO1 chez l'homme. Ce n'est néanmoins pas le cas de son homologue Sgs1 chez *S. cerevisiae* (Cannavo *et al.*, 2013; Nimonkar *et al.*, 2011). De plus, cette stimulation serait indépendante de son activité hélicase. Il est intéressant de noter que les fonctions pro-résection de BLM sont restreintes à la phase S. En G1, BLM limite l'action de MRN-CtIP, et contrôle ainsi le niveau de réparation médié par l'Alt-EJ (Grabarz *et al.*, 2013).

La fixation de RPA sur l'ADNsb nouvellement exposé constitue un niveau de régulation supplémentaire à l'extension de la résection ([Figure 11](#)). Les deux voies de résection sont impactées par la perte de RPA (H. Chen *et al.*, 2013). RPA stimule l'activité de Sgs1 et oriente le clivage de Dna2 sur le brin 5' (Cejka *et al.*, 2010). D'autre part, des effets contradictoires sur la stimulation de Exo1 par RPA ont été décrits *in vitro*, chez l'homme et *S. cerevisiae* (Cannavo *et al.*, 2013; Nicolette *et al.*, 2010; Nimonkar *et al.*, 2011; S.-H.

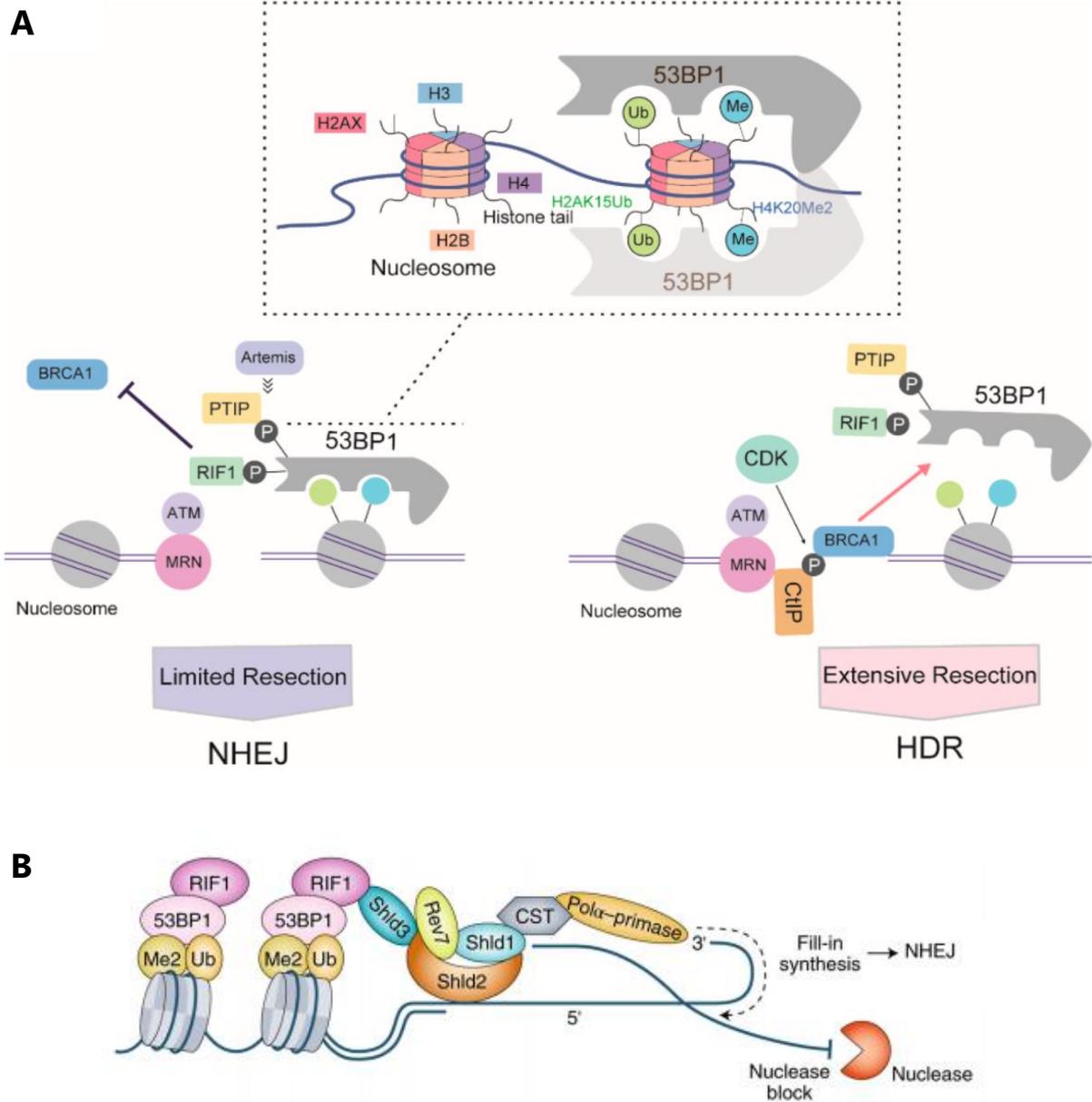


Figure 12. Modèle de régulation et réversion de la résection par 53BP1 et ses cofacteurs, chez les mammifères. (A) 53BP1 reconnaît ici des marques épigénétiques sur les nucléosomes adjacents à l'extrémité de la cassure (encadré). Il y recrute alors ses co-facteurs PTIP et RIF1. HDR: Homology-directed repair. D'après (H. Yang, Ren, *et al.*, 2020). (B) Le complexe shieldin (Shld1 à 3 et Rev7) est recruté par 53BP1-RIF1. Il médie le recrutement du complexe CST-ADN polymérase α , qui resynthétise la région dégradée et promeut la réparation par NHEJ. Modifiée de (Greenberg, 2018).

Yang *et al.*, 2013). Un modèle plus récent propose de réconcilier ces observations : Exo1 serait rapidement délocalisé par RPA, et de multiples étapes d'association / dégradation / délocalisation se répèteraient. Ainsi, les interactions non-spécifiques entre Exo1 et l'ADNsb sont contrôlées tout en stimulant le processus de résection (Myler *et al.*, 2016). Aussi, RPA est phosphorylé en réponse aux dommages, notamment suite au recrutement d'ATR. Sa forme phosphorylée inhibe les deux machineries de résection (Soniati *et al.*, 2019).

Bien que la résection ait été engagée, cela ne constitue pas pour autant un point de non-retour vers une réparation par la RH. En effet, l'extension de la résection peut toujours être contrecarrée, et la bascule penche alors vers une réparation *via* le NHEJ. Chez les mammifères, 53BP1 est un facteur clé pour le blocage et la réversion de la résection (Figure 12). Son recrutement aux CDBs peut être médié de diverses façons, notamment *via* l'interaction avec des modifications d'histones spécifiques. L'accumulation de 53BP1 à la CDB entraîne le recrutement de PTIP (*Pax2 transactivation domain-interacting protein*) et RIF1 (*Rap1-interacting protein*) (Callen *et al.*, 2020). RIF1 limite l'accumulation de BRCA1 au dommage, ce qui altère le recrutement de CtIP et la formation du filament de Rad51. Aussi, RIF1 médie le recrutement du complexe shieldin (Dev *et al.*, 2018; Noordermeer *et al.*, 2018; Setiaputra & Durocher, 2019). Ce complexe, récemment découvert, se fixe à l'ADNsb et en bloque l'accès aux machineries de résection. De plus, il promeut la réaction inverse : son interaction avec l'ADN polymérase α promeut la synthèse de l'ADN dégradé (Mirman *et al.*, 2018). PTIP, lui, agit en bloquant l'activité de DNA2. Il interagit avec ARTEMIS et promeut le NHEJ (J. Wang *et al.*, 2014). Les orthologues de 53BP1 chez *S. cerevisiae* et *S. pombe* sont respectivement Rad9 et Crb2. Bien qu'il ait été montré que Rad9 joue aussi un rôle de protection aux extrémités CDBs, il semblerait qu'il n'ait qu'un rôle mineur pour promouvoir la réaction de NHEJ (Ferrari *et al.*, 2015; Lazzaro *et al.*, 2008). Crb2 serait impliqué dans la protection des extrémités contre la résection extensive médiée par Rqh1 et Dna2 (Leland *et al.*, 2018).

III. La réparation de l'ADN lors de la réplication

Au cours de chaque cycle cellulaire, les cellules entrent en phase S, une phase où l'intégralité de leur contenu en ADN est répliqué. La mobilisation des facteurs de la réparation de l'ADN, tout au long du cycle cellulaire, est capitale pour assurer d'une part l'intégrité de la matrice à répliquer, et d'autre part, pour soutenir la machinerie de réplication tout en corrigeant les dommages associés. L'enjeu est de préserver puis de sécuriser la copie fidèle et complète de l'information génétique, afin d'en assurer la transmission correcte aux cellules filles en fin de cycle.

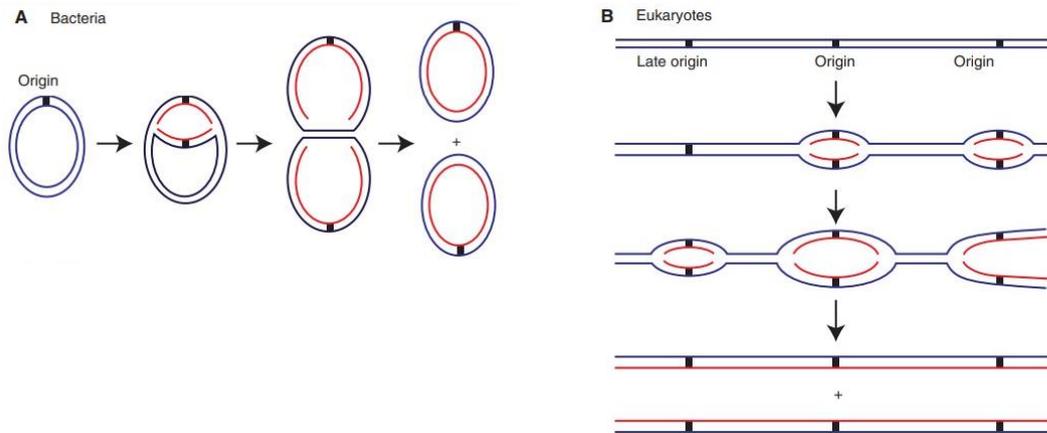


Figure 13. Modèle du processus de réplication, chez les bactéries et les eucaryotes. (A) La plupart des bactéries ont un chromosome unique et circulaire, ne comprenant qu'une origine de réplication. (B) Les eucaryotes ont de longs chromosomes linéaires contenant chacun plusieurs origines de réplication. La réplication débute sur ces origines, d'où les fourches progressent bidirectionnellement. Modifiée de (O'Donnell *et al.*, 2013).

Nous avons vu précédemment les différents mécanismes de réparation permettant d'assurer l'intégrité de la matrice à répliquer. Ce chapitre sera lui consacré au processus de la réplication de l'ADN. Je m'attacherai à y décrire dans un premier temps les éléments critiques à son bon déroulement, ainsi que ceux qui le limitent. Ensuite, l'accent sera mis sur l'implication des machineries de réparation qui s'avèrent avoir des fonctions support de la réplication, et gèrent le stress réplicatif.

1. Réplication et stress réplicatif

1.1. La réplication de l'ADN

La réplication de l'ADN chez les eucaryotes débute au niveau de régions réparties le long des chromosomes, en des points nommés origines de réplication. Chez *S. cerevisiae*, la position de ces origines est définie par la présence de séquences spécifiques (Xu *et al.*, 2006). Ces sites ont été appelés les ARSs (*Autonomously Replicating Sequences*). Chez *S. pombe* et chez les mammifères, l'identification des sites d'origine de réplication n'est pas autant aboutie. Elles ne semblent pas présenter de séquences consensus, si ce n'est avoir une préférence pour les régions A-T chez *S. pombe* et être près des îlots CpG chez les mammifères (Cadoret *et al.*, 2008; Segurado *et al.*, 2003). Néanmoins il est clair que chez tous ces organismes, l'activation de ces origines, *i.e.* la formation de fourches de réplication, est un processus extrêmement régulé, orchestré par un programme spatiotemporel complexe. Une origine de réplication activée donne naissance à deux fourches de réplication : on parle de bulle de réplication. Ces fourches vont progresser de façon bidirectionnelle le long des chromosomes, jusqu'à rencontrer une fourche convergente ou un obstacle. Le déroulé des phases d'initiation, d'élongation et de terminaison du processus de réplication, ainsi que les différents facteurs impliqués, seront détaillées ci-dessous ([Figure 13](#)).

1.1.1. Initiation

Deux étapes régissent l'initiation de la réplication chez les eucaryotes : on parle d'*origin licensing* et *origin firing* en anglais. Le *licensing* est la phase de reconnaissance des origines, entraînant la formation de complexes de pré-réplication (pré-RCs). Cette phase se met en place en fin de mitose et phase G1. La phase de *firing* correspond à l'activation de la synthèse d'ADN, et a lieu durant la phase S. Il est important de noter que toutes les origines identifiées ne seront pas forcément activées au cours d'un cycle (S. M. Kim & Huberman, 2001; Raghuraman, 2001). Ce choix varie d'une cellule à l'autre selon de nombreux paramètres pour s'adapter aux contraintes imposées notamment par l'environnement chromatinien. Les origines sont classées en trois catégories, définies par leur efficacité d'activation : les origines constitutives, les flexibles et les dormantes. Les origines constitutives sont activées dans toutes les cellules, indépend-

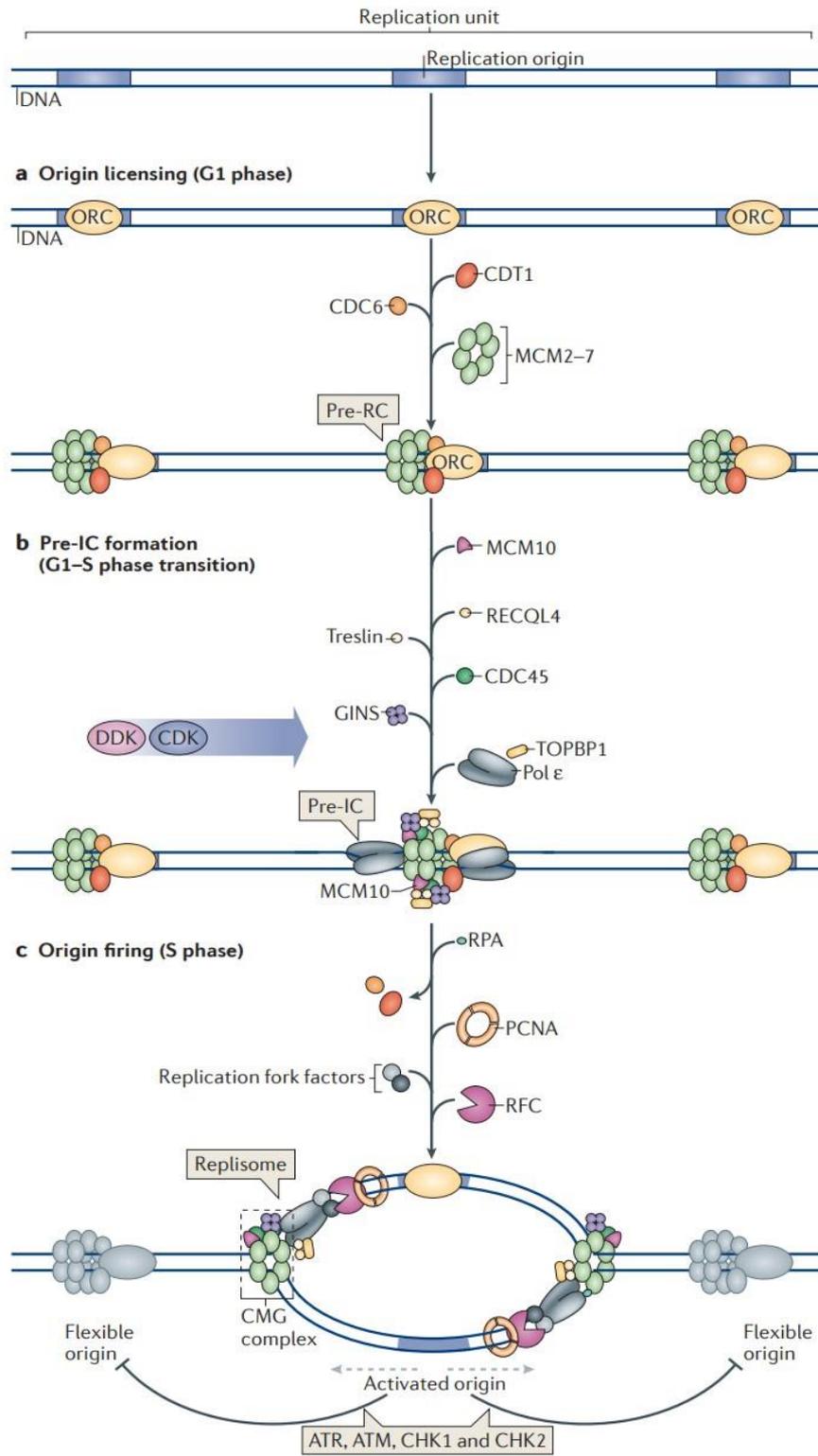


Figure 14. Etapes et facteurs clés de l'initiation de la réplication. D'après (Fragkos *et al.*, 2015).

-amment du stade développemental et des conditions environnantes. Elles ne représentent qu'une petite fraction des origines. L'activation des origines dites flexibles va elle varier d'une cellule à l'autre, de façon stochastique. On peut les définir lors d'études sur des populations de cellules. Enfin, les origines dormantes sont les origines qui ne sont pas activées, sauf en cas de problème aux niveaux des sites de réplication voisins (Ge *et al.*, 2007). Le mécanisme en deux temps de reconnaissance puis activation des origines de réplication est crucial pour assurer la régulation du processus. Il permet d'éviter la réplication multiple d'une même région, en limitant la formation excessive d'origines actives, tout en garantissant la possibilité d'en activer de nouvelles en cas de besoin.

Les pré-RC sont des complexes hexamériques formés en phase G1. Il regroupe les six sous-unités du complexe ORC (Orc1 à 6), le complexe MCM (Mcm2-Mcm7), et les co-facteurs CDC6 et CDT1 (Figure 14, panel A). ORC est le facteur clé pour l'initiation de la réplication, présent chez tous les eucaryotes (Bell & Stillman, 1992; Chuang *et al.*, 2002). Il est recruté en premier aux origines, et y reste fixé tout au long du cycle cellulaire chez les levures (Diffley *et al.*, 1994). Il s'ensuit la fixation de CDC6 (Cdc18 chez *S. pombe*) et CDT1. Lorsque tous sont en place, MCM peut être recruté (Donovan *et al.*, 1997; Nishitani *et al.*, 2000; Schaarschmidt *et al.*, 2002). D'autres co-facteurs peuvent être requis pour la formation de pré-RC, mais leur présence et leur fonction peuvent différer d'un organisme à l'autre. Je choisis de présenter ici ceux qui ont été retrouvés à la fois chez *S. cerevisiae*, *S. pombe* et chez l'homme.

L'activation de CDKs et DDK (Dbf4-Cdc7 kinase) en fin de phase G1 va aboutir à l'induction de la progression en phase S (Heller *et al.*, 2011). En conséquence, certaines des origines marquées par les complexes pré-RCs sont activées : ces pré-RCs sont convertis en pré-ICs, ou complexes de pré-initiation (Figure 14, panel B). La vague de phosphorylation induite par les kinases stimule la fixation des facteurs Cdc45 et GINS à MCM, qui forment alors le complexe CMG. L'activité hélicase de MCM est dans ces conditions activée (Bochman & Schwacha, 2008; Gambus *et al.*, 2006; Moyer *et al.*, 2006). Elle promeut l'ouverture de la double hélice et le recrutement des facteurs de réplication RPA, RFC (*Replication Factor C*), PCNA (*Proliferating Cell Nuclear Antigen*) ainsi que des polymérases répliquatives. L'ensemble de ces facteurs forme le réplisome ou machinerie de réplication (Figure 14, panel C).

La présence des kinases actives participerait également à l'inhibition de la formation de nouveaux complexes pré-RCs en phase S. Il est à souligner ici que les modèles sur les facteurs limitant une initiation excessive de la réplication chez les différents organismes modèles étudiés divergent d'une espèce à l'autre (Figure 15). Néanmoins,

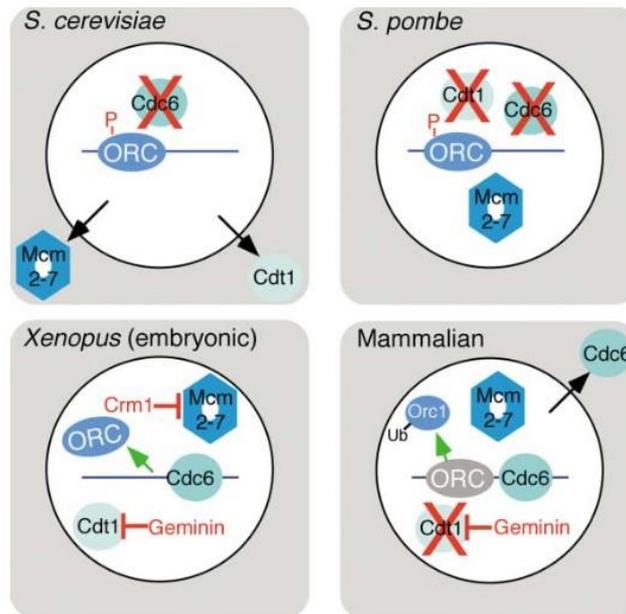


Figure 15. Divergence des mécanismes inhibiteurs de l'initiation de la réplication chez différents organismes modèles. Les composants du pré-RC peuvent être régulés par export nucléaire (flèches noires), protéolyse (croix rouges), phosphorylation (ORC) ou par la fixation d'inhibiteurs spécifiques (Geminin pour Cdt1 et Crm1 pour MCM). Chez les vertébrés, on peut également observer une dissociation des complexes ORC de la chromatine (Orc1, flèche verte). D'après (Kearsey & Cotterill, 2003).

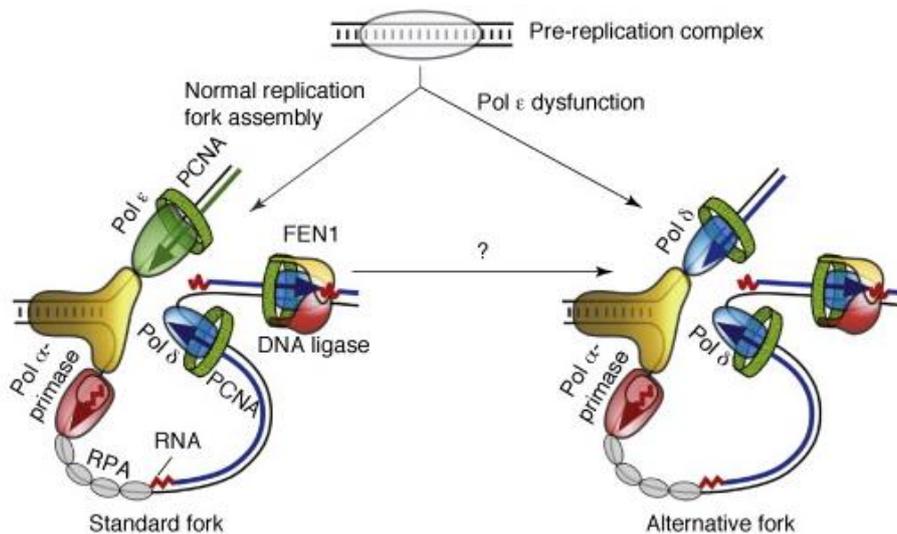


Figure 16. Modèles de fourche de réplication eucaryote canonique (à gauche) et alternatif (à droite). MCM est représenté en jaune. Différentes conditions de stress, autres qu'une dysfonction de Pol ϵ , peuvent induire la formation d'une fourche non-canonique dès l'assemblage à l'origine jusqu'à la reprise de la réplication suite à la rencontre d'un obstacle. D'après (Kunkel & Burgers, 2008).

il n'est pas exclu que cela soit en partie dépendant des méthodes d'études propre à chaque organisme (Kearsey & Cotterill, 2003).

1.1.2. Elongation

Chaque pré-IC est converti en deux fourches de réplication se déplaçant en direction opposées l'une de l'autre, chacune étant régie par un réplisome autonome (Yardimci *et al.*, 2010). La bulle de réplication ainsi formée va s'étendre depuis le site d'origine : c'est la phase d'élongation.

La réplication de l'ADN est semi-conservative : chaque brin de la double hélice sert de matrice aux polymérases. Il y a plus de 40 ans, les travaux des Okazaki (Okazaki *et al.*, 1968) mettent en lumière que les deux brins matrices sont répliqués différemment. Cela est dû à la nature antiparallèle de la double hélice et à la polarité d'action des polymérases répliquatives. Chez les eucaryotes, il y a trois polymérases principales : les polymérases (Pol) α , Pol δ et Pol ϵ (Figure 16). Le brin néo-synthétisé dans la même direction que celle de la progression de la fourche est répliqué de manière continue. C'est le brin dit précoce, qui est synthétisé par la Pol ϵ . Le second brin néo-synthétisé, dans le sens opposé à celui de l'avancée de la fourche, est qualifié de brin retard : sa synthèse est discontinue et médiée par la Pol δ (Georgescu *et al.*, 2015; Miyabe *et al.*, 2011; Nick McElhinny *et al.*, 2008). Ce modèle de répartition de brins à répliquer entre les Pol δ et Pol ϵ peut néanmoins avoir une certaine souplesse. Pol δ pourrait participer à l'initiation et la terminaison de la réplication des deux brins, et reprendre la synthèse du brin précoce dans certaines conditions d'adaptation au stress (Kunkel & Burgers, 2008; Miyabe *et al.*, 2015; Zhou *et al.*, 2019).

La synthèse des nouveaux brins, qu'ils soient précoces ou tardifs, repose sur le complexe Pol α -primase. Ce complexe forme des fragments chimères ARN-ADN nécessaires pour amorcer l'action de la polymérase δ . La synthèse de ces amorces est initiée grâce à l'activité primase du complexe qui permet la formation d'une courte séquence de 7 à 12 ribonucléotides. Cette taille est limitée par les propriétés intrinsèques à la sous-unité primase, autorégulant son activité catalytique (Baranovskiy *et al.*, 2016). Une fois cette taille atteinte, le complexe bascule sur l'utilisation de son activité d'ADN polymérase. L'amorce d'ARN est étendue par l'ajout de 20-30 nucléotides, *i.e.* jusqu'à ce que la taille des fragments chimères ARN-ADN soit suffisante pour être reconnus par la Pol δ qui est plus processive. En se fixant à l'extrémité de l'amorce, le facteur RFC permet le recrutement de PCNA. La présence de PCNA induit le recrutement de Pol δ , qui poursuit la synthèse d'ADN. La synthèse du brin précoce va être reprise en charge par la Pol ϵ . Sur le brin tardif, les amorces multiples du complexe Pol α -primase sont étendues par Pol δ et forment les fragments d'Okazaki. Lorsqu'ils se rejoignent, les fragments sont ligaturés entre eux pour

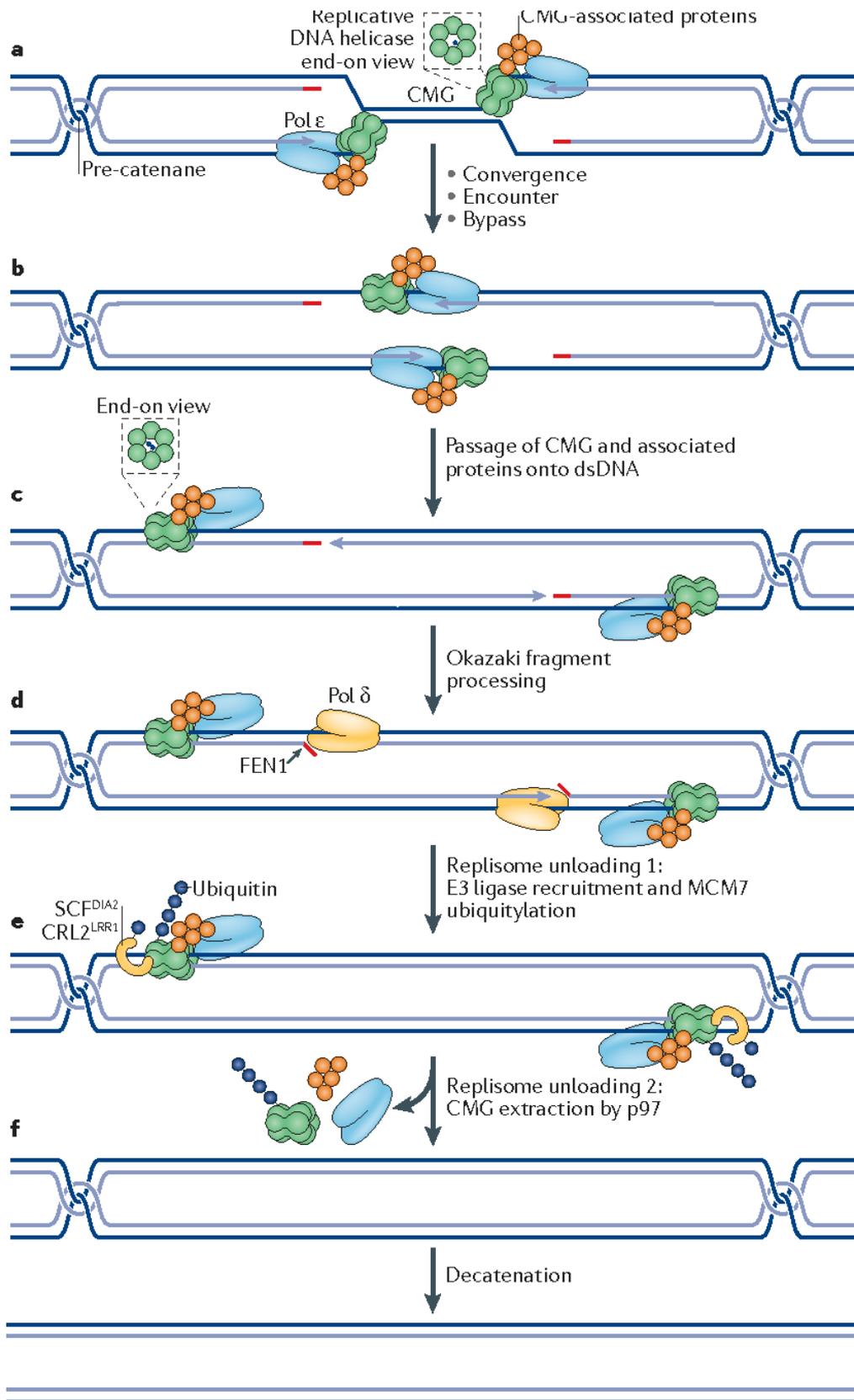


Figure 17. Modèle de terminaison de la réplication chez les eucaryotes. D'après (Dewar & Walter, 2017).

permettre la formation d'un brin continu. Cela implique que l'amorce ARN doit être retirée avant l'étape de ligature. Les mécanismes dits de maturation des fragments d'Okazaki et de leurs amorces ARN seront développés plus en détails dans le chapitre V de cette introduction.

1.1.3. Terminaison

La réplication se termine lorsque deux fourches convergentes se rencontrent et fusionnent. Les étapes de ce processus ne sont pas encore bien comprises (Dewar & Walter, 2017). Elles semblent comprendre néanmoins trois points importants : résoudre les tensions topologiques, combler les discontinuités restantes et décharger le réplisome (Figure 17).

L'avancée du réplisome crée inévitablement des tensions topologiques en amont de la fourche. Celles-ci doivent être constamment résolues lors de la phase d'élongation afin d'éviter qu'elles ne deviennent trop importantes et bloquent l'avancée de la fourche. Ces tensions sont résolues par des enzymes dédiées, les topoisomérases de type I et II ; ou bien par simple rotation de la fourche dans le sens contraire à la torsion (Keszthelyi *et al.*, 2016). Cette dernière solution crée des pré-caténanes derrière la fourche : les chromatides sœurs s'enroulent. Les pré-caténanes, converties en caténanes, sont résolues par les topoisomérases de type II. A l'approche du point de convergence de deux fourches, la portion d'ADN parental devient trop courte et raide pour accumuler de nouvelles tensions. La résolution du stress topologique final repose entièrement sur la résolution des caténanes restantes.

Aussi, lorsque deux fourches fusionnent, l'extrémité 3' du brin précoce de l'une se retrouve apposée à l'extrémité du dernier fragment d'Okazaki de la seconde. Il faut donc à ce niveau assurer la complétion de la synthèse et la ligature des fragments adjacents. Le dernier fragment d'Okazaki est alors maturé. On ne sait pas si le(s) mécanisme(s) de maturation en phase de terminaison diffère(nt) de ceux pouvant être utilisés en phase d'élongation.

Enfin, les réplisomes se dissocient, possiblement grâce à l'aide de facteurs auxiliaires. Il semble notamment que ce soit le cas pour médier la dissociation active des complexes CMG, *via* l'action d'ubiquitine ligases (Dewar *et al.*, 2017; Maric *et al.*, 2014). Comment les réplisomes en phase terminale sont discriminés de ceux en cours de réplication est une question qui demeure à ce jour sans réponse. La régulation de la dissociation des réplisomes est pourtant d'une importance capitale aux vues des conséquences désastreuses que tout dysfonctionnement pourrait engendrer.

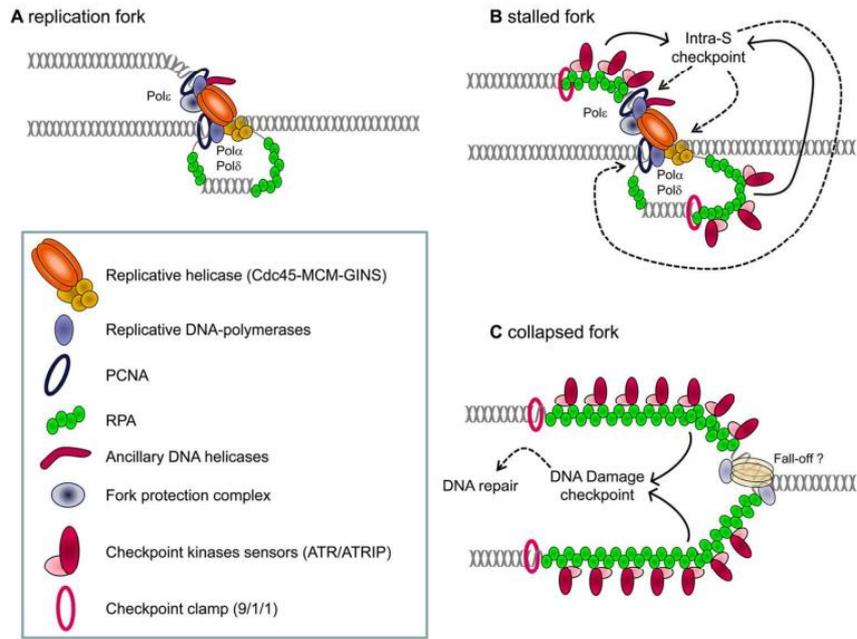


Figure 18. Modèles d'une fourche de réplication eucaryotes fonctionnelle, en pause et dysfonctionnelle. D'après (Lambert & Carr, 2013).

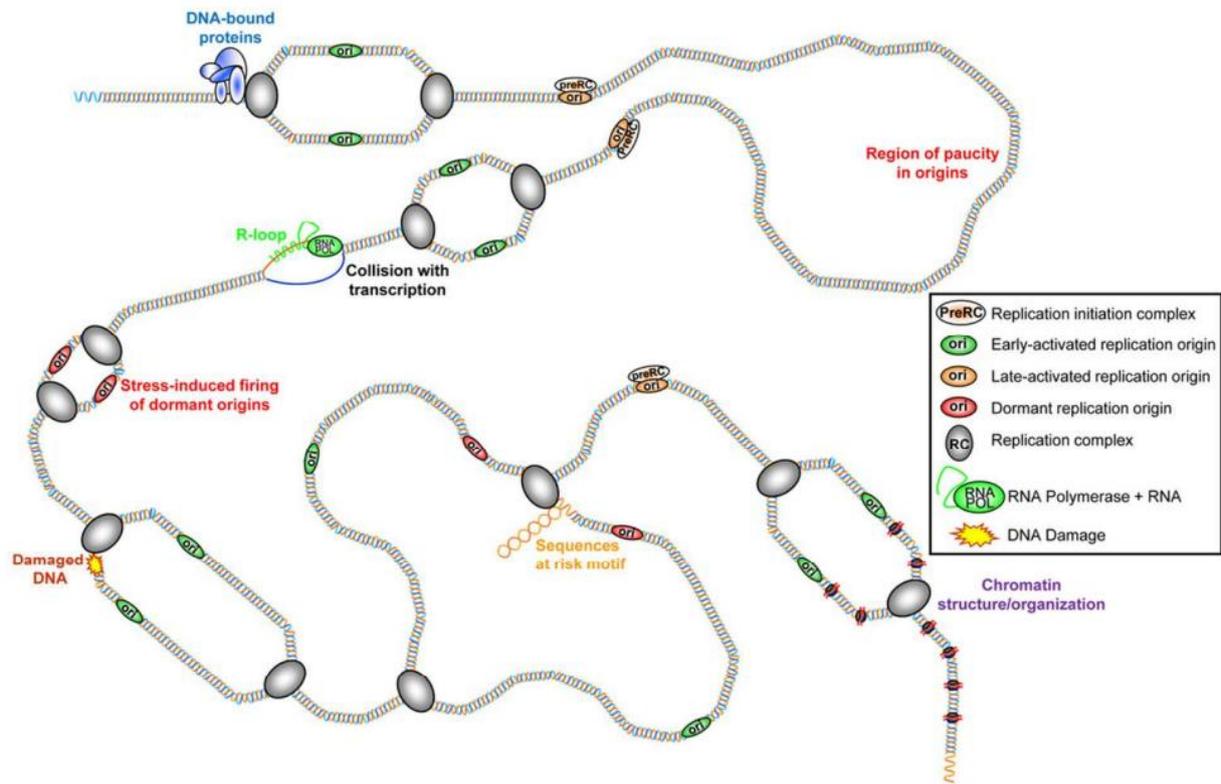


Figure 19. Les différents types d'obstacles ou RFBs. D'après (Lambert & Carr, 2013).

1.2. Stress réplicatif

1.2.1. Les différentes sources de stress

Le déroulement du processus de réplication présenté dans la partie précédente est un scénario idéal, lorsque chaque étape du processus y est correctement régulée et qu'aucun facteur ne vient en perturber la mise en place. Cependant la réplication de l'ADN est constamment soumise à diverses formes de stress susceptibles d'en altérer la complétion. On parle ici de stress réplicatif.

La présence de stress réplicatif se traduit par le ralentissement ou l'arrêt des fourches de réplication, de manière locale ou globale, en fonction de la source de stress. Lorsqu'une fourche s'arrête, deux situations sont possibles : soit la réplication peut reprendre lorsque la source de stress est retirée, soit la reprise est impossible, malgré le retrait de l'élément perturbateur. On parle alors de fourches en pause (*stalled forks*) et de fourches dysfonctionnelles (*collapsed forks*), respectivement (Figure 18).

Une carence en facteurs de réplication ou d'activation d'origine de réplication peut affecter de façon globale le processus de réplication. Une telle situation peut être induite, par exemple, par la présence d'agents génotoxiques tels que l'hydroxyurée ou l'aphidicoline, affectant respectivement la production de dNTPs et l'action de la Pol α .

Aussi, la progression des fourches peut être compromise de manière localisée par la présence d'obstacles sur le génome appelés RFBs pour *Replication Fork Barriers* (Figure 19). Ces obstacles peuvent déstabiliser le réplisome et impacter l'intégrité de la fourche. La présence de ces obstacles est intrinsèque à la vie de la cellule, qu'ils résultent de divers processus du métabolisme, ou bien qu'ils soient induits par des agents génotoxiques exogènes. Ces RFBs peuvent être des bases endommagées, des structures secondaires particulières ou encore certaines régions difficiles à répliquer. Ce sont aussi des complexes protéiques fixés à l'ADN ou encore des sites de rencontre avec la machinerie de transcription et d'hybrides ARN:ADN (Lambert & Carr, 2013; Mirkin & Mirkin, 2007).

Dans le cadre de cette thèse, je me suis intéressée à l'impact de la présence d'hybrides ARN:ADN au niveau d'une RFB (*RTS1-RFB*), induite par la fixation d'une protéine à l'ADN. Les chapitres suivants seront consacrés à présenter les relations à double-tranchant entre la présence de ces structures hybrides et les mécanismes de réparation et réplication de l'ADN. Je détaillerai dans la dernière partie de cette introduction le système expérimental *RTS1-RFB*.

1.2.2. La gestion du stress réplicatif

Les RFBs ne peuvent pas toujours être résolues avant l'arrivée de la fourche opposée. En conséquent, différents mécanismes de prise en charge des fourches bloquées permettent de veiller à la complétion correcte du processus (Weinert *et al.*, 2009).

Que les fourches soient en pause ou dysfonctionnelles, l'altération de leur progression entraîne l'exposition d'ADNsb (Figure 18). Lorsqu'elles sont ralenties ou en pause, la taille de la séquence exposée sera limitée par l'activation du point de contrôle interne à la phase S (Falck *et al.*, 2001; Sogo *et al.*, 2002). La fourche et son réplisome sont stabilisés et protégés jusqu'à ce que la reprise de la réplication soit possible ou qu'une fourche convergente arrive. En revanche, aux fourches dysfonctionnelles, c'est une plus large séquence d'ADNsb qui est exposée. On observe cette situation notamment lorsque le point de contrôle a été défaillant dans sa mission de reconnaissance des fourches à problème. Dans ce cas, CMG continue à ouvrir le duplex parental alors que les polymérases sont arrêtées : les activités hélicase et polymérase étant découplées, le réplisome perd sa fonctionnalité. Cela induit l'activation des facteurs de DDR. La réplication ne pourra pas reprendre sans l'intervention de ces facteurs pour reformer un réplisome compétent. Dans les deux prochaines sections, je m'attacherai à décrire le rôle de certains facteurs du NHEJ et de la RH dans la gestion du stress réplicatif.

Ces mécanismes de sauvetage sont donc d'une importance capitale pour garantir qu'il ne reste aucune zone endommagée et non-répliquée avant l'entrée en mitose. L'échec de leur mise en place entraîne une instabilité génomique accrue voire la mort cellulaire (Ait Saada *et al.*, 2017; Caspari & Carr, 1999; Palou *et al.*, 2015; Sancar *et al.*, 2004).

2. Rôle des facteurs du NHEJ dans la gestion du stress réplicatif

L'absence des facteurs Ku et XRCC4 induit une sensibilité accrue aux agents inhibiteurs de la réplication (Miyoshi *et al.*, 2009; Saintigny *et al.*, 2001). Ces observations ont été les premières à suggérer un rôle des facteurs de NHEJ dans la protection de brins néo-synthétisés, la réparation et le redémarrage des fourches bloquées.

Le rôle de Ku dans la protection des fourches de réplication est dissocié de son rôle dans le NHEJ (Miyoshi *et al.*, 2009; Sánchez & Russell, 2015). Plusieurs situations impliquant le recrutement de Ku aux fourches bloquées ont été étudiées. Premièrement au locus de l'ADN ribosomique (rDNA), dont la structure particulière est composée d'unités répétées. Il existe à ce locus une RFB naturelle, conservée au cours de l'évolution. Ce site de pause de la réplication est à risque, en particulier car il peut être soumis à l'action des recombinaisons. Or tout événement de variation du nombre de répétitions du locus, ou leur réarrangement, pourrait mettre en péril la production

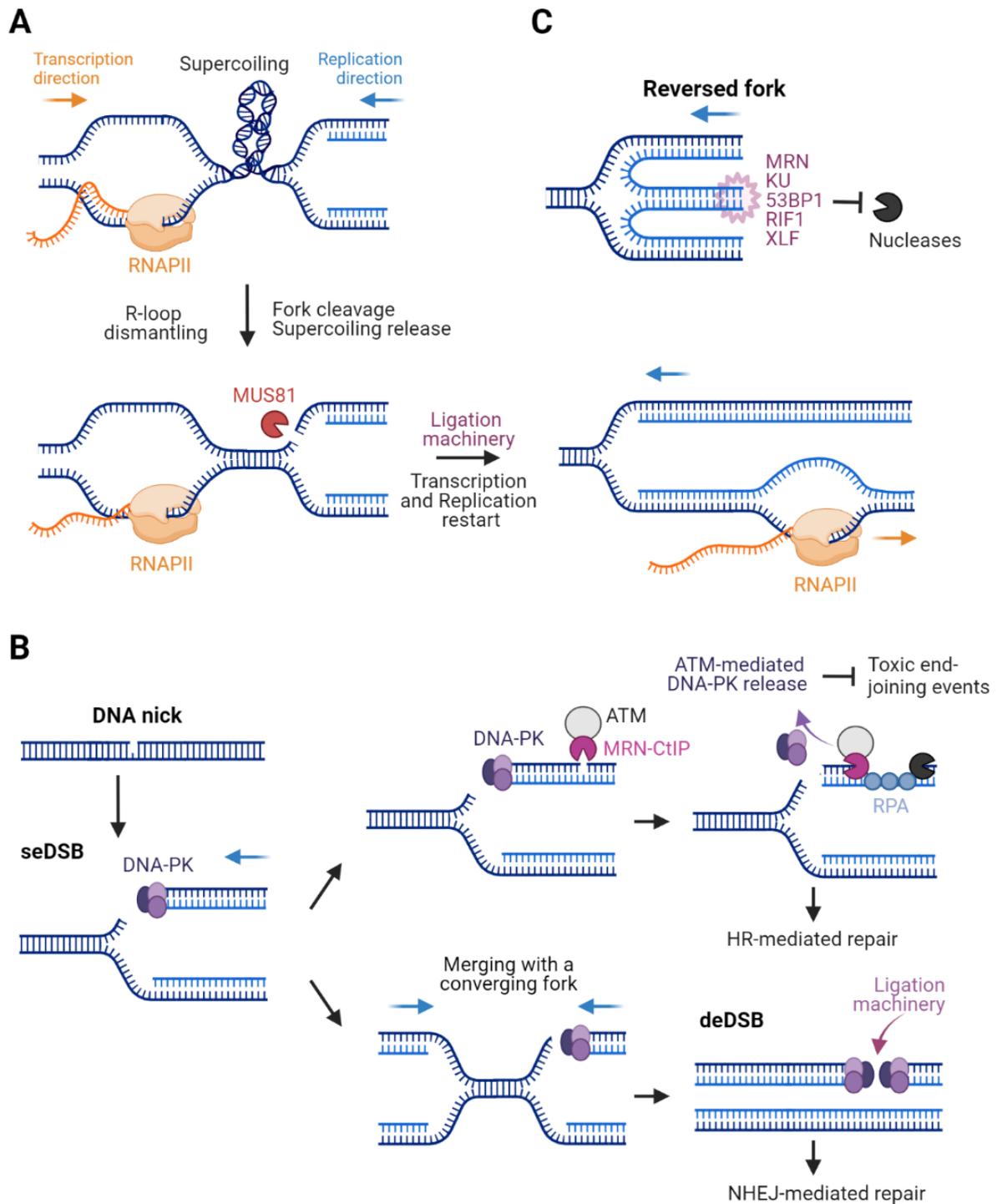


Figure 20. Les facteurs du NHEJ dans la gestion du stress réplcatif. (A) Les facteurs du NHEJ dans la résolution de conflit transcription-réplication. (B) Rôle de facteurs du NHEJ dans la réparation des cassures double-brin à simple et double extrémités, respectivement seDSB et deDSB. (C) Les facteurs du NHEJ dans la protection des brins néo-synthétisés contre les attaques de nucléases. D'après (Audoynaud *et al.*, 2021).

des ribosomes. La présence de Ku y permettrait donc de contrecarrer ces évènements de recombinaison, dont les conséquences seraient catastrophiques (Miyoshi *et al.*, 2009). Le même modèle s'applique aux télomères. Les régions télomériques sont également des régions répétées particulières, très vulnérables en présence de stress réplicatif. Il a été montré, chez les levures et les mammifères, que Ku y a une fonction protectrice contre les évènements de résection et de recombinaison qui pourraient les écourter (Baumann & Cech, 2000; Celli *et al.*, 2006; Polotnianka *et al.*, 1998; Simon *et al.*, 2016). En outre, des études suggèrent que Ku serait associé à certaines origines de réplication (Cosgrove *et al.*, 2002; Novac *et al.*, 2001; Shakibai *et al.*, 1996). Il semblerait qu'aux télomères spécifiquement, la perte de Ku puisse être une source de stress réplicatif de par son influence sur la mobilité de ces régions à la périphérie nucléaire, un paramètre régulant l'activation des origines chez *S. cerevisiae* (Cosgrove *et al.*, 2002).

De manière plus générale, Ku peut être recruté aux fourches présentant une extrémité double-brin ([Figure 20, panel B](#)). Cela peut se produire selon différents scénarios. D'une part, dans le cadre où une fourche de réplication rencontre une lésion d'ADNsb et se casse. La chromatide portant le dommage est alors désolidarisée de la fourche, formant une CDB à extrémité unique (CDB-se). Si la fourche convergente atteint ce site de cassure avant sa réparation, la CDB-se est alors convertie en CDB-de. Puisqu'une seule extrémité est présente, la méthode de réparation préférentielle des CDB-se va être la RH (Ensminger & Löbrich, 2020). Les CDB-se sont reconnues par Ku. Il est proposé que dans ce contexte, bien que la résection puisse être initiée en sa présence, Ku doit être éliminé pour promouvoir la formation du filament de Rad51. L'action coordonnée de MRN et CtIP permet d'initier la résection et de médier l'éviction de Ku (Balestrini *et al.*, 2013; Chanut *et al.*, 2016).

Un autre cas de figure peut entraîner la formation d'une extrémité double-brin aux fourches de réplication bloquées. Ces fourches peuvent être remodelées et adopter une structure de fourche dite réversée (Neelsen & Lopes, 2015) ([Figure 20, panel C](#)). Cette conversion s'opère *via* le ré-appariement des brins parentaux, et l'appariement des brins néo-synthétisés entre eux. Ces derniers forment une extrémité double-brin différant d'une CDB-se (Berti *et al.*, 2020). Des études suggèrent que la réversion de fourche est un mécanisme favorisant la stabilisation et le redémarrage de la fourche, notamment par la RH car elle crée un point d'entrée pour la dégradation des brins naissants (Neelsen & Lopes, 2015; Zellweger *et al.*, 2015). Bien que l'exposition d'ADNsb soit requise (Ait Saada *et al.*, 2018; Pasero & Vindigni, 2017), une résection excessive est toxique pour la survie cellulaire (Berti *et al.*, 2020). Il a été proposé que plusieurs facteurs du NHEJ, dont Ku mais aussi XLF, RIF1 et 53BP1 agissent aux fourches réversées comme barrière contre la résection excessive des brins naissants (B.-R. Chen

et al., 2019; Garzón *et al.*, 2019; W. Liu *et al.*, 2020; Mukherjee *et al.*, 2019; Sánchez & Russell, 2015; Teixeira-Silva *et al.*, 2017; F. Zhao *et al.*, 2020).

Il est important de noter ici que ces facteurs du NHEJ permettent la protection et le redémarrage des fourches bloquées, indépendamment de leur rôle canonique dans le NHEJ. Tout évènement de ligature inapproprié à ces extrémités double-brin aurait un effet désastreux. Par exemple, l'engagement vers un processus de réparation des CDB-se par ligature à une seconde extrémité doit être maîtrisé, car la jonction d'extrémités en provenance de loci différents génèrerait des réarrangements chromosomiques non désirés (Balmus *et al.*, 2019; Britton *et al.*, 2020). Mais ce n'est pas pour autant que le complexe de ligature du NHEJ n'intervient pas en réponse au stress répliatif. Dans une situation de rencontre frontale des machineries de transcription et de réplication, il a été proposé qu'un clivage de la fourche par MUS81 permette d'en faciliter le croisement (Figure 20, panel A). L'incision sera réparée par l'action de Rad52 et du complexe XRCC4-Lig4 (Chappidi *et al.*, 2020).

3. Rôle des facteurs de la RH dans la gestion du stress répliatif

L'activité de la RH est retrouvée majoritairement en phase S, où elle s'avère intimement liée au processus de réplication (Costes & Lambert, 2012). La déficience en facteurs de recombinaison entraîne une réduction de la vitesse de progression des fourches, ce qui suggère que la machinerie de recombinaison escorte le réplisome et promeut la synthèse d'ADN (Daboussi *et al.*, 2008). Il a notamment été suggéré que les réplisomes dysfonctionnels peuvent être rebâtis par les facteurs de RH (Hashimoto *et al.*, 2012). En fait, la RH est un mécanisme de sauvetage à plusieurs casquettes, qui s'avère indispensable pour protéger, réparer et redémarrer les fourches de réplication bloquées.

3.1. Les mécanismes de tolérance aux dommages

Dans certaines situations, le sauvetage par fusion entre fourches convergentes ne peut pas avoir lieu. Cela pourra être le cas notamment au niveau de régions pauvres en origines de réplication, aux régions répliquées unidirectionnellement ou encore lorsque l'arrivée de la fourche convergente est elle-même compromise. La reprise de la réplication repose alors sur deux possibilités : réparer et redémarrer la fourche, ou bien contourner le dommage et en différer la réparation. On parle dans ce dernier cas de réparation post-répliatif (Branzei & Szakal, 2016). Le mode de contournement du dommage va être régulé par le type de modifications post-traductionnelles arboré par PCNA (Andersen *et al.*, 2008). C'est son degré d'ubiquitination (mono- ou poly-ubiquitination) qui va influencer le choix de contournement, en modulant son interaction avec les différents acteurs. Ce modèle de régulation *via* PCNA proposé chez

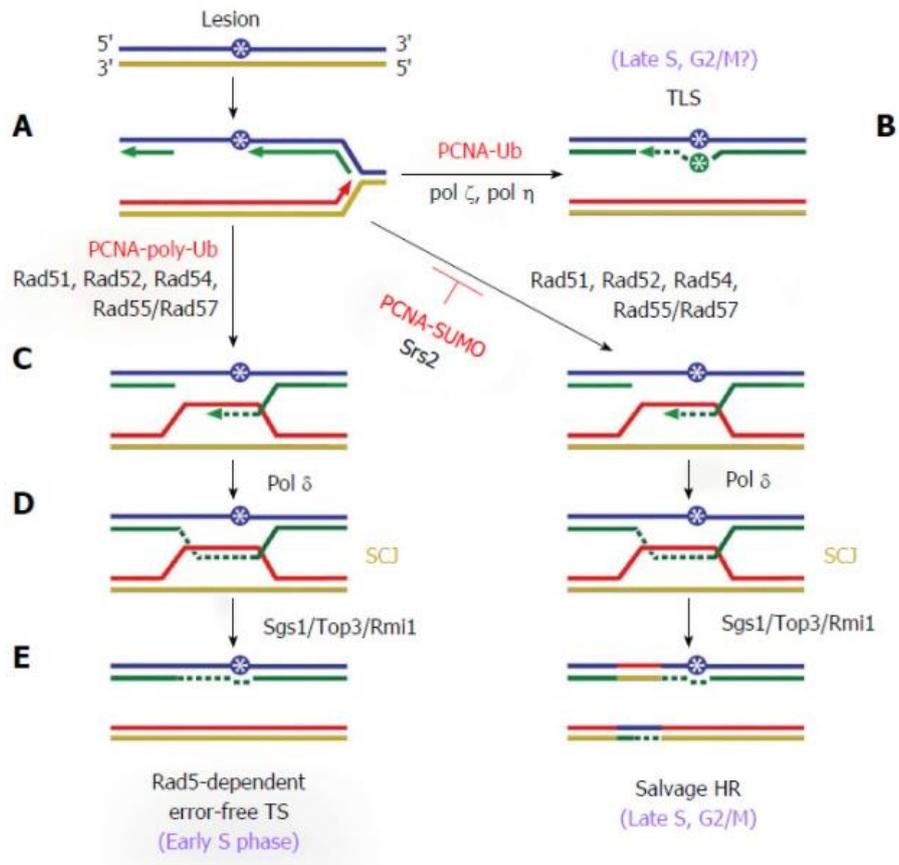


Figure 21. Mécanismes de tolérance aux dommages chez *S. cerevisiae*. Abréviations : TLS: Translesion synthesis; TS: Template-switch; SCJ: Sister chromatid junction; Ub: Ubiquitin; HR: Homologous recombination. D'après (Bi, 2015).

S. cerevisiae est probablement conservé chez les métazoaires, chez qui les différents modes de contournement sont conservés (Unk *et al.*, 2006; Xiao *et al.*, 1998). La forme mono-ubiquitinilée de PCNA par le complexe ubiquitine ligase Rad6-Rad18 promeut l'utilisation de polymérases trans-lésionnelles, ce qui peut permettre de poursuivre l'insertion de nucléotides en face d'une lésion (Waters *et al.*, 2009) (Figure 21, panel B). Ces polymérases présentent des mécanismes de polymérisation distincts de ceux des polymérases répliquatives Pol α /Pol ϵ /Pol δ , ce qui les rend intrinsèquement bien moins fidèles. Bien que la complétion de la réplication soit grâce à cela favorisée, c'est au détriment de la conservation de l'information génétique. Les polymérases trans-lésionnelles sont donc particulièrement mutagènes. Il est à noter que ces généralités ne s'appliquent pas à la Pol η , qui s'avère extrêmement fidèle pour le contournement de lésions induites par les irradiations UVs. En revanche, c'est l'ADN polymérase qui présente le taux de fidélité le plus faible pour la réplication d'une matrice non-endommagée (Waters *et al.*, 2009).

Le complexe Mms2-Ubc13-Rad5 peut médier l'extension de la mono-ubiquitination de PCNA. Sous cette forme poly-ubiquitinilée, l'utilisation des polymérases trans-lésionnelles est délaissée au profit d'un changement de matrice (mécanisme de *template-switch*). C'est le brin de la chromatide sœur portant la séquence intacte qui sert alors de matrice à la réplication (Lopes *et al.*, 2006) (Figure 21, panel C/D/E). Ce mécanisme de tolérance aux dommages est donc plus conservatif que l'utilisation de polymérases trans-lésionnelles. On retrouve dans ce cas de figure la formation de structures d'intermédiaires de recombinaison, qui seront résolues par Sgs1/BLM (Liberi *et al.*, 2005). Aussi, il a été montré que Rad51 et Rad52 étaient associés aux fourches, même en absence de dommage (González-Prieto *et al.*, 2013). Cela pourrait augmenter la capacité des fourches à passer aux travers des régions endommagées, en permettant, entre autres, ces réactions d'échange de brin avec la chromatide sœur.

Il est à noter que PCNA est présent à la fourche sous forme de trimère, formant un anneau coulissant le long du brin d'ADN qu'il fixe. Il reste cependant à ce jour mal compris comment les modifications post-traductionnelles s'organisent sur ce trimère, et quelle est leur dynamique dans l'orchestration de la tolérance aux dommages.

3.2. La réversion de fourche

Initialement, il a été proposé que la réversion de fourche était un mécanisme de soutien pour la tolérance aux dommages chez les mammifères (Higgins *et al.*, 1976). Par la suite, cet événement a pu souvent être considéré comme une conséquence pathologique de l'arrêt de la réplication car il a beaucoup été étudié dans un contexte où les fourches bloquées étaient dysfonctionnelles, et le point de contrôle de phase S

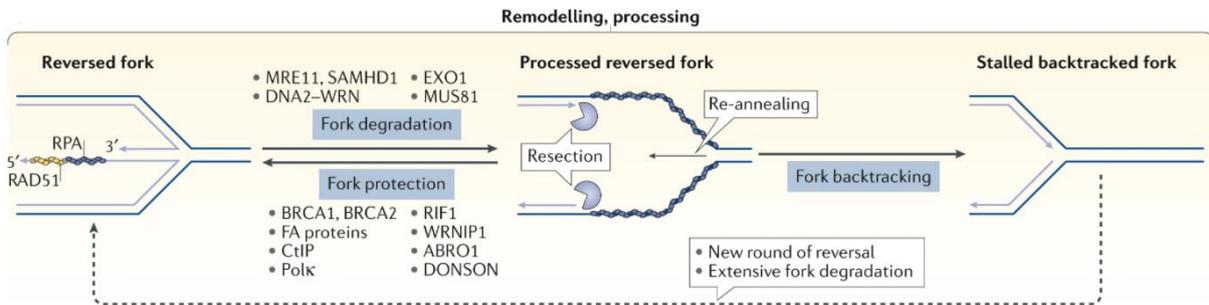


Figure 22. Modèle de protection et dégradation des fourches réversées chez les mammifères. La protection des fourches réversées est assurée par divers facteurs dépendamment (BRCA1, BRCA2, FA) ou non (CtiP, RIF1, WRNIP1, ABRO1, DONSON) de la fixation de Rad51. Il est proposé que plusieurs cycles de réversion, dégradation, et recul de la fourche puissent être nécessaires avant la reprise de la réplication. Modifiée de (Berti *et al.*, 2020).

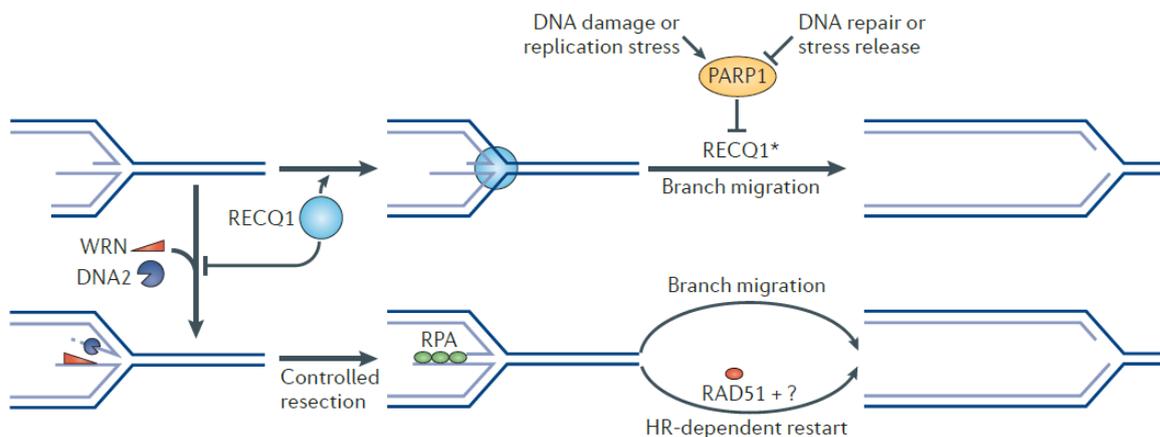


Figure 23. Modèles de redémarrage des fourches réversées chez les mammifères *in vivo*. Modifiée de (Neelsen & Lopes, 2015)

inactivé (Branzei & Foiani, 2010; J. Hu *et al.*, 2012; Ray Chaudhuri *et al.*, 2012; Sogo *et al.*, 2002). En l'absence de régulation, les fourches réversées sont des précurseurs de réarrangements chromosomiques. Cela pourrait être entraîné, par exemple, par le risque d'un mauvais alignement des brins sur des régions répétées. De plus, cette conformation expose les fourches au clivage par des nucléases, comme Mus81 (Neelsen *et al.*, 2013), lorsque leur régulation n'est plus assurée (Figure 22).

De récentes avancées ont pu mettre en avant que le phénomène de réversion de fourches s'avérait être une réponse physiologique globale à diverses sources de stress réplicatif (Berti *et al.*, 2020; Neelsen & Lopes, 2015; Zellweger *et al.*, 2015). La formation de ces structures permettrait de maintenir la fourche dans une conformation stable dans l'attente de la mise en place des mécanismes de réparation ou de tolérance des lésions. Chez les mammifères, la réversion serait modulée par RPA et Rad51 (Bhat & Cortez, 2018). Elle ne serait pas pour autant dépendante de la formation d'un filament nucléoprotéique stable (Mijic *et al.*, 2017). Aussi, de nombreuses hélicases semblent promouvoir la réversion, comme FBH1, BLM ou encore SMARCAL1 (Neelsen & Lopes, 2015). Néanmoins les tenants de la mise en place de la réversion de fourche *in vivo* restent encore très flous.

Le redémarrage des fourches réversées est médié de deux manières (Figure 23). RECQ1 a été identifié chez les mammifères comme étant une hélicase spécialisée dans la résolution des fourches réversées. Son action est inhibée par PARP1. L'activité de PARP1 étant liée à la présence de dommage, cela permet de coordonner la fin de la réparation de la lésion avec la résolution de la réversion (Berti *et al.*, 2013; Zellweger *et al.*, 2015). D'autre part, un second mécanisme de résolution repose sur l'action de WRN et DNA2. Ensemble, leurs activités nucléase et hélicase vont promouvoir la résection des brins naissants. Ce procédé est indépendant de MRN/CtIP et EXO1 chez l'homme (Thangavel *et al.*, 2015). Une fonction similaire pour Dna2 chez *S. pombe* a été montré (J. Hu *et al.*, 2012). Son action est contrôlée par Cds1, indiquant que la présence de fourches réversées serait sous le contrôle du point de contrôle de phase S. Ce second scénario pourrait promouvoir l'invasion de la chromatide sœur par un brin naissant et permettre le redémarrage par la voie de RH. Ces deux voies de résolution sont exclusives, car la présence de RECQ1 inhibe les activités de WRN et DNA2 (Neelsen & Lopes, 2015).

3.3. La protection des fourches

Comme évoqué précédemment, le niveau d'ADNsb exposé aux fourches de réplication doit être régulé extrêmement finement. Une surexposition d'ADNsb aux fourches bloquées se traduit par l'épuisement de la réserve de RPA : le manque de protection qui en découle induit à terme la cassure des fourches (Toledo *et al.*, 2013). Cela enclanch-

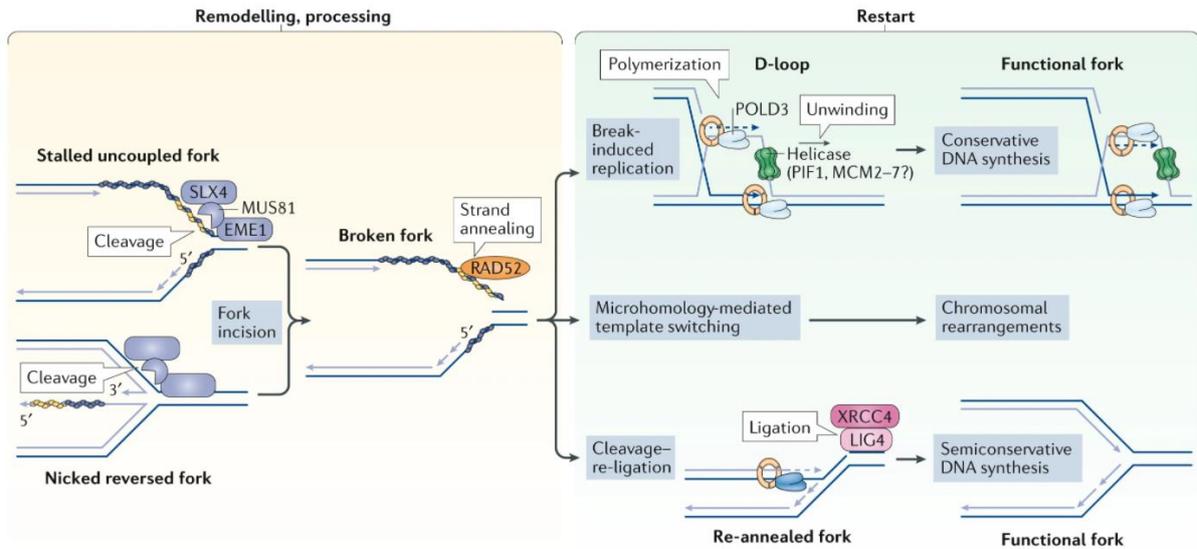


Figure 24. Mécanismes de redémarrage de fourche de réplication cassée. Les fourches découplées ou réversées peuvent être clivées par Mus81. La rencontre avec une cassure sur le duplex parental peut aussi induire la cassure d'une fourche. Les fourches cassées peuvent être réparée par BIR. De façon alternative, on peut aussi observer un changement de matrice si des régions de micro-homologies sont présentes. Dans le cas d'une cassure suite à un conflit réplication-transcription, la chromatide dissociée peut être religaturée directement sur la fourche. D'après (Berti *et al.*, 2020).

-erait des évènements de RH inappropriés dans de nombreux contextes de blocage de fourches (Lambert *et al.*, 2005). En conséquent, comme c'est le cas pour des facteurs du NHEJ, certains facteurs de la RH jouent ici un rôle différent de leur fonction recombinase observée pour la réparation des CDBs. On pourra évoquer ici les fonctions de BRCA2, Rad52 et Rad51, entre autres, dans la protection des fourches de réplication bloquées, réversées ou non, *via* le contrôle de la résection (Hashimoto *et al.*, 2010; Lomonosov *et al.*, 2003; Petermann *et al.*, 2010; Schlacher *et al.*, 2011). Diverses études proposent que la formation d'un filament stable de Rad51, grâce à ses médiateurs et co-facteurs, bloque l'accès des brins néo-synthétisés aux nucléases. La coopération entre les facteurs de la RH et des suppresseurs de tumeur de la voie FA (*Fanconi anemia*) a notamment été mise en lumière dans ce contexte (Higgs *et al.*, 2015; Schlacher *et al.*, 2011, 2012). Ainsi protégées, les fourches en pause conservent leur intégrité jusqu'à l'arrivée de la fourche convergente. D'ailleurs, la protection des fourches par Rad51 est nécessaire au succès de la fusion des deux unités de réplication. En absence de Rad52/Rad51, il a été montré chez *S. pombe* que l'échec de fusion de fourches convergentes, dû à la présence d'ADNsb, conduit à l'apparition de défauts mitotiques (Ait Saada *et al.*, 2017).

3.4. La réparation des fourches cassées

Les fourches peuvent casser lors du passage sur une lésion simple-brin ou encore à cause de l'action de nucléases ([Figure 24](#)). Ces fourches présentent alors des CDB-se, ou des CDB-de, qui peuvent être réparées *via* le mécanisme de RH type BIR, présenté précédemment dans la partie sur la réparation des CDBs (Chapitre I, section 1.2.1.3.3) (Hashimoto *et al.*, 2012; S. Li *et al.*, 2021; Mayle *et al.*, 2015; Moriel-Carretero & Aguilera, 2010; Sotiriou *et al.*, 2016). L'échange de brin se fera au niveau de la chromatide sœur.

Il semble que le mécanisme de BIR pour la réparation des fourches bloquées diffère un peu de celui appliqué à la réparation des CDBs, notamment car il peut prendre en charge dans ce contexte des CDB-de (S. Li *et al.*, 2021). De plus, il ne semble pas que le REC, mécanisme de surveillance/activation du BIR en cas de CDBs indépendantes de la réplication, soit requis pour activer la réparation lorsque les fourches se cassent. Dans ce contexte, PCNA et RFC1 sont requis pour l'activation du BIR, et comme ils sont déjà présents, l'hélicase PIF1 est recrutée rapidement *via* PCNA (S. Li *et al.*, 2021).

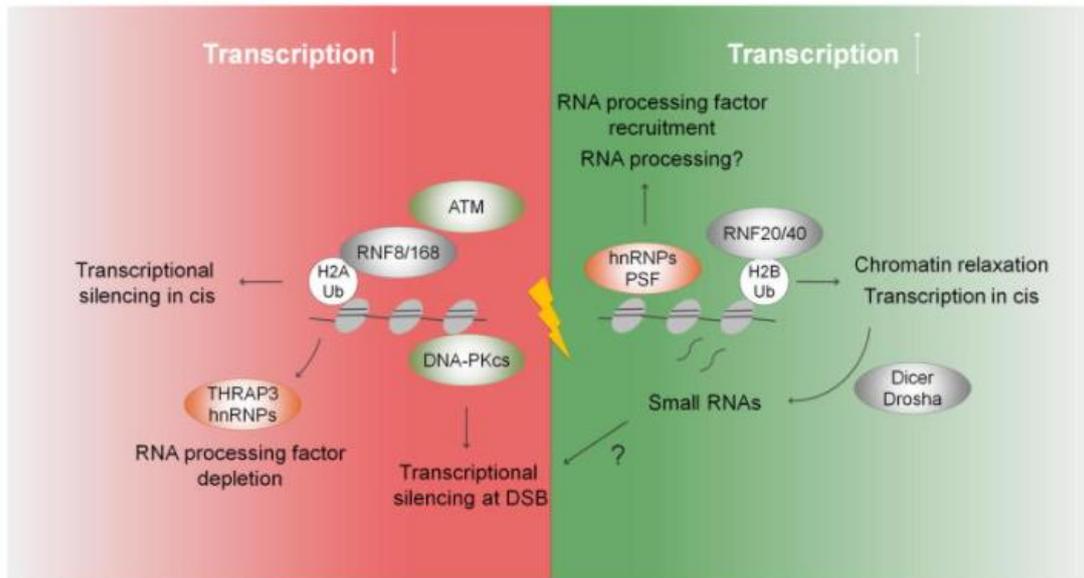


Figure 25. Modulation de l'activité transcriptionnelle en réponse à une CDB. Les facteurs de DDR induisent des changements locaux et globaux de l'activité transcriptionnelle. La partie gauche sur fond rouge illustre les mécanismes de répression de la transcription. La diffusion de l'ubiquitination de H2A (H2A Ub) autour de la cassure est médiée par RNF8/RNF168 et ATM (inhibition globale). Lorsque la cassure est induite dans un gène en cours de transcription par l'ARNPII, l'inhibition localisée de la transcription est assurée par DNA-PKcs. A l'opposé, la partie droite au fond vert reflète les changements chromatinien favorables à la transcription, soutenant que les processus de transcription et de réparation de l'ADN ne sont pas incompatibles. D'après (Burgess *et al.*, 2012).

IV. La présence d'ARN module la réparation des dommages de l'ADN

La régulation des différents mécanismes de DDR a longtemps été présentée comme dépendante de la modulation des interactions protéine-protéine ou protéine-ADN. Cependant ces dernières années, un autre niveau de régulation a été mis en lumière. Les voies de DDR sont également régulées par la présence de molécules d'ARN, dont l'influence sur le maintien de la stabilité du génome est à double-tranchant.

Dans cette quatrième partie, je m'attacherai à présenter les relations entre cette composante ARN et la réparation des dommages survenant dans un contexte non-répliatif. J'évoquerai en détails les liens connus entre ARN et réplication dans le chapitre suivant.

1. Comment et dans quels contextes sont-ils formés ?

Les mécanismes de réparation des dommages à l'ADN ont beaucoup été étudiés en tenant compte du contexte chromatinien et transcriptionnel des régions dans lesquelles ils se forment. Il a été documenté que l'apparition de CDBs avait un effet inhibiteur sur la transcription par les ARN polymérase (ARNPs) chez les mammifères ([Figure 25, panel de gauche](#)). Cette régulation est médiée par ATM et DNA-PKcs (Kakaroukas *et al.*, 2014; M. Kruhlak *et al.*, 2007; Pankotai *et al.*, 2012; Shanbhag *et al.*, 2010). Les modes d'action de ces enzymes seraient différents, bien qu'ils résultent tous deux par l'arrêt de la transcription. Il est proposé qu'ATM induirait un remodelage et une vague d'ubiquitination le long de la chromatine lorsque plusieurs cassures surviennent dans une région activement transcrite (Kakaroukas *et al.*, 2014; Shanbhag *et al.*, 2010). DNA-PKcs permettrait l'éviction de l'ARNPII des CDBs dans les régions activement transcrites (Pankotai *et al.*, 2012). Les mécanismes de transcription et de réparation ont donc longtemps été considérés comme incompatibles.

1.1. La transcription induite par l'apparition de dommage

Néanmoins, de récentes études ont révélé que les relations entre ces deux processus cellulaires étaient plus complexes que ce qu'il n'y paraissait. Premièrement, les ARNs transcrits avant l'apparition de cassures peuvent avoir une fonction de support ou de matrice pour la réparation. De plus, l'apparition de CDB induit la formation *de novo* de transcrits non-codants au site de cassure, dont les fonctions diverses participent à l'activation des voies de DDR et stimulent la réparation. Autour d'une CDB, la chromatine est décondensée de sorte à favoriser le recrutement et l'action des facteurs de réparation (M. J. Kruhlak *et al.*, 2006; Tsukuda *et al.*, 2005; Ziv *et al.*, 2006) ([Figure 25, panel de droite](#)). De plus, cette région arbore des modifications d'histone identiques

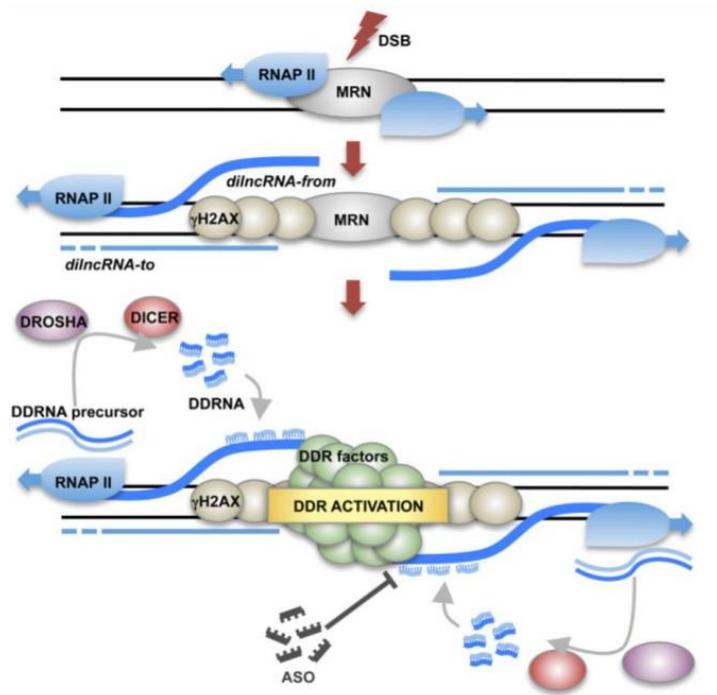


Figure 26. Modèle de production de différentes espèces ARN en réponse à l'apparition de CDB.

La transcription bidirectionnelle par l'ARNPII à chaque extrémité de la CDB produit des dilncRNAs, précurseurs des DDRNAs. D'après (Michellini *et al.*, 2017).

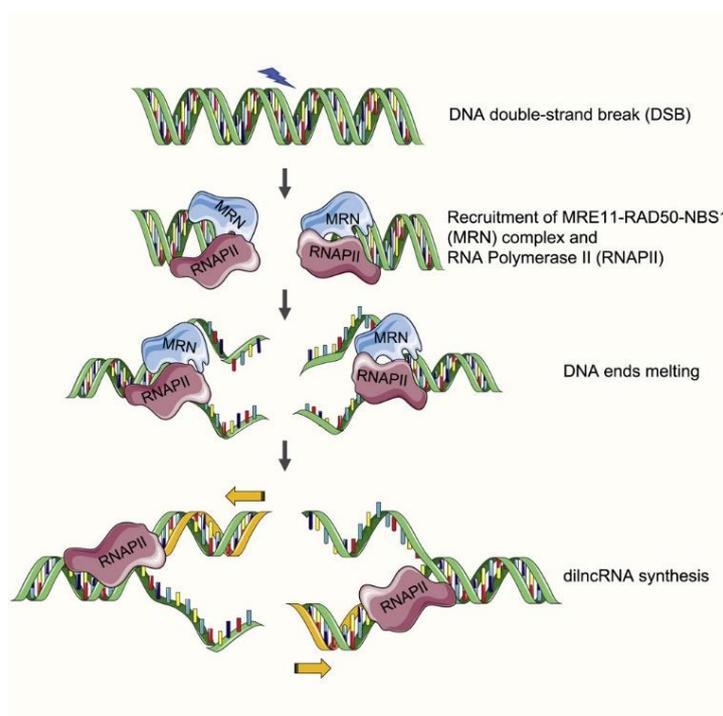


Figure 27. Modèle de formation d'hybride ARN:ADN aux CDBs.

MRN promeut l'ouverture du duplex d'ADN aux extrémités de la cassure. Cela favorise le recrutement de l'ARNPII et la formation de dilncRNAs, qui s'hybrident à leur brin d'ADN matrice. D'après (S. Sharma *et al.*, 2021).

à celles trouvées aux régions promotrices de transcription activées (Vitor *et al.*, 2019). Il est proposé que cette conformation de la chromatine, similaire à celle requise pour la transcription, permette le recrutement *de novo* d'ARN polymérase au site de cassure, indépendamment de la présence de promoteur transcriptionnel. La transcription serait initiée à chaque extrémité de la CDB, produisant des ARNs complémentaires de part et d'autre de la région d'ADN endommagée. Ce modèle a été proposé chez divers organismes, notamment les plantes, les levures et chez l'homme (Michelini *et al.*, 2017; Ohle *et al.*, 2016; W. Wei *et al.*, 2012). La grande majorité de ces études s'est focalisée principalement sur la transcription par l'ARNPII. Les eucaryotes, à l'exception des plantes, ont trois ARN polymérase : les ARNPI, ARNPII et ARNPIII, qui synthétisent respectivement les ARNs ribosomiques, les ARNs messagers (ARNm) et petits ARNs nucléaires, et les ARNs de transfert et autres petits ARNs (Cramer *et al.*, 2008). Il est à noter que très récemment, le recrutement aux CDBs de l'ARNPIII a aussi été observé (S. Liu *et al.*, 2021).

Le modèle initialement répandu, porté notamment par les travaux du groupe de Fabrizio d'Adda di Fagagna, suggère qu'à chacune des extrémités des CDBs la transcription est bidirectionnelle (Michelini *et al.*, 2017; Pessina *et al.*, 2019) (Figure 26). Autrement dit, deux unités de transcription, sens et anti-sens, permettent d'y produire de longs ARNs non-codants (dilncRNAs, pour *damage-induced long non-coding RNAs*). Ces dilncRNAs sont capables de s'apparier entre eux ou à leur brin d'ADN matrice. Dans le premier cas, on assiste à la formation de longs ARNdb, qui serviraient de précurseurs à la génération de plus petits ARNdb d'environ 21 ribonucléotides, les DDRNAs (pour *DDR- RNAs*). D'autre part, les dilncRNAs peuvent s'apparier à leur brin d'ADN matrice, formant alors des hybrides ARN:ADN (S. Sharma *et al.*, 2021) (Figure 27).

1.2. Un modèle très controversé

Ce scénario de transcription initiée en réponse aux CDBs est néanmoins très controversé, notamment à cause des méthodes d'analyse utilisées pour l'établir. Ces études reposent principalement sur l'étude de systèmes rapporteurs très fortement exprimés, ou bien sur celle de loci contenant des séquences répétées (Rossiello *et al.*, 2017). Ces situations peuvent grandement influencer la probabilité d'observer la formation d'ARN au site de cassure. Ainsi, de telles observations n'ont pas été retrouvées dans d'autres contextes d'analyse (Bonath *et al.*, 2018; W.-T. Lu *et al.*, 2018; Miki *et al.*, 2017). Une possible explication serait que l'initiation de la transcription sur une CDB est un évènement fortuit, dépendant du contexte chromatinien et de l'activité transcriptionnelle déjà présente autour du site de cassure. A l'inverse, il est présenté dans plusieurs études que le recrutement de l'ARNPII aux CDBs était un évènement

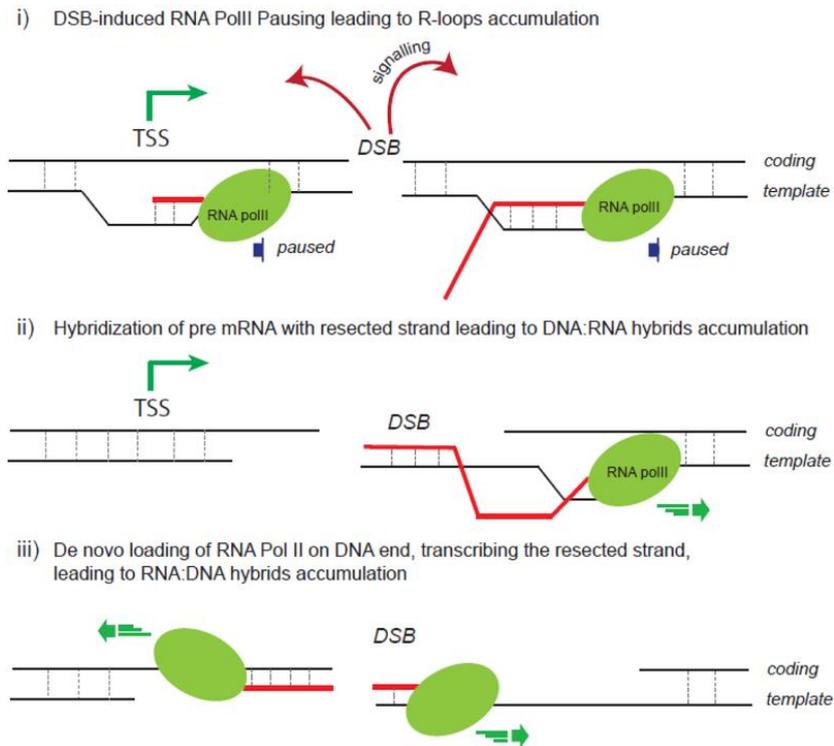


Figure 28. Différents modèles de formation d'hybrides ARN:ADN aux CDBs survenant dans des régions activement transcrites. (i) L'apparition de CDB induit la pause transcriptionnelle des RNAPII adjacentes, favorisant les risques d'hybridation des ARNs en court de transcription à leur brin ADN matrice. (ii) Suite à la résection des extrémités de la cassure, les transcrits présents à proximité peuvent s'apparier à leur brin matrice ainsi exposé. (iii) La transcription *de novo* par ARNPII peut être initiée suite à son recrutement sur les extrémités simple-brin sortantes générées par la résection. D'après (Puget *et al.*, 2019)

régulé, dépendant de MRN pour la formation d'un complexe de pré-initiation de transcription (Burger *et al.*, 2019; Pessina *et al.*, 2019; S. Sharma *et al.*, 2021). A ce jour, les modalités d'apparition et de régulation de ce phénomène sont toujours floues.

Un second point de controverse concerne la biogénèse des ARNdb et des hybrides ARN:ADN au site de cassure. Bien que de très nombreuses études s'accordent sur leur présence aux CDBs, l'origine de leur formation reste encore débattue. En accord avec le modèle de (Michelini *et al.*, 2017), un scénario impliquant la transcription séquentielle de chacun des brins au sein d'une extrémité a été proposé. Dans ce cas de figure, la transcription est initiée sur un brin, où elle induit la formation d'un hybride ARN:ADN. Cela constituerait un signal de terminaison de transcription. L'hybride jouerait alors le rôle de promoteur transcriptionnel pour la synthèse d'ARN anti-sens (Burger *et al.*, 2019). Toutefois, ce scénario reste à ce jour très spéculatif. Il n'a pas été formellement démontré que de la transcription sens et anti-sens aient lieu sur chaque extrémité de la cassure. Plusieurs études proposent plutôt que la transcription 5'→3' par l'ARNPII est initiée sur un seul des deux brins. Si un transcrit complémentaire préexistant est à proximité, il pourra alors s'y appairer (Bonath *et al.*, 2018; Vítor *et al.*, 2019).

Concernant la formation des hybrides ARN:ADN au site de cassure, plusieurs études nuancent le fait qu'ils puissent se former majoritairement en réponse à de la transcription *de novo* (Figure 28). Historiquement, c'est chez *S. pombe* que la première étude proposant la formation contrôlée d'hybrides ARN:ADN aux extrémités des CDBs, dépendant du recrutement de l'ARNPII, a été menée (Ohle *et al.*, 2016). Plusieurs autres études ont suivi, confortant l'idée que les dilncRNAs formés aux cassures étaient la source principale d'hybrides ARN:ADN (Bonath *et al.*, 2018; Burger *et al.*, 2019; D'Alessandro *et al.*, 2018; Domingo-Prim *et al.*, 2019). Néanmoins, ces observations sont contrebalancées par une autre série d'études, suggérant que ce phénomène se produirait surtout lorsque les cassures surviennent dans les régions en cours de transcription. La formation d'un hybride y résulterait de l'appariement fortuit du transcrit en cours de production à son brin ADN matrice, conséquence probable de la pause imposée à la machinerie de transcription par la présence de la CDB (Cohen *et al.*, 2018; L. Li *et al.*, 2016; W.-T. Lu *et al.*, 2018). Ces divergences ont conduit à différentes interprétations concernant le rôle que pourrait avoir ces structures dans la réparation des CDBs. Cependant, les divers modèles s'accordent sur un point. Indépendamment de la manière dont ils sont formés, si ces hybrides ARN:ADN contribuent plus ou moins directement à la réparation, ce n'est que temporaire. Leur dégradation apparaît nécessaire à l'accomplissement du processus.

Enfin, les étapes de formation des petits ARNs fait débat. Le modèle initial soutient que

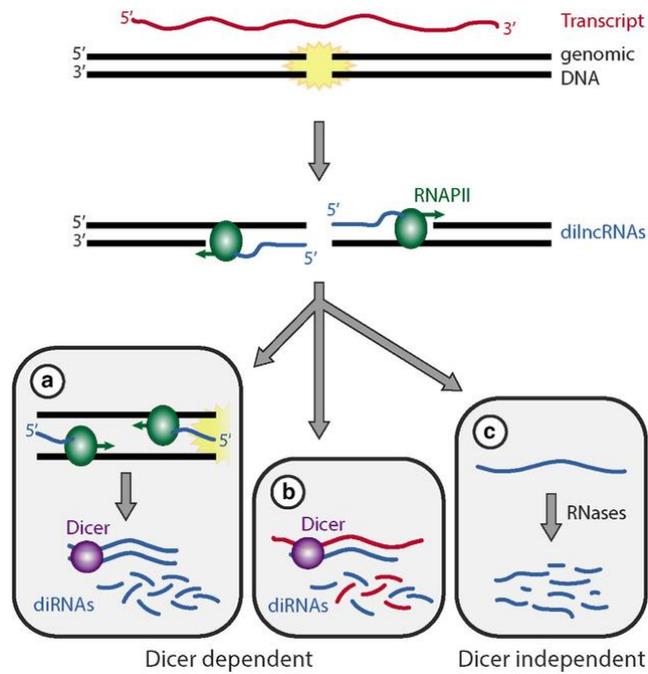


Figure 29. Biogénèse des différents types de DDRNAs. Les diIncRNAs peuvent s'apparier avec un brin synthétisé *de novo* en sens inverse (a), ou un transcrit pré-existant (b). Ils sont clivés par Dicer pour former des petits DDRNAs/diRNAs. Les diIncRNAs peuvent aussi être pris en charge par des RNases (c), créant ainsi une population de petits ARN hétérogènes. D'après (Domingo-Prim *et al.*, 2020).

les dilncRNAs sont clivés par DROSHA et DICER. La fonction canonique de ces deux enzymes est la maturation des micro-ARNs (miARNs). Au cours de ce processus, les ARNs sont clivés séquentiellement (Han *et al.*, 2006; Y. Lee *et al.*, 2002). DROSHA clive dans le noyau de longs ARNs non-codants en structure tige-boucle, formant des pré-miARNs d'environ 70 ribonucléotides. Les pré-miARNs sont exportés dans le cytoplasme où ils subissent une seconde vague de clivage par DICER, formant de petits ARNdb d'environ 21 ribonucléotides. Ces derniers sont alors pris en charge par le complexe RISC (*RNA-induced silencing complex*), contenant Argonaute (AGO). Ce complexe identifie et s'apparie aux ARNs cibles, agissant comme régulateur post-transcriptionnel de leur expression. DROSHA, DICER et AGO auraient aux cassures une fonction indépendante de leur rôle dans la biogénèse des miARNs. Les dilncRNAs servirait de précurseurs à la formation de longs ARNdb, que les deux RNases pourraient cliver pour former les DDRNAs, pris en charge par AGO (Francia *et al.*, 2012; Gao *et al.*, 2014; Q. Wang & Goldstein, 2016; W. Wei *et al.*, 2012). Cependant ce modèle est remis en question notamment car les dilncRNAs n'auraient pas la conformation requise pour être pris en charge par DROSHA (Han *et al.*, 2006). En revanche, il a été proposé que DROSHA avait un rôle dans la formation d'hybride ARN:ADN, formés à partir de transcrits préexistants (W.-T. Lu *et al.*, 2018). De plus, il a été proposé que deux catégories de précurseurs de DDRNAs existent, l'une dépendante du clivage par DICER, l'autre non (Bonath *et al.*, 2018) (Figure 29). Il n'est donc pas exclu que divers moyens existent pour générer les petits DDRNAs, et la contribution de la machinerie de biogénèse des miARNs mérite d'être clarifiée.

2. La composante ARN des mécanismes de réparation des CDBs

Malgré la compréhension encore incomplète des mécanismes de formation des diverses espèces d'ARN non-codants ou d'hybride ARN:ADN autour des CDBs, divers modèles s'accordent sur le fait que leur présence module la réparation des CDBs et influence le choix de la voie de réparation.

2.1. Formation de foyers de facteurs de DDR

La formation d'ARN non-codants stimule le recrutement à la CDB des facteurs de DDR (Figure 26). Il est suggéré qu'ils ne participeraient pas à la détection du dommage *per se*, mais agiraient dans un second temps sur l'amplification du signal et le recrutement des facteurs de réparation (Francia *et al.*, 2012, 2016). Par exemple, il a été montré que les foyers de 53BP1 aux CDBs se formaient dépendamment de la transcription et de la présence d'ARN (Francia *et al.*, 2012; Michelini *et al.*, 2017; Pessina *et al.*, 2019). Aussi, une étude propose que les hybrides ARN:ADN stimulent l'activation d'ATM et la formation de foyers de 53BP1 (Bhatia *et al.*, 2018). 53BP1 a été identifié dans des

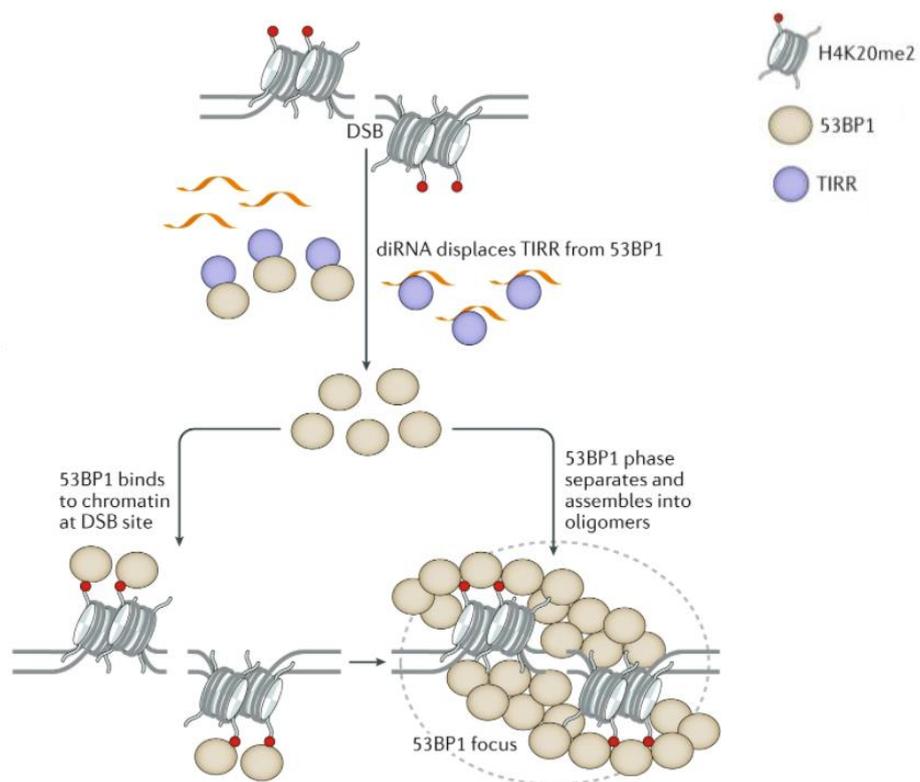


Figure 30. Deux modèles de formation de foyers de 53BP1 médié par les transcrits produits aux CDBs. Les transcrits (diRNA) pourrait dissocier TIRR de 53BP1, rendant ainsi accessible son domaine d'interaction avec les histones méthylées, caractéristiques des CDBs. En parallèle, la capacité de 53BP1 à former des condensats, indépendamment de sa liaison à la chromatine, serait stimulée par la présence des diRNA. Modifiée de (Zong *et al.*, 2020).

analyses protéomiques à grande échelle comme étant une protéine potentiellement capable de fixer l'ARN. Il est possible que les transcrits produits aux CDBs aide à la formation de foyers de 53BP1 en stimulant sa capacité à former des condensats et compartimenter le recrutement subséquent des autres facteurs de réparation (Pessina *et al.*, 2019). Néanmoins, une interaction directe entre 53BP1 et l'ARN n'a jamais été formellement démontrée. De plus, dans quelle mesure une telle interaction modulerait son rôle aux cassures est encore flou. A ce jour, il était plutôt suggéré que 53BP1 soit recruté aux CDBs en réponse aux modifications du paysage épigénétique autour des CDBs. Dans ce contexte, la phosphorylation de 53BP1 par ATM permet le recrutement de RIF1, ce qui induit la dissociation du complexe 53BP1-TIRR. TIRR régule négativement le recrutement de 53BP1 en masquant son domaine Tudor qui lui permet d'interagir avec les histones (Drané *et al.*, 2017; Parnandi *et al.*, 2021). Il s'avère que TIRR a la capacité de fixer l'ARN. Il n'est donc pas exclu que les ARNs produits aux CDBs puissent moduler la dissociation du complexe 53BP1-TIRR, et rendre 53BP1 disponible au recrutement sur le site de dommage ([Figure 30](#)).

Aussi, il a été proposé chez l'homme que RAD51 serait guidé aux CDBs par AGO2. Ce rôle d'AGO2 requiert sa capacité à fixer les ARNs produits au site de cassure, bien que l'interaction entre AGO2 et RAD51 puisse elle se faire en leur absence (Gao *et al.*, 2014; Q. Wang & Goldstein, 2016). Lorsque les DDRNAs sont pris en charge par AGO2, un seul des deux brins est conservé dans le complexe et servira de brin guide. Les complexes ARNs-AGO2-RAD51 pourraient ainsi être recrutés au site de cassure *via* l'appariement du brin d'ARN guide à la séquence ADN homologue, voire sur des transcrits complémentaires. Cette dernière hypothèse est d'ailleurs envisagée dans d'autres études (Michellini *et al.*, 2017; W. Wei *et al.*, 2012). Enfin, les complexes AGO2-ARNs pourraient aussi influencer le recrutement d'enzymes remodelant la chromatine autour des CDBs, ce qui stimulerait le recrutement de RAD51 et BRCA1 aux extrémités (Q. Wang & Goldstein, 2016).

2.2. La réparation associée à la transcription

Les transcrits présents aux CDBs pourraient participer à leur réparation. Leur intervention, plus ou moins directe, est mis en avant dans divers contextes. C'est notamment le cas dans les régions fortement transcrites, lorsque la chromatide sœur n'est pas disponible ou encore lorsque la formation d'hybride ARN:ADN est favorisée. Par exemple, chez les mammifères, lorsque les cellules sont en phase G0/G1, RPA/RAD51/RAD52 sont préférentiellement recrutés aux CDBs lorsqu'elles surviennent dans des régions transcriptionnellement actives (L. Wei *et al.*, 2015).

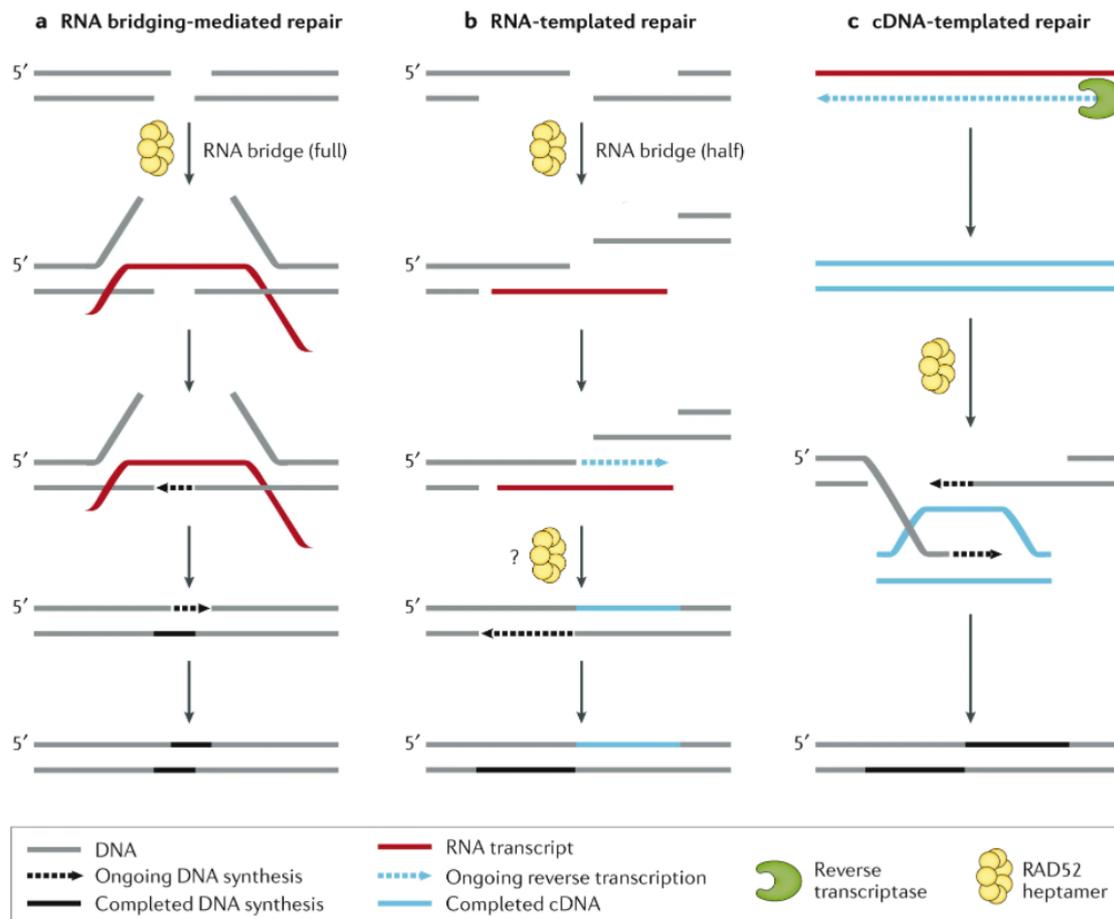


Figure 31. Mécanismes par lesquels l'ARN peut participer à la réparation des CDBs. (A) Rad52 peut aider le transcrit à s'apparier de part et d'autre de la cassure, favorisant sa ligature directe. Si besoin, l'ARN peut servir de matrice pour la restauration de courtes séquences perdues. (B) Si les extrémités sont résectées, Rad52 peut médier l'appariement de l'ARN sur une extrémité sortante. Après la transcription reverse de cet ARN, l'ADN nouvellement synthétisé va envahir la seconde extrémité de la cassure. (C) Enfin, un ADNc provenant de la transcription reverse d'un transcrit homologue peut aussi être utilisé pour aider à la réparation d'une CDB. Ces trois modèles seraient de manière prédominante observés pour la réparation de cassures survenant dans des régions transcrites. D'après (Zong *et al.*, 2020).

Trois modèles d'action se dessinent dans la littérature, reposant sur l'action directe de la molécule d'ARN, ou bien une action indirecte, *via* sa conversion en ADN complémentaire (ADNc) (Figure 31).

Premièrement, plusieurs études proposent qu'à l'apparition d'une CDB dans une région transcrite, l'ARN en cours de synthèse en *cis*, ou sur l'allèle homologue *i.e.* en *trans*, peut s'apparier à ses régions homologues de part et d'autre de la cassure (A. Chakraborty *et al.*, 2016; Keskin *et al.*, 2014; Mazina *et al.*, 2017; McDevitt *et al.*, 2018) (Figure 31, panel A). Il n'est pas exclu qu'un ARN formé à partir d'une autre séquence puisse être utilisé, sous couvert qu'il présente des régions de micro-homologies aux extrémités de la CDB. Ainsi, l'ARN forme un pont protecteur, assurant le maintien des deux extrémités proches l'une de l'autre, favorisant leur ligature. Ce phénomène, observé par des études *in vitro* et *in vivo* chez *S. cerevisiae* et chez l'homme, est catalysé par Rad52 (Keskin *et al.*, 2014; Mazina *et al.*, 2017; McDevitt *et al.*, 2018). Si aucune perte d'information génétique n'est observée aux extrémités, elles sont ligaturées directement. Si ce n'est pas le cas, l'ARN peut être utilisé comme matrice par des ADN polymérase spécialisées pour restaurer la séquence manquante. Il a été proposé par (A. Chakraborty *et al.*, 2016) qu'un tel mécanisme profite à la machinerie du NHEJ pour réaliser une réparation sans erreur. Dans ce premier modèle, les extrémités des CDBs sont franches, ou très peu altérées.

Une variante de ce modèle est que l'hybridation du transcrit médiée par Rad52 ne se fasse qu'à une extrémité, suite à la résection de la CDB (Figure 31, panel B). L'ARN sert ici de matrice à une plus longue synthèse d'ADN, ce qui permet d'allonger l'extrémité 3' sortante de sorte à créer une séquence homologue à l'autre extrémité de la cassure. La dégradation du brin ARN permet la capture de la seconde extrémité et la réparation par SSA (Keskin *et al.*, 2014; McDevitt *et al.*, 2018).

Un dernier modèle repose sur l'utilisation d'ADNc plutôt que celle du transcrit en lui-même (Figure 31, panel C). Il est proposé que ce modèle soit prévalent sur ceux utilisant la molécule ARN directement dans les conditions où les hybrides ARN:ADN peuvent être activement défaites (Keskin & Storici, 2015). Dans ce cadre, les CDBs peuvent être réparées par la RH/SSA *via* l'insertion d'ADNc en provenance de séquences distantes, contenant des régions de micro-homologies. Ces séquences peuvent être des séquences géniques, des rétrotransposons ou encore des séquences télomériques (Moore & Haber, 1996; Ono *et al.*, 2015; Onozawa *et al.*, 2014). Il est proposé que ce moyen de réparation ait pu contribuer à la présence de pseudogènes et autres séquences répétées dispersées au sein des génomes mammifères (Moore & Haber, 1996).

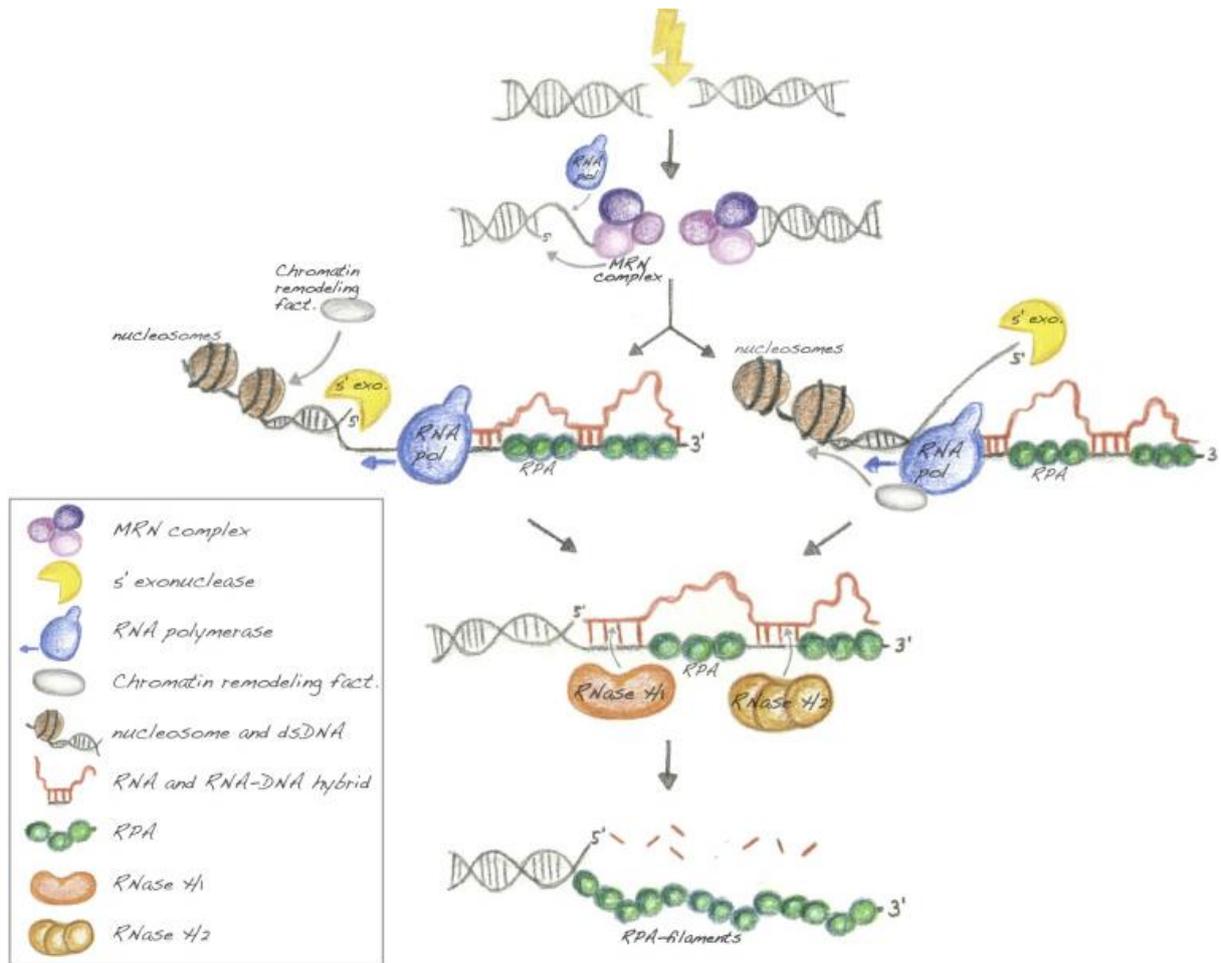


Figure 32. Modèle de réparation par recombinaison homologue d'une CDB, dépendant de la formation transitoire d'hybrides ARN:ADN, chez *S. pombe*. Suite à l'apparition d'une CDB, MRN promeut la résection des extrémités de la cassure. L'ARNPII est alors recrutée sur les extrémités 3' sortantes, où elle se met à transcrire. La polymérase peut suivre passivement la machinerie de résection (partie gauche) ou bien participer activement au processus d'ouverture de la chromatine favorisant ainsi l'accès aux nucléases (partie droite). L'ARN en cours de synthèse est prône à s'apparier à son brin d'ADN matrice formant un hybride ARN:ADN. La présence des hybrides ARN:ADN est un frein au recrutement de RPA : ils doivent être dégradés, notamment *via* l'action des RNase H, pour finaliser le processus de réparation par la recombinaison homologue. D'après (Ohle *et al.*, 2016).

La réparation associée à la transcription est donc généralement basée sur la possibilité de former des hybrides ARN:ADN. Ces structures ont néanmoins été beaucoup étudiées pour leur rôle perturbateur de la réparation des CDBs. De plus, certains facteurs de réparation, dont Rad52, seraient impliqués dans le recrutement de facteurs de résolution des hybrides ARN:ADN (D'Alessandro *et al.*, 2018; Yasuhara *et al.*, 2018). Ces données, à première vue plutôt contradictoires, pourraient néanmoins laisser supposer que l'origine, la nature et la position des ARNs et hybrides ARN:ADN présents autour des sites de CDBs puissent déterminer l'impact positif ou négatif qu'ils auront sur la réparation.

3. Focus sur les hybrides ARN:ADN : des intermédiaires de réparation ?

3.1. Hybrides ARN:ADN et recombinaison

C'est en 2016 que l'équipe de Tamás Fischer propose pour la première fois que la formation d'hybrides ARN:ADN aux CDBs constituerait une étape à part entière de leur réparation par la RH, chez *S. pombe* (Ohle *et al.*, 2016). La formation d'extrémités 3' sortantes, générées par MRN-Ctp1, serait un substrat de choix pour le recrutement de l'ARNPII. L'équipe propose alors deux modèles (Figure 32). Le premier est que l'ARNPII pourrait transcrire tout en suivant passivement l'avancée de la machinerie de résection extensive. Autrement, l'interaction de l'ARNPII avec de nombreux facteurs de remodelage de la chromatine permettrait d'ouvrir la voie aux exonucléases en créant un environnement propice à leur avancée (Adkins *et al.*, 2013). Dans ce second cas de figure, la transcription par l'ARNPII aurait un impact significatif sur la régulation de l'étape de résection extensive. Dans tous les cas, l'absence du brin d'ADN complémentaire, dégradé par les nucléases, favorise l'appariement du transcrit à son brin d'ADN matrice. La formation d'hybrides ARN:ADN sur les extrémités 3' sortantes permettrait de les stabiliser, et, peut-être, de réguler l'étape de résection. Néanmoins, leur présence concurrence le recrutement de RPA et donc la complétion de la réparation. Il est donc proposé que le bénéfice de leur formation ne soit que transitoire, et que leur dégradation est nécessaire *in fine*.

Un lien étroit entre les hybrides ARN:ADN et les facteurs de réparation a aussi été observé chez les mammifères, chez qui il a été étudié et proposé le mécanisme de 'Transcription-Associated Homologous Recombination Repair' (TA-HRR) (Yasuhara *et al.*, 2018). A la différence du modèle précédent, le TA-HRR n'est pas basé exclusivement sur le recrutement *de novo* de l'ARNPII à la cassure, mais plutôt sur l'induction d'une CDB dans une région à proximité d'une ARNPII en cours de transcription. Ce modèle propose que les hybrides ARN:ADN formés par l'induction d'une CDB sont requis pour le recrutement de Rad52 et BRCA1. De ce fait, leur présence a un rôle stimulant pour

l'éviction de 53BP1-RIF1, qui limitent la résection extensive. Plusieurs autres modèles de formation d'hybride ARN:ADN sont proposés chez les mammifères ([Figure 28](#)), comme évoqué précédemment dans ce chapitre. Dans ces modèles l'ARN en cours de transcription s'apparie à son brin d'ADN matrice, exposé suite à la résection de la cassure. Il est proposé que les hybrides puissent être formés, ou stabilisés, *via* l'initiation de la résection des extrémités (Puget *et al.*, 2019). Le mode de formation des hybrides ARN:ADN et de leur rôle potentiellement régulateur de la résection sont des sujets encore débattus. Néanmoins, les études chez les mammifères s'accordent à celle d'(Ohle *et al.*, 2016) sur le fait que la dégradation des hybrides ARN:ADN est une étape clé pour l'accomplissement de la réparation par la RH (Cohen *et al.*, 2018; D'Alessandro *et al.*, 2018).

3.2. La dégradation des hybrides ARN:ADN

Tandis que certains les voient comme des intermédiaires de recombinaison, d'autres proposent que leur présence relève plutôt d'un appariement fortuit. Quoi qu'il en soit, tous les modèles s'accordent pour dire que la dégradation des hybrides ARN:ADN est nécessaire pour la réparation des CDBs. Chez les eucaryotes, deux méthodes permettent leur résolution : les deux brins peuvent être désolidarisés par des hélicases, ou bien, le brin ARN peut être activement dégradé par des enzymes spécialisées, les ribonucléase H ou RNase H.

3.2.1. Les hélicases

La liste des hélicases potentiellement impliquées dans la résolution des R-loops s'allonge d'année en année. La plus étudiée est probablement Senataxin (SETX chez les mammifères, Sen1 chez les levures) (Cohen *et al.*, 2018; H. D. Kim *et al.*, 1999; Mischo *et al.*, 2011; Skourti-Stathaki *et al.*, 2011). Senataxin est recruté aux CDBs apparaissant dans des régions en cours de transcription, régions prônes à la formation d'hybrides ARN:ADN. SETX y dissocierait directement les hybrides, et participerait au recrutement d'exoribonucléases, de l'exosome ou Xrn2, impliquées dans la dégradation du brin ARN (Richard *et al.*, 2013; Skourti-Stathaki *et al.*, 2011). Sa présence promeut le recrutement de Rad51 et minimise les évènements de ligature aberrants (Cohen *et al.*, 2018).

On pourra également citer l'hélicase ADN Pif1, Pfh1 chez *S. pombe* (Boulé & Zakian, 2007; Mohammad *et al.*, 2018; Pohl & Zakian, 2019; Tran *et al.*, 2017), présentée précédemment pour son rôle dans le BIR. Des études sur l'activité *in vitro* des protéines purifiées de *S. cerevisiae* et *S. pombe* montrent une préférence pour des substrats ARN:ADN (Boulé & Zakian, 2007; Mohammad *et al.*, 2018). Il est ainsi proposé que dans certains cas, Pif1 puisse soutenir l'action des RNase H dans le retrait des hybrides ARN:ADN aux régions fortement transcrites par les ARNPII et ARNPIII, et comme pour

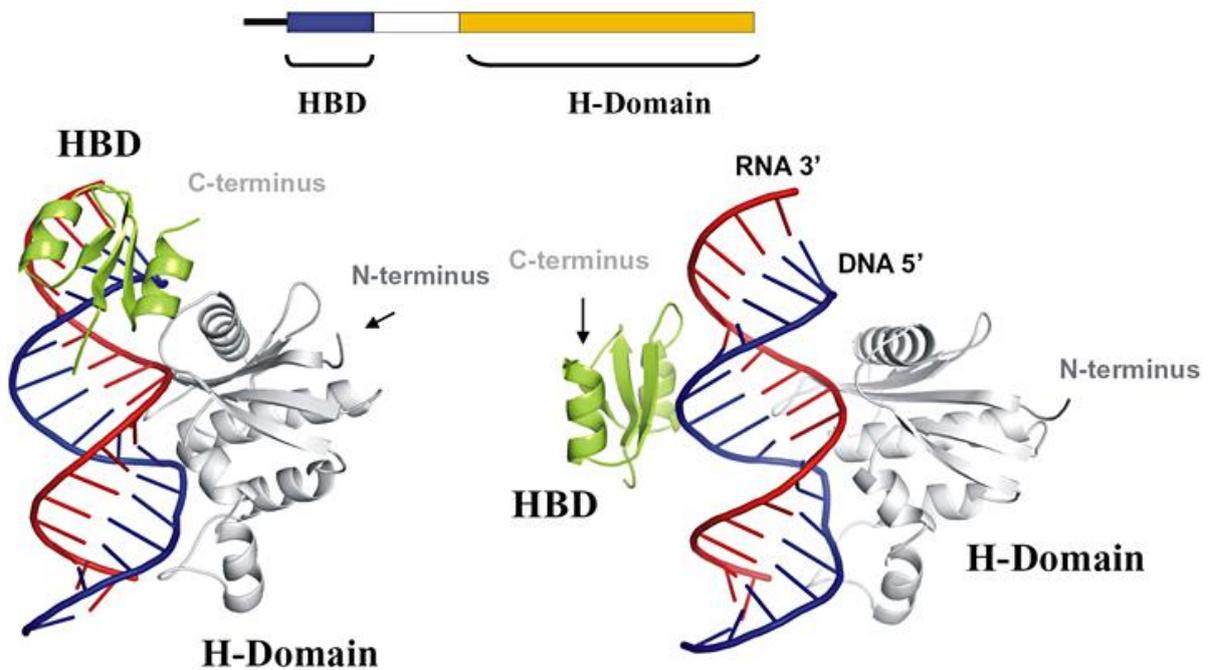
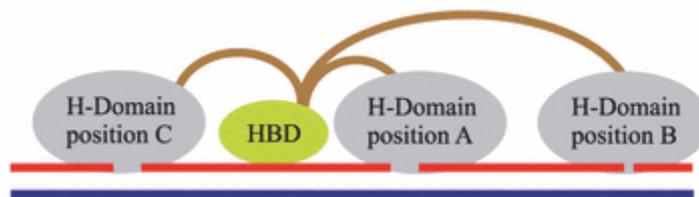
A**B**

Figure 33. L'interaction entre les domaines HBD et H de la RNase H1 est modulée par un domaine de connexion flexible. (A) Organisation et structure de RNase H1 en complexe avec un hybride ARN:ADN. Schéma de l'organisation de la RNase H1 chez l'homme, et en dessous, deux modèles de structure de RNase H1 en complexe avec un hybride ARN:ADN. Les domaines de liaison aux hybrides (HBD) et catalytique (H-domain) sont connectés par une région flexible, ce qui leur permet d'être plus ou moins distants l'un de l'autre. La position des parties C- et N- terminale de HBD et du H-domain, respectivement, est indiquée. (B) Modèle de processivité. Lors d'un événement de liaison à un hybride ARN:ADN par le domaine HBD, le domaine H peut cliver plusieurs fois. En position A et B, le clivage va être plus ou moins distant ; pour cliver en position C, la flexibilité du domaine de connexion est nécessaire pour changer l'orientation des domaines HBD et H. Modifiée d'après (Cerritelli & Crouch, 2009).

Senataxin, reposer sur les exoribonucléases de l'exosome pour la dégradation du brin ARN (Pohl & Zakian, 2019). D'autres hélicases allongent la liste, comme Aquarius (Sollier *et al.*, 2014), DHX9 (P. Chakraborty & Grosse, 2011; Cristini *et al.*, 2018), FANCM (Schwab *et al.*, 2015) ou encore des hélicases ARN DEAD-box telles que DDX5, DDX19 ou UAP56/DDX39B (Hodroj *et al.*, 2017; Pérez-Calero *et al.*, 2020; Sessa *et al.*, 2021). Cependant, il est à noter que la plupart de ces hélicases ont été identifiées suite au fait que leur déplétion induit une accumulation d'hybrides ARN:ADN. Aussi, pour certaines, l'activité sur un substrat hybride ARN:ADN a été montré *in vitro* mais pas *in vivo*. Il est donc possible d'imaginer que ces protéines puissent avoir une fonction indépendante de leur activité hélicase pour la prévention/le retrait des hybrides ARN:ADN.

3.2.2. Les RNase H

3.2.2.1. RNase H1

La RNase H1 est une enzyme monomérique. On y trouve en position N-terminale un domaine de liaison aux acides nucléiques (domaine HBD) (Cerritelli & Crouch, 2009). Il permet à la RNase H1 de reconnaître, sans préférence de séquence, des hybrides ARN:ADN, mais aussi des ARNdb, bien qu'avec une affinité beaucoup plus faible. La liaison au substrat faite *via* le domaine HBD stimule l'activité du domaine catalytique RNase H, porté en région C-terminale (Figure 33). Les parties N- et C-terminales de la protéine RNase H1 sont conservées chez tous les eucaryotes. En revanche, la région les séparant connaît des variations et spécificités dépendamment des différents organismes. De plus, chez certains eucaryotes comme les mammifères, on note la présence d'une extension N-terminale par un domaine de ciblage aux mitochondries (Mitochondrial Targeting Sequence, MTS). La délétion de RNase H1 chez les souris induit un arrêt du développement au stade E8.5 dû à un échec d'amplification de l'ADN mitochondrial (ADNmt) (Cerritelli *et al.*, 2003). Le rôle essentiel de RNase H1 pour la réplication de l'ADNmt chez les mammifères sera développé dans le prochain chapitre de cette introduction.

La RNase H1 a été relativement étudiée dans ce contexte mitochondrial, et un rôle précis pour l'isoforme nucléaire n'a pas encore été bien défini. RNase H1 semblait pourtant être un candidat idéal pour la résolution de tous les types d'hybride ARN:ADN, formés spontanément ou suite à un stress. Cependant, il semblerait que le spectre de substrats nucléaires de RNase H1 s'avère plus réduits que ce qui avait été initialement imaginé (Cerritelli & Crouch, 2009). Premièrement, il a été proposé que RNase H1 puisse être impliqué dans la dégradation des amorces ARN des fragments d'Okazaki. Cependant, RNase H1 requiert un substrat d'au moins quatre ribonucléotides consécutifs pour pouvoir cliver efficacement (Figure 34). Elle ne pourrait donc pas assurer la dégradation entière de ces amorces. Chez l'homme,

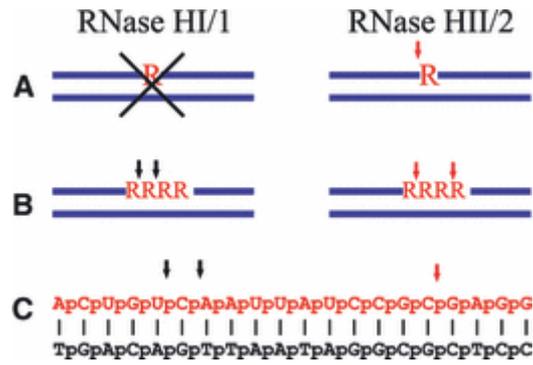


Figure 34. Préférence de substrat et mode de clivage des enzymes RNase H1 et RNase H2. (A) Les ribonucléotides isolés dans un duplex ADN sont reconnus uniquement par RNase H2. (B) et (C) Quatre ribonucléotides successifs sont le minimum nécessaire pour le clivage par RNase H1. Les deux enzymes ont des profils de clivages différents : les flèches noires et rouges indiquent les sites de clivage de RNase H1 et RNase H2, respectivement. D'après (Cerritelli & Crouch, 2009).

RNase H1 couvre 11pb d'un hybride ARN:ADN, ce qui pourrait être limitant pour la reconnaissance d'amorce ayant une taille inférieure (Cerritelli & Crouch, 2009). D'ailleurs, RNase H1 n'est pas représenté dans les modèles actuels de maturation des fragments d'Okazaki (voir chapitre suivant). De plus, il a été proposé que bien que RNase H1 puisse reconnaître et se fixer aux hybrides formés sur tout le génome, son activité catalytique n'en était pas pour autant engagée. Il semblerait que RNase H1 ne dégrade que certains types d'hybrides, mais les modalités de ce choix sont encore floues (Zimmer & Koshland, 2016). Soutenant ces observations, il a été proposé que chez *S. cerevisiae*, RNase H1 agirait en réponse à la formation d'hybrides ARN:ADN suite à un stress (Lockhart *et al.*, 2019). Etant exprimé constamment tout au long du cycle cellulaire, il est possible que l'activité de RNase H1 soit régulée par des modifications post-traductionnelles ou par un inhibiteur non-identifié à ce jour (Arudchandran *et al.*, 2000; Zimmer & Koshland, 2016).

La RNase H1 est souvent utilisée comme outil pour étudier la présence des hybrides ARN:ADN à large échelle sur le génome. L'essentiel des techniques de détection des hybrides repose sur deux outils : l'utilisation de RNase H1 ou celle de l'anticorps S9.6 (Chédin *et al.*, 2021; Crossley *et al.*, 2019). L'utilisation de l'anticorps S9.6 a certaines limites. Tout d'abord, il reconnaît également les ARNdb, ce qui pose un véritable problème de spécificité, notamment pour les études chez des organismes comme les levures qui en produisent intrinsèquement une grande quantité (Hartono *et al.*, 2018). Aussi, l'affinité du S9.6 pour les hybrides varie en fonction de leur séquence (König *et al.*, 2017). Enfin, ayant un épitope couvrant 6pb, il peut ne pas permettre la détection de petits hybrides ARN:ADN (Phillips *et al.*, 2013). Des approches alternatives ont donc été développées sur la base de l'utilisation de RNase H1. Cela donne notamment l'opportunité de détecter des hybrides de manière plus sensible car on les détecte dans leur contexte natif, ce qui limite la possibilité de dissolution ou remodelage que l'on pourrait observer dans les protocoles d'extraction et immunoprécipitation avec le S9.6. Deux méthodes ont été principalement développées. La première est nommée R-ChIP (L. Chen *et al.*, 2017). Elle repose sur l'utilisation d'une forme inactive de RNase H1, exprimée de manière stable dans les cellules, qui reconnaît les hybrides mais ne peut pas les dégrader. Cette protéine peut être immunoprécipitée suite à la fixation de ses interactions avec la chromatine. Il faut toutefois garder en tête que l'expression stable de cette forme mutée de RNase H1 peut en soit altérer la dynamique de présence des hybrides ARN:ADN et induire un biais d'analyse. Aussi, parfois seulement le domaine HBD de RNase H1 a été utilisé, fusionné à un marqueur comme la GFP (Bhatia *et al.*, 2014).

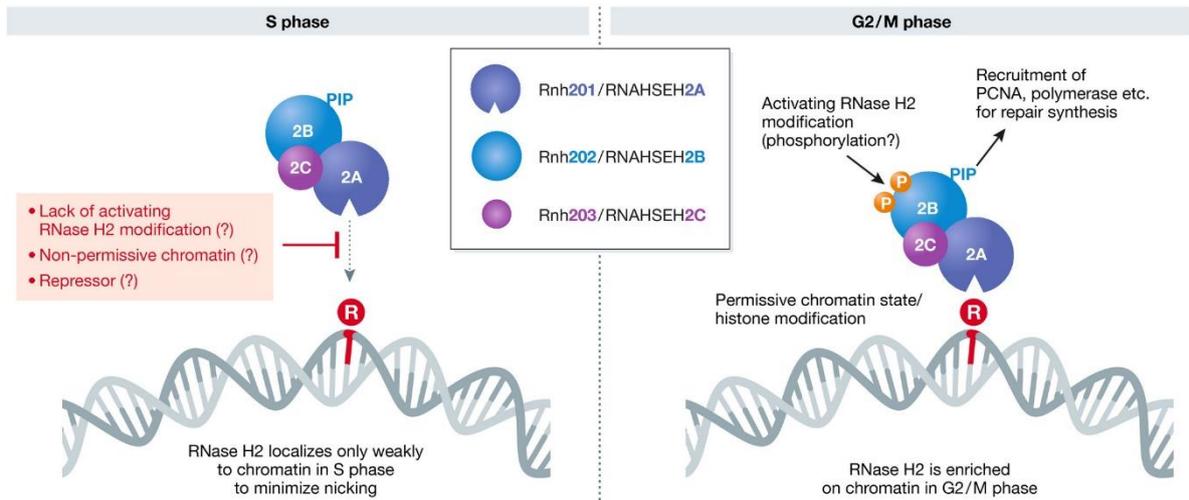


Figure 35. L'activité de RNase H2 est contrôlée durant le cycle cellulaire. L'association de RNase H2 à la chromatine augmente tout au long de la phase S. Néanmoins, il est supposé que son activité soit régulée, de sorte à ne pas interférer avec le processus de réplication en cours, notamment à cause des risques d'induire des cassures de l'ADN. Différents modes de régulation sont proposés en rouge. En phase G2/M, on observe un pic d'activité de RNase H2, qui résout les longs hybrides ARN:ADN et les ribonucléotides isolés, comme présenté ici. D'après (Kellner & Luke, 2020).

3.2.2.2. RNase H2

La RNase H2 est un complexe de trois sous-unités : RNASEH2A/Rnh201, RNASEH2B/Rnh202, et RNASEH2C/Rnh203, respectivement chez l'homme/*S. cerevisiae* et *S. pombe* (Crow *et al.*, 2006; Jeong *et al.*, 2004). La sous-unité A/201 qui porte l'activité catalytique de l'enzyme est très bien conservée. En revanche, les deux autres sous-unités ont sûrement évolué indépendamment car elles ne présentent que très peu d'homologie chez les différents eucaryotes. Le rôle de ces deux sous-unités, qualifiées de sous-unités accessoires ou auxiliaires, est encore mal défini. Elles forment des dimères solubles et stables, qui pourraient servir de plateforme au recrutement de la sous-unité catalytique et la rendre plus processive (Chon *et al.*, 2009; Rohman *et al.*, 2008). Elles pourraient aussi permettre au complexe d'interagir avec d'autres protéines. Par exemple, la sous-unité B/202 contient un motif d'interaction avec PCNA (motif PIP-box), qui est d'ailleurs une des rares régions de cette sous-unité à être très bien conservée chez les eucaryotes (Chon *et al.*, 2009). Cette interaction pourrait guider l'action de RNase H2 dans les processus de réplication et réparation de l'ADN. Il est à noter qu'à ce jour, la capacité de RNase H2 à interagir avec PCNA ne semble pas influencer son niveau d'activité ou sa processivité (Chon *et al.*, 2009).

A la différence de RNase H1, l'expression de la sous-unité catalytique de RNase H2 est modulée par la progression dans le cycle cellulaire. Deux études chez *S. cerevisiae* observent des pics d'expression en phase S et en phase G2/M (Arudchandran *et al.*, 2000; Lockhart *et al.*, 2019). Ces pics d'expression, qui coïncident avec des pics d'association à la chromatine, reflèteraient les différentes fonctions de RNase H2. Le mécanisme de clivage de RNase H2 est particulier puisqu'il lui permet de reconnaître et cliver un ribonucléotide incorporé dans un duplex d'ADN. RNase H2 est donc associée à la fois à l'enlèvement de ribonucléotides isolés, et à la dégradation de plus longs hybrides ARN:ADN, qu'elle clive d'ailleurs différemment de RNase H1 (Cerritelli & Crouch, 2009) (Figure 34). Il est proposé que l'action de RNase H2 sur les longs hybrides survient efficacement en fin de phase S, après le pic de réplication. La fonction de retrait des ribonucléotides isolés, provenant d'erreurs des polymérase répliquatives, se ferait essentiellement en phase G2. Ces erreurs seraient corrigées de manière post-répliquative de sorte à ne pas interférer avec le processus de réplication en cours (Kellner & Luke, 2020; Lockhart *et al.*, 2019) (Figure 35). Chez les mammifères, cette fonction de RNase H2 est d'ailleurs essentielle pour assurer le développement embryonnaire (Reijns *et al.*, 2012).

La découverte de la structure hétérotrimérique de RNase H2 chez l'homme est associée à des recherches sur le syndrome d'Aicardi-Goutières (AGS) (Crow *et al.*, 2006). Plus de la moitié des familles touchées étudiées présentent des mutations dans au moins une

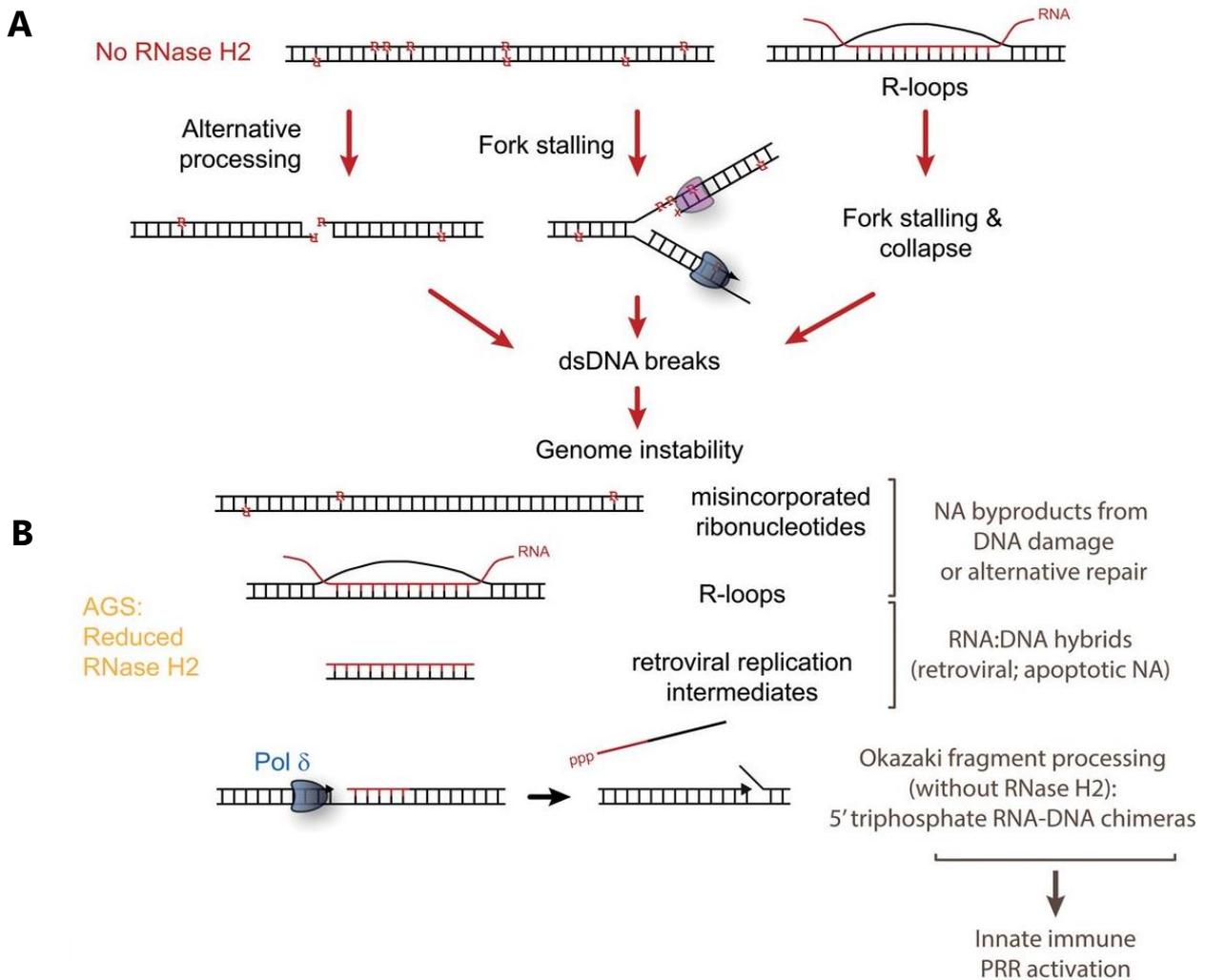


Figure 36. Conséquences pathologiques de la dérégulation des activités de RNase H2. (A) Les cellules déficientes pour RNase H2 sont caractérisées par une instabilité génomique accrue. Il reste à définir dans quelle mesure la stabilisation de chacun de ses substrats y contribue. La stabilisation des hybrides ARN:ADN, indépendamment de leur taille, peut entraîner la formation de cassures de l'ADN. (B) Les mutations dans RNase H2 associées au syndrome d'Aicardi-Goutières (AGS) induisent souvent une baisse de l'activité de la protéine, mais on ne sait pas en quelle mesure cela induit une auto-inflammation. L'accumulation d'acides nucléiques cytoplasmiques dans ce contexte pourrait résulter de l'action de mécanismes de réparation alternatifs, activés pour limiter la stabilisation des substrats de RNase H2. Aussi, la présence d'intermédiaires de réplication rétrovirale ou encore la libération d'acides nucléiques par les cellules apoptotiques, deux phénomènes résultant de la déficience en RNase H2, pourraient contribuer à la dérégulation de la réponse immunitaire. Modifiée de (Reijns & Jackson, 2014).

sous-unité du complexe (Crow *et al.*, 2015). AGS est une maladie génétique héréditaire, transmise sur le mode récessif autosomique, caractérisée par une surexpression d'interféron de type I. En d'autres termes, les malades présentent une réponse immunitaire innée dérégulée, créant une inflammation chronique se traduisant par l'attaque des cellules cérébrales par le système immunitaire. Cette réaction inflammatoire résulterait d'une accumulation d'acides nucléiques endogènes cytoplasmiques, dont la détection par la molécule cGAS déclenche l'activation des interférons de type I. Normalement, cGAS réagit à la présence d'ADN ou d'ARN d'origine virale. Néanmoins la production de fragments nucléiques cytoplasmiques lors de la réparation et la réplication de l'ADN, ou encore lors de la suppression de rétro-éléments endogènes, s'ils ne sont pas correctement pris en charge, sont des sources potentielles d'activation des interférons de type I (Klein & Günther, 2021).

Comment des mutations dans RNase H2 induisent l'apparition de tels phénotypes est encore sujet à étude (Reijns & Jackson, 2014) ([Figure 36, panel B](#)). La plupart des mutations observées dans les patients AGS cause une baisse et non une abolition totale de l'activité de RNase H2. Chez certains mutants, aucune baisse de l'activité n'est d'ailleurs à déplorer, ce qui semble indiquer un rôle de RNase H2 indépendant de son activité catalytique. La majorité des mutations associées au complexe RNase H2 se trouve d'ailleurs dans la sous-unité RNASEH2B et non dans la sous-unité catalytique (Crow *et al.*, 2015; Rohman *et al.*, 2008). Afin d'étudier l'effet des différentes mutations et de mieux comprendre le développement de l'AGS, certaines mutations touchant des acides aminés conservés ont pu être créées chez *S. cerevisiae* (Chon *et al.*, 2013; Potenski *et al.*, 2019; Rohman *et al.*, 2008). Aussi il existe un mutant de séparation de fonction, le mutant RED (*Ribonucleotide Excision-Defective mutant*). Ce mutant, déficient pour le retrait des ribonucléotides isolés mais apte à la dégradation de plus longs substrats, est aussi étudié dans le but de mieux comprendre quelle(s) fonction(s) de RNase H2 pourrait participer à la prévention contre l'accumulation d'acides nucléiques cytoplasmiques (Cerritelli & Crouch, 2019; Chon *et al.*, 2013).

RNase H2 est considéré comme un gardien de la stabilité du génome de par ses fonctions connues dans la dégradation des hybrides ARN:ADN, le retrait des ribonucléotides isolés, et surtout, de par les conséquences pathologiques associées à la dérégulation de ces activités ([Figure 36](#)). De manière plutôt inattendue, il s'avère que RNASEH2A et RNASEH2B sont surexprimés dans certains types de cancer (S. Feng & Cao, 2016). Les résultats de ces différentes études suggèrent que les deux sous-unités pourraient être considérées comme de nouvelles cibles pour le diagnostic et la thérapie de ces cancers. Le mécanisme moléculaire par lequel RNASEH2A et RNASEH2B seraient impliquées dans le développement tumoral est encore inconnu. De plus, à ce jour, aucun rôle du complexe entier n'a été relié aux cancers, et il se pourrait que ces

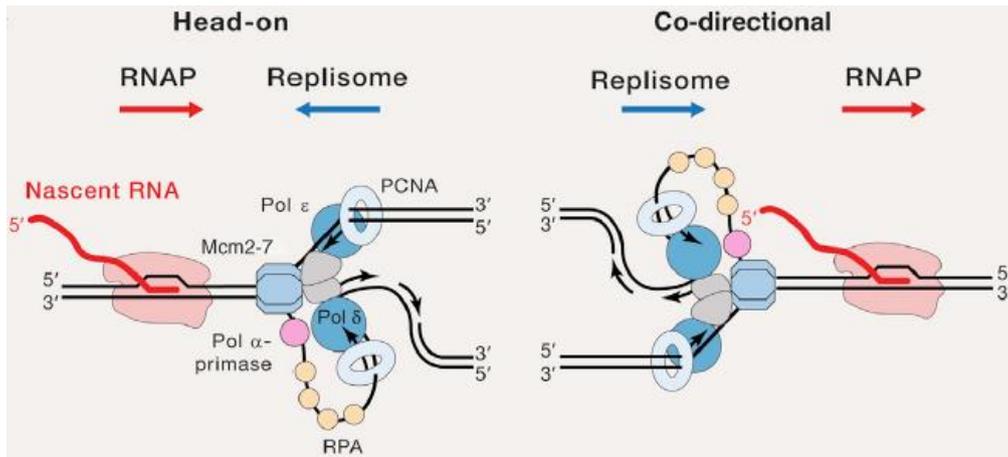


Figure 37. Les collisions des machineries de transcription et réplication. Modèle de convergence du réplisome et l'ARNP entraînant des collisions frontale (partie gauche) ou h (partie droite). Les collisions frontales peuvent arriver lorsque le gène en cours de transcription est sur le brin retard, tandis que les collisions codirectionnelles arriveront lorsqu'il se situe sur le brin précoce. D'après (Hamperl & Cimprich, 2016).

fonctions des sous-unités seules soient divergentes de celles arborées par le complexe RNase H2.

V. Réplication et hybrides ARN:ADN

1. Transcription et R-loop: un obstacle à l'avancée des fourches de réplication

Les relations entre la présence d'hybrides ARN:ADN et le stress réplicatif ont principalement été étudié dans le contexte de la formation non-régulée de R-loops. Les R-loops sont des structures à trois brins formées de manière co-transcriptionnelle. Elles résultent de l'appariement d'un transcrit en cours de synthèse à son brin d'ADN matrice, formant un hybride ARN:ADN. Le brin d'ADN non complémentaire déplacé est en conséquent maintenu sous forme d'ADN simple-brin. La formation des R-loops, lorsqu'elle survient de manière incontrôlée, menace la complétion des processus de transcription et de réplication. Ces structures sont considérées comme de potentielles menaces pour le maintien de l'intégrité du génome (García-Muse & Aguilera, 2019).

1.1. Les collisions transcription-réplication

Les collisions entre les machineries de réplication et transcription (TRCs, *transcription-replication collisions or conflicts*) sont considérées comme la cause principale de l'instabilité génomique associée à la présence des R-loops en phase S. Il est à noter qu'à ce jour, il est toujours incertain dans quelles mesures la présence d'une R-loop *per se*, que ce soit la partie hybride ARN:ADN ou ADNsb, ou bien le blocage de l'ARNPII et/ou la machinerie transcriptionnelle, contribuent chacun à perturber l'avancée des réplisomes. La fréquence et les modalités d'apparition des TRCs en conditions physiologiques ne sont pas encore bien connues. Cela s'explique notamment car leur étude se fait majoritairement dans des conditions stimulant leur apparition, c'est-à-dire lorsque l'une ou l'autre des machineries est altérée (utilisation de mutants spécifiques ou d'inhibiteurs chimiques...), ou bien en l'absence de facteurs régulateurs de la formation de R-loops (García-Muse & Aguilera, 2019; Kemiha *et al.*, 2021). Dans ces contextes pathologiques, la perte de contrôle de la coordination entre les processus de transcription et réplication induit les TRCs et se caractérise par une prédisposition à la formation de lésions génomiques et un stress réplicatif accru.

Il a été récemment montré que l'orientation des machineries de transcription et de réplication au moment de leur rencontre influençait la gravité des conséquences de la collision. Les collisions peuvent être de type codirectionnel si les deux machineries

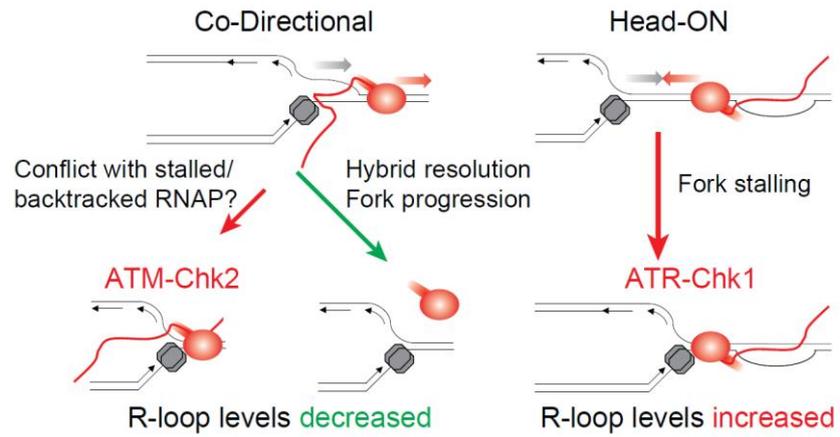


Figure 38. L'orientation des conflits transcription-réplication module l'homéostasie des R-loops et l'activation des voies de DDR. Les collisions codirectionnelles induisent l'activation d'ATM, et sont prônes à la résolution des R-loops (partie gauche). Au contraire, les collisions frontales induisent l'activation de d'ATR et favorise la formation de R-loops. D'après (Hamperl *et al.*, 2017).

progressent dans la même orientation, ou bien de type frontal si elles sont convergentes ([Figure 37](#)). Chez *S. cerevisiae* et chez l'homme, il a été montré que ce sont les collisions frontales, et non codirectionnelles, qui induisent de l'instabilité génomique, bien que des R-loops puissent se former dans les deux cas (M. García-Rubio *et al.*, 2018; Hamperl *et al.*, 2017; Prado & Aguilera, 2005). Parmi les interrogations soulevées par ces observations, on pourra retenir les suivantes : si une R-loop est présente au site de TRC, peut-elle être traversée ou retirée par le réplisome ? Quels sont les facteurs moléculaires impliqués ? Comment l'orientation du conflit affecte la stabilité de cette R-loop ? Bien qu'il soit encore compliqué de répondre précisément à ces différentes questions, quelques éléments de réponse se dessinent. Il est proposé que les R-loops se trouvent plutôt dans les TRCs de type frontale (Hamperl *et al.*, 2017). Les R-loops présentes aux TRCs de type codirectionnelles seront plutôt détectées dans les cas où elles seraient stabilisées, notamment par la fixation, sur leur domaine hybride ARN:ADN, de facteur comme Yra1, le domaine HBD ou la forme dysfonctionnelle de RNase H1 (Bhatia *et al.*, 2014; M. García-Rubio *et al.*, 2018). Dans ce cadre, indépendamment de l'orientation du conflit, la résolution de la R-loop et du conflit est compromise.

Les deux éléments majeurs qui vont conditionner la réponse cellulaire aux TRCs sont la formation d'une R-loop et l'orientation du conflit. Les TRCs où une R-loop est détectée déclencheront l'activation de mécanismes de DDR ([Figure 38](#)) (Hamperl *et al.*, 2017). Dans le cas d'une collision frontale, la voie ATR est activée. Il n'est pas clair à ce jour dans quel mesure la formation d'ADNsb induisant cette activation provient de la fourche bloquée ou du filament d'ADNsb de la R-loop. Les collisions codirectionnelles se traduiront quant à elles par l'activation d'ATM. Dans ce contexte, les risques de formation et/ou de stabilisation d'une R-loop sont plus faibles.

1.1.1. La résolution des conflits par contournement ou éviction de l'ARNPII

Différents modèles de résolution de conflits ont été proposés. Premièrement, le réplisome peut passer outre la R-loop et se reformer après son site de blocage. Cette action est médiée chez l'homme par le complexe Pol α -primase si le blocage est sur le brin retard, et par la primase-polymérase trans-lésionnelle PRIMPOL s'il se trouve sur le brin précoce. PRIMPOL est un facteur de réponse au stress qui n'est recruté à la fourche qu'en cas de confrontation à un obstacle, en particulier de type structures secondaires d'ADN et R-loops (Šviković *et al.*, 2019). Il est à noter que PRIMPOL n'est pas conservée chez les levures.

Dans le cas d'un conflit codirectionnel, le transcrit pourrait d'ailleurs être utilisé comme amorce pour ré-initier rapidement la réplication suite au déplacement de l'ARN polymérase par les hélicases répliquatives. L'hybride ARN:ADN servirait de plateforme

au ré-assemblage rapide du réplisome, qui ne changerait pas de composition. Ce mécanisme a été proposé suite à des études *in vitro* chez *E. coli*, expliquant probablement que les conflits codirectionnels n'induisent qu'une interruption transitoire de la réplication (Lalonde *et al.*, 2021; Pomerantz & O'Donnell, 2008). Bien que chez *E. coli* le réplisome semble être capable de déplacer activement des ARN polymérases encombrantes et de passer au travers d'un hybride ARN:ADN (Shin & Kelman, 2006), il n'est pas clair si un tel mécanisme peut s'appliquer *in vivo* chez tous les eucaryotes.

Autrement, la proximité entre un réplisome et une ARNPII peut conduire à l'expulsion, voire la dégradation, de l'ARNPII. Chez *S. cerevisiae*, Mec1, l'homologue d'ATR, phosphoryle le complexe de remodelage INO80 et le complexe PAF1, respectivement associés aux fourches et aux ARNPII en progression. En présence de stress répliatif, Mec1 est recruté aux fourches bloquées. Les trois facteurs sont impliqués dans l'éviction de l'ARNPII de la chromatine aux TRCs, qui sera alors dégradée par le protéasome (Poli *et al.*, 2016). Récemment, un mécanisme d'éviction de l'ARNPII aux sites de TRCs, dépendant de sa déphosphorylation par WDR82/PNUTS-PP1 a été proposé chez l'homme (Landsverk *et al.*, 2020). PAF1 aurait dans ce contexte un rôle protecteur contre ces phosphatases et donc contre la dégradation de l'ARNPII. Ces observations peuvent traduire des divergences entre espèces, ou bien souligner une multiplicité de moyens pour l'éviction de l'ARNPII et la résolution des TRCs. Soutenant ces dernières hypothèses, il est proposé que chez *S. pombe*, Dicer est recruté aux TRCs survenant spécifiquement dans des régions difficiles à répliquer, où il y promeut la dissociation de l'ARNPII (Castel *et al.*, 2014). Aussi, l'éviction du complexe transcriptionnel peut être médiée par TC-NER (voir chapitre I) (Hamperl & Cimprich, 2016). Le contexte génomique dans lequel une TRC se produit pourrait donc influencer son mode de résolution.

Dans les modèles précédents, la transcription est stoppée au profil de la reprise de la réplication. Un autre modèle repose sur un clivage transitoire de la fourche pour favoriser le passage de l'ARNPII en cas de collision frontale (Chappidi *et al.*, 2020). C'est le seul modèle dans lequel la reprise de la transcription est prioritaire à celle de la réplication. Le clivage de la fourche par MUS81/EME1 est requis ici pour permettre de résoudre le stress topologique créé par la convergence des machineries de transcription et réplication ([Figure 20, panel A](#)). Une fois résolu, la transcription peut reprendre tandis que la fourche est réparée par l'action conjointe de RAD52 et LIG4/XRCC4. Ce cycle de clivage/ligature assurerait une mobilité du réplisome favorable au passage de la machinerie de transcription.

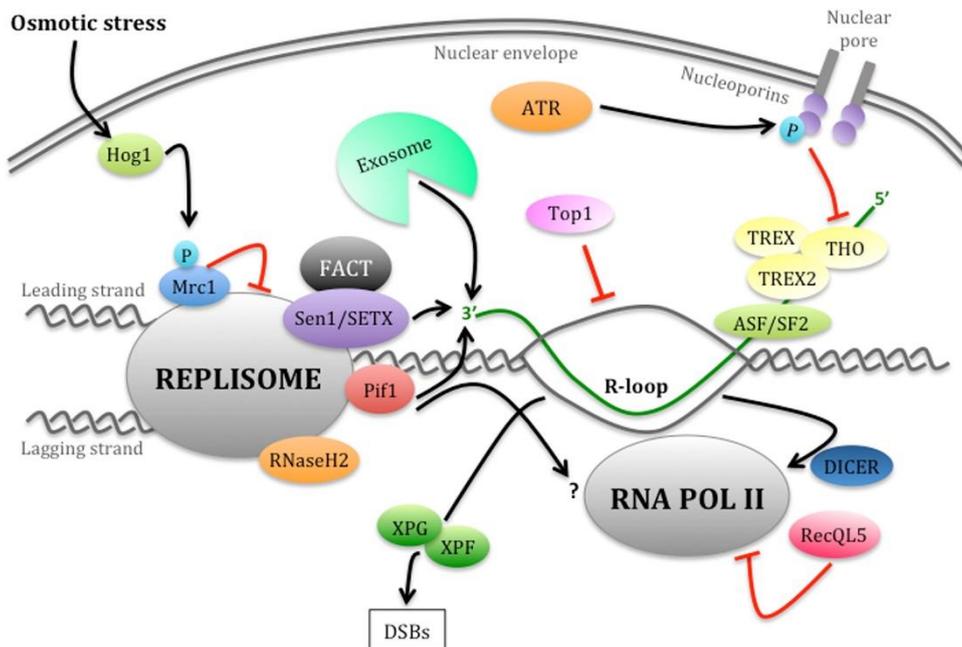


Figure 39. La résolution des R-loops lors d'une TRC frontale. De multiples facteurs de résolution des hybrides ARN:ADN comme Sen1/SETX, Pif1 ou encore RNase H2 sont associés au réplisome. Les R-loops peuvent être résolues par les facteurs du TC-NER (XPG/XPF). Leur formation peut être contrée par divers mécanismes. On pourra citer les facteurs Mrc1 et RecQL5, qui modulent l'avancée du réplisome et de la RNAPII respectivement ; ou encore la Topoisomérase I (Top1), qui limite le stress topologique favorable à la formation de R-loops. D'après (Brambati *et al.*, 2015).

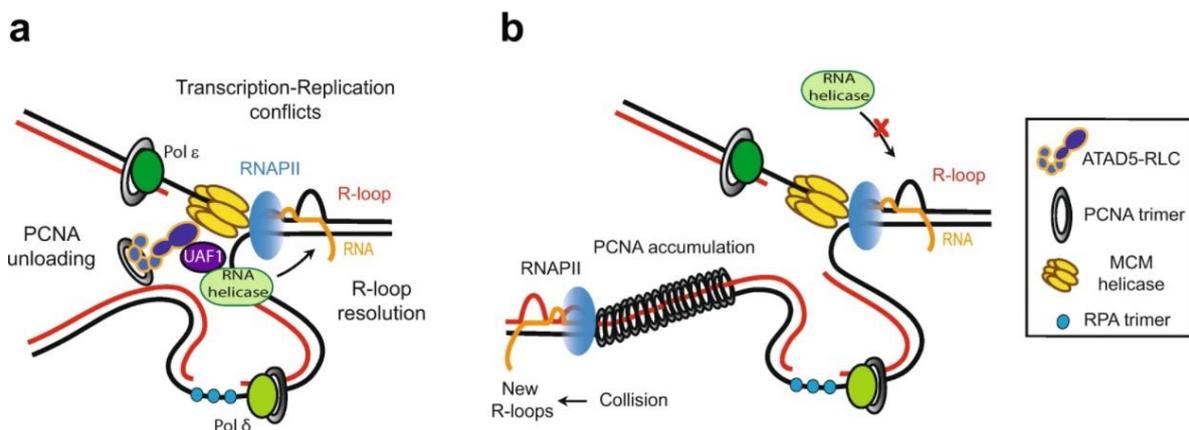


Figure 40. Modèle pour la résolution et prévention des R-loops médiées par ATAD5. (A) ATAD5 interagit avec des hélicases impliquées dans la résolution d'hybrides ARN:ADN, dans un contexte réplcatif non perturbé. En cas de TRC, où le risque de formation de R-loops augmente, il favorise le recrutement d'hélicases additionnelles pour en assurer la résolution et promouvoir l'avancée du réplisome. (B) En absence d'ATAD5, la résolution des R-loops est moins efficace. Aussi, l'accumulation de PCNA sur le brin retard est un facteur de risque pour la formation de nouvelles R-loops au site de collision. D'après (K.-Y. Lee & Park, 2020).

1.1.2. La résolution des R-loops aux sites de conflit

La résolution des TRCs passe également par la résolution des R-loops. De nombreux facteurs impliqués dans la résolution de hybrides ARN:ADN sont donc actifs aux TRCs ([Figure 39](#)), et certains modes de résolution sont d'ailleurs propres à ce contexte.

On pourra citer tout d'abord Senataxin, qui a été décrite chez l'homme et *S. cerevisiae* comme un facteur clé de la résolution de ces conflits (Alzu *et al.*, 2012; Brambati *et al.*, 2018; San Martin-Alonso *et al.*, 2021). Il est proposé que Sen1 aurait un rôle majeur contre la formation d'hybrides ARN:ADN principalement en phase S (San Martin-Alonso *et al.*, 2021). Elle est d'ailleurs associée physiquement au réplisome dont elle promeut la progression au travers des régions prônes à former des R-loops (Alzu *et al.*, 2012). Lorsque l'hélicase est absente, on observe une augmentation des TRCs frontales et l'activation d'origines dormantes est alors requise pour assurer la complétion de la réplication (Alzu *et al.*, 2012; Brambati *et al.*, 2018).

D'autres hélicases comme Pif1 ([Figure 39](#)) et certaines hélicases ARN DEAD-box (DDX1, DDX5, DDX21) ou DHX9 s'avèrent aussi associées au réplisome et participent à la résolution des TRCs *via* la résolution des R-loops (Azvolinsky *et al.*, 2006; S. Kim *et al.*, 2020; McDonald *et al.*, 2016). Le recrutement de ces hélicases ARN serait médié par ATAD5 (Elg1 chez les levures) ([Figure 40, panel A](#)) (S. Kim *et al.*, 2020). Dans un contexte de réplication non-perturbée, ATAD5 s'associe avec un complexe RFC-like pour médier l'éviction de PCNA en fin de réplication (Kang *et al.*, 2019). En contexte de stress répliatif, ATAD5 participe à la dé-ubiquitination de PCNA et aide ainsi à contrôler la mise en place de synthèse d'ADN trans-lésionnelle. Aussi, sa fonction de retrait de PCNA favoriserait le recrutement de Rad51 aux fourches bloquées, et donc en promeut le redémarrage (Park *et al.*, 2019). Finalement un rôle dans la prévention de l'accumulation et la résolution des R-loops ont été attribués à ATAD5 (S. Kim *et al.*, 2020). En induisant le retrait de PCNA de la chromatine, ATAD5 permet d'enlever des obstacles à la progression des machineries de transcription et limiterait donc la formation de R-loops ([Figure 40, panel B](#)). De plus, il serait associé avec les hélicases DEAD-box, les faisant voyager avec le réplisome. Lors de la rencontre avec une R-loop préexistante, ou générée lors d'une TRC frontale, les hélicases déjà présentes peuvent médier rapidement sa résolution. Il est proposé qu'en condition de stress répliatif accru, la présence d'ATAD5 permet de stimuler le recrutement de nouvelles hélicases.

Concernant les RNase H, l'association de RNase H2 au réplisome pourrait lui conférer l'opportunité d'agir rapidement sur les hybrides ARN:ADN des R-loops aux TRCs ([Figure 39](#)). Bien que sa capacité d'interaction avec PCNA ne soit pas requise pour son activité, on pourrait supposer que cette interaction permette de lui donner un accès privilégié à ces R-loops (Chon *et al.*, 2013).

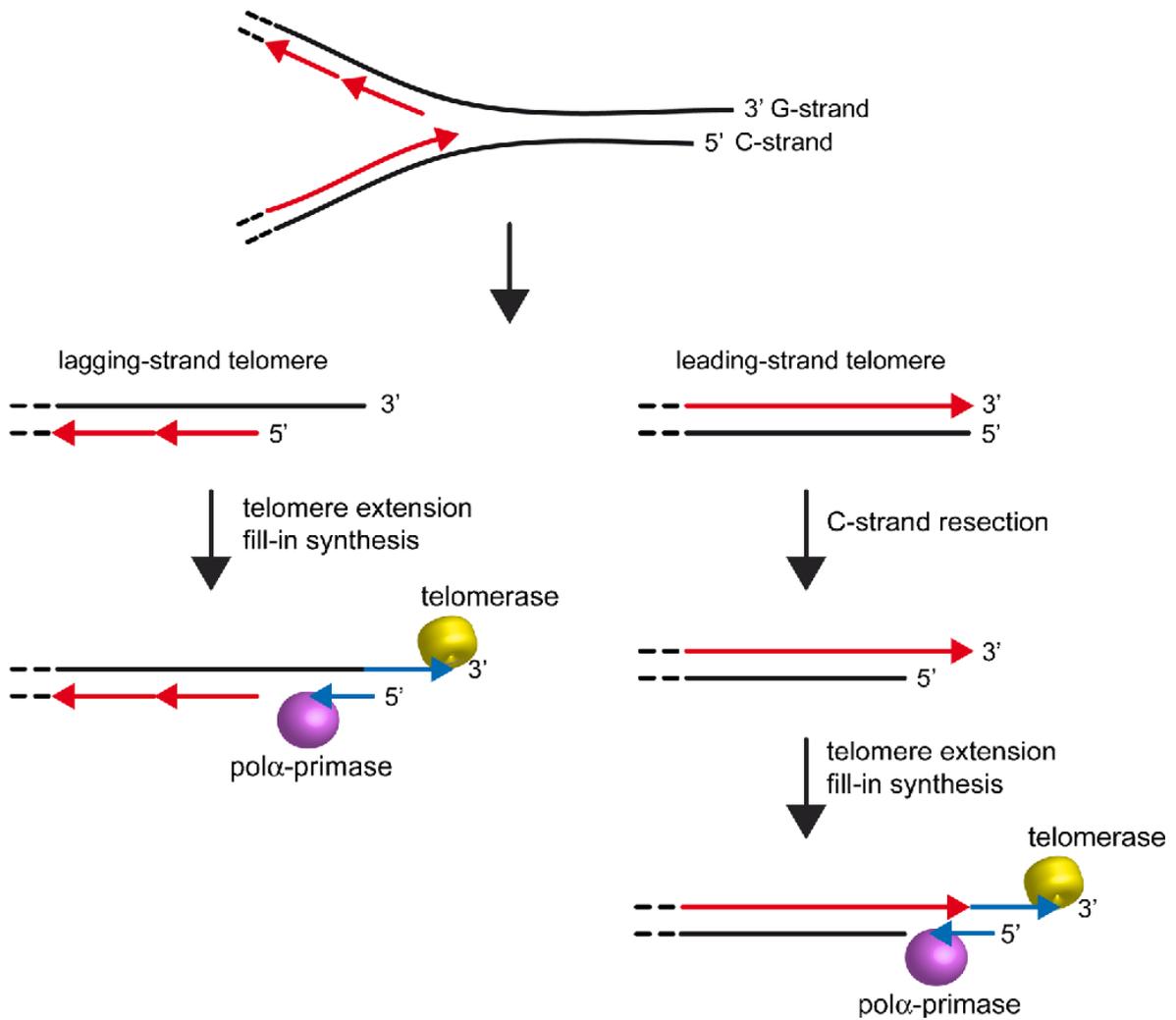


Figure 41. Les télomères ont des extrémités 3' sortantes, pouvant être allongées par la télomérase.

Le retrait de l'amorce du dernier fragment d'Okazaki sur le brin retard forme une extrémité 3' sortante (partie gauche). Cette structure est retrouvée du côté du brin précoce, qui est la cible de nucléases 5'→3' (partie droite). La télomérase contribue à l'extension des extrémité 3' sortantes des télomères, et le brin complémentaire est alors synthétisé par le complexe Pol α -primase. Les brins néo-synthétisés sont indiqués en rouge, ou en bleu pour le phénomène d'extension des extrémités. D'après (Bonetti *et al.*, 2013).

On observe également un rôle particulier de facteurs de protection des fourches aux sites de TRCs. J'évoquais précédemment la coopération entre les facteurs de la RH et les suppresseurs de tumeur de la voie FA. Les facteurs BRCA2 (ou FANCD1), BLM, FANCD1 et FANCD2 agissent de concours pour la stabilisation et le redémarrage des fourches de réplication bloquées.

Dans le cadre particulier d'une TRC codirectionnelle, on observe le recrutement rapide de BRCA2, FANCD2 et BLM, qui seraient impliqués dans la résolution de l'hybride ARN:ADN (Shao *et al.*, 2020). Aussi, l'activité translocase de FANCM pourrait être impliquée dans la résolution directe de ces structures (Schwab *et al.*, 2015). Même si les mécanismes moléculaires impliqués sont encore incompris, plusieurs études s'accordent sur la participation des membres de la voie FA aux TRCs dans la prévention et la résolution des hybrides ARN:ADN, tout en assurant en parallèle la stabilité de la fourche bloquée (M. L. García-Rubio *et al.*, 2015; Schwab *et al.*, 2015; Shao *et al.*, 2020).

2. Rôle des R-loops dans la régulation de la réplication à certains loci

Les R-loops peuvent se former de manière dynamique en absence de stress réplicatif. C'est notamment le cas aux régions d'initiation et de terminaison de transcription, où elles auraient notamment des fonctions régulatrices dans le maintien du paysage épigénétique aux promoteurs ou encore pour faciliter l'éviction du transcrit (Zong *et al.*, 2020). Dans la veine de ces études sur le rôle régulateur des R-loops, il a été montré que leur formation est nécessaire pour assurer la réplication de certaines régions du génome. Ces observations mettent en lumière la complexité des relations entre R-loops et réplication.

2.1. R-loops et maintenance des télomères

Les télomères sont des structures nucléoprotéiques protégeant les extrémités linéaires des chromosomes eucaryotes contre les attaques de nucléases ou la mise en place d'évènements de réparation aberrants. Un autre rôle des télomères est de fournir un substrat adéquat pour la réplication des extrémités chromosomiques. Les bouts des chromosomes sont caractérisés pour avoir des extrémités 3' sortantes. Cela s'explique de deux manières ([Figure 41](#)). Tout d'abord, la synthèse discontinue sur le brin retard induit la perte de courtes séquences à chaque cycle de réplication. En effet, une fois la dernière amorce de fragment d'Okazaki retirée, la séquence ADN correspondante ne peut pas être copiée de manière conventionnelle : le brin néo-synthétisé se retrouve alors plus court que le brin matrice. Aussi, les télomères sont la cible de nucléases qui les dégradent depuis leur extrémité 5'. Ces mécanismes participent au raccourcissement progressif des télomères jusqu'à un seuil limite à partir duquel les cellules ne peuvent plus se diviser et entrent en sénescence répllicative.

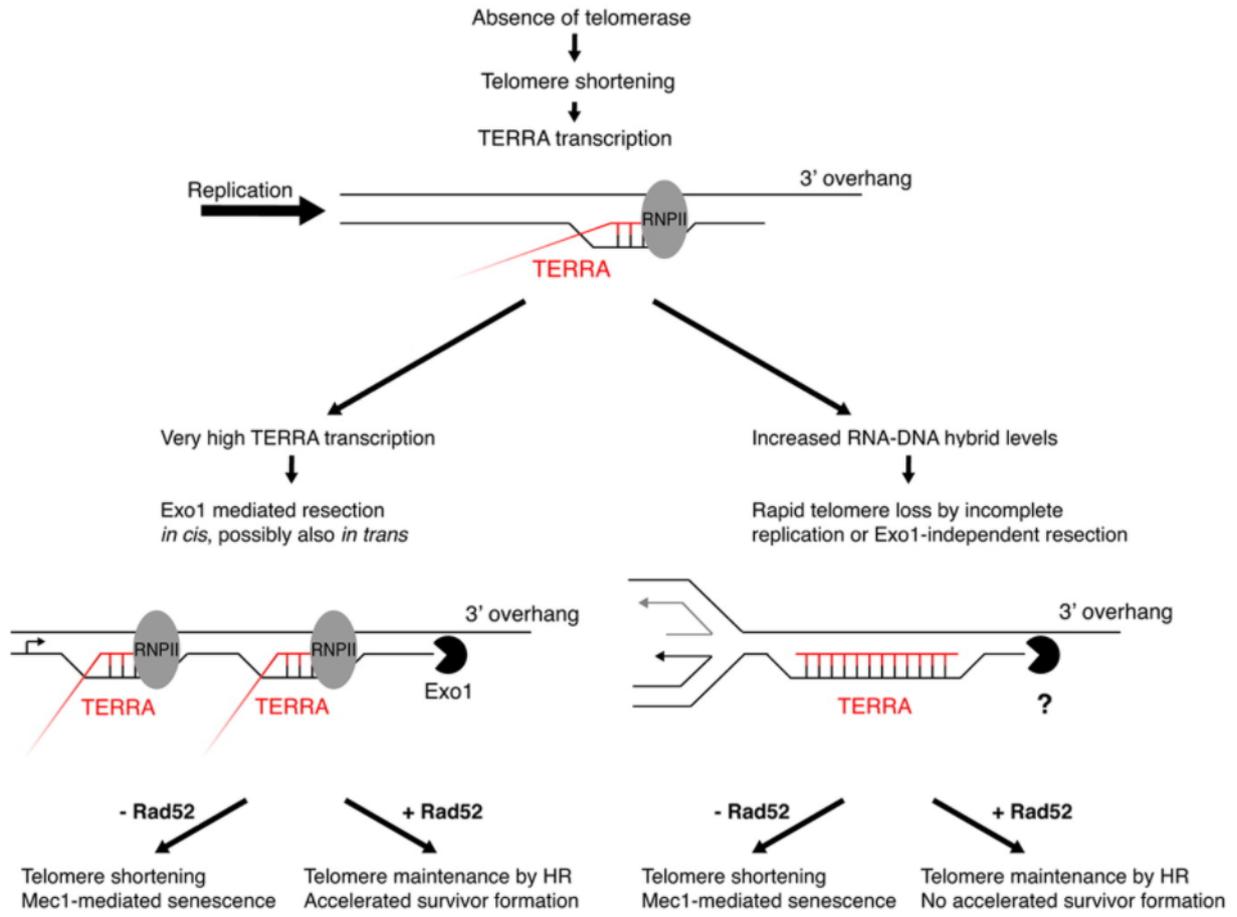


Figure 42. Conséquences de l'augmentation de la transcription et de l'accumulation d'hybrides ARN:ADN aux télomères en absence de la télomérase chez *S. cerevisiae*. En l'absence de télomérase et de la RH, l'augmentation de la transcription de TERRA (à gauche) ainsi que la stabilisation des hybrides ARN:ADN (à droite) conduisent au raccourcissement des télomères et induisent la sénescence répllicative. En revanche, si la RH peut être mise en place, les événements de recombinaison permettent le maintien des télomères. Modifiée d'après (Balk *et al.*, 2014).

Un moyen de contrecarrer ce phénomène dépend de l'élongation du télomère par la télomérase (Figure 41). La télomérase est un complexe ribonucléoprotéique aux fonctions proches des reverse transcriptases. Elle utilise une molécule d'ARN interne comme matrice pour la synthèse de l'extrémité télomérique manquante.

Elle est exprimée constitutivement chez les levures. En revanche, ce n'est pas le cas dans la plupart des cellules somatiques chez l'homme. Néanmoins, la majorité des cellules cancéreuses échappent à la sénescence répllicative suite à la réactivation de l'expression de la sous-unité catalytique de la télomérase. Il est à noter que de façon minoritaire, on peut aussi observer l'émergence d'un mécanisme alternatif de rallongement des extrémités, l'ALT (*Alternative Lengthening of Telomeres*), basé sur la recombinaison homologue. L'ALT est retrouvé chez les levures appelées 'survivantes', caractérisées par une déficience pour l'utilisation de la télomérase.

La transcription aux télomères par l'ARNPII forme un long transcrit non-codant nommé TERRA (*TElomeric Repeat-containing RNA*). Il a été montré chez les levures que le raccourcissement des chromosomes au cours de la phase S induit l'expression et l'accumulation de TERRA aux télomères, qui y promeut le recrutement de la télomérase (Cusanelli *et al.*, 2013; Moravec *et al.*, 2016). Pour cela, TERRA interagit avec l'ARN TLC1 de la télomérase, et le complexe est dirigé au télomère d'où TERRA est originaire dépendamment de l'action de Mre11, Tel1 et Ku (Cusanelli *et al.*, 2013). En l'absence de télomérase, TERRA peut former *in cis* un hybride ARN:ADN qui promeut les événements de RH du ALT aux télomères courts (Cusanelli *et al.*, 2013; Graf *et al.*, 2017). D'après une récente étude *in vitro*, TERRA pourrait aussi être recruté *in trans*, via une réaction d'invasion de brin médiée par Rad51, avec qui TERRA interagit physiquement (Feretzaki *et al.*, 2020). Si la RH ne peut se mettre en place, ou si les facteurs de résolution des hybrides ARN:ADN sont absents, la stabilisation des hybrides devient un facteur de risque qui peut induire une sénescence précoce (Balk *et al.*, 2013; M. García-Rubio *et al.*, 2018) (Figure 42). Les niveaux d'hybrides ARN:ADN mesurés dans les cellules humaines cancéreuses ALT et chez les levures 'survivantes' sont en conséquent anormalement hauts. Le niveau d'hybrides ARN:ADN aux télomères est régulé par l'action des RNase H1 et H2 ou encore de Sen1 et Pif1 (Balk *et al.*, 2013; Pohl & Zakian, 2019).

La formation transitoire d'hybrides ARN:ADN aux télomères est un processus régulé, dépendant de la présence de télomérase et de la longueur des télomères. La transcription de TERRA, et donc potentiellement la présence d'un hybride aux télomères, sont des phénomènes importants pour assurer le maintien des extrémités télomériques et garantir la survie cellulaire. Néanmoins, leur présence représente un danger pour l'avancée des fourches de réplication : la coordination de tous ces

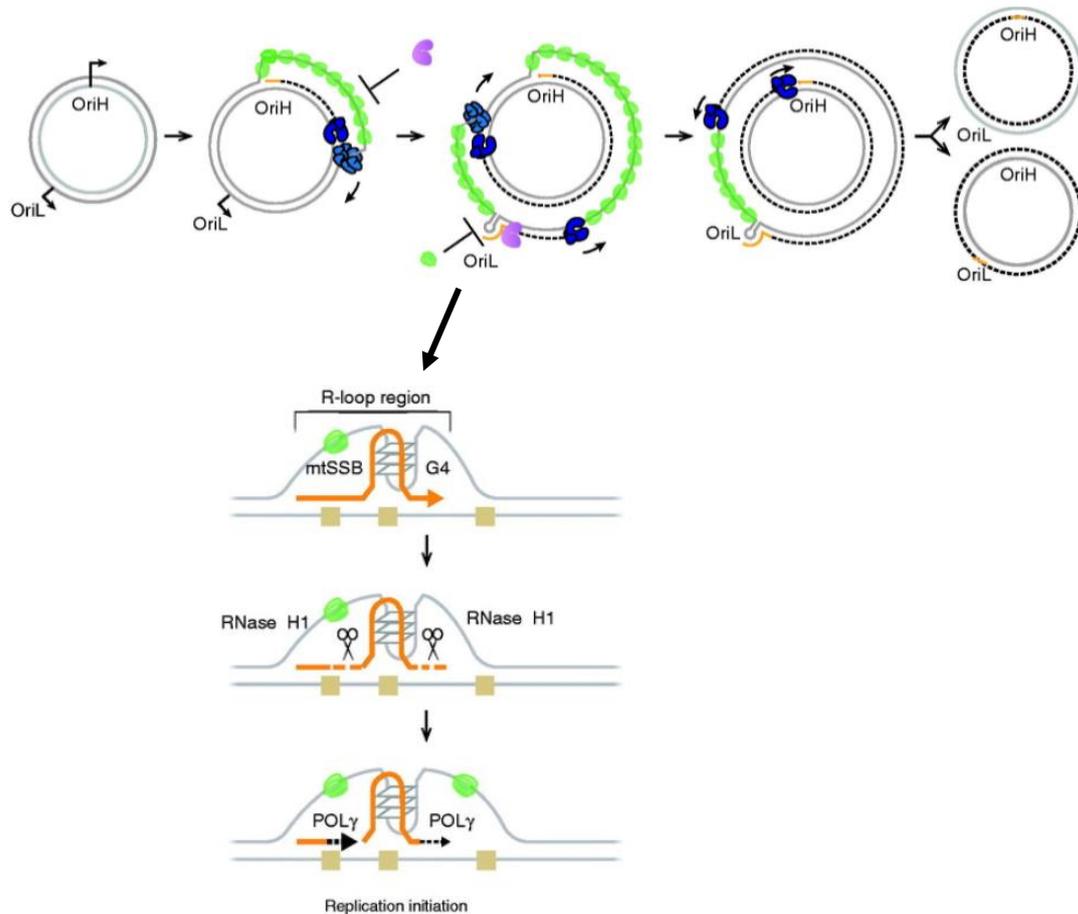


Figure 43. Modèle de réplication asynchrone de l'ADN mitochondrial chez les mammifères. La synthèse d'ADN débute sur le brin L au niveau de l'origine OriH. Le brin H se trouve déplacé sous forme d'ADNsb. Ce brin pourrait être protégé par le recrutement de protéines mitochondriales fixant l'ADNsb (mtSSB) comme représenté ici, ou bien couvert d'un long transcrite ARN. Lorsque le réplisome sur brin L passe au niveau de l'origine de réplication du brin H (OriL), elle adopte une structure secondaire tige-boucle. Une R-loop est formée sur cette région par POLRMT (transcription : trait orange). RNase H1 (ciseaux) permet de maturer la R-loop en une amorce reconnaissable par la polymérase réplivative Pol γ (pointillés orange). Les mtSSB et/ou l'ARN appariés au brin H sont retirés pour permettre sa copie complète. Modifiée d'après (Falkenberg & Gustafsson, 2020).

évènements doit donc être très finement régulée. Chez l'homme, un modèle propose que la transcription de TERRA précède la réplication des télomères. Lorsque les télomères sont longs, Rif2 assure le recrutement de RNase H2 et la dégradation de TERRA en fin de phase S. Au contraire, lorsque les télomères sont courts, Rif2 n'est plus recruté : l'hybride est stabilisé, et les risques de TRC codirectionnelle augmentent. La TRC sera dans ce cadre un évènement clé pour l'activation de DDR et la mise en place de la RH (Graf *et al.*, 2017).

2.2. R-loops et réplication de l'ADN mitochondrial

L'étude de variant pathologique de RNase H1 a permis de mieux comprendre son rôle fondamental, et celui des hybrides ARN:ADN, dans le métabolisme de l'ADNmt (Akman *et al.*, 2016). Chez les mammifères, l'ADNmt est circulaire et composé de deux brins, nommés brin lourd (H) et brin léger (L), chacun arborant une composition nucléotidique propre et spécifique. Les éléments régulateurs importants, *i.e.* origine et région terminatrice de réplication, ou encore promoteur transcriptionnel, se trouvent condensés sur chaque brin dans une région appelée la région contrôle.

La réplication des deux brins de l'ADNmt se fait majoritairement de manière unidirectionnelle et asynchrone (Figure 43). Lorsque c'est le cas, la réplication débute sur le brin L. Le brin H parental est déplacé par l'avancée du réplisome, jusqu'à arriver au niveau de l'origine de réplication de ce dernier. Au passage du réplisome sur le brin L, l'origine du brin H adopte une structure tige-boucle. L'ARN polymérase mitochondriale POLRMT peut synthétiser une petite R-loop à cet endroit, qui servira d'amorce à la polymérase répllicative Pol γ pour initier la réplication du second brin. RNase H1 s'avère essentielle pour permettre à la R-loop d'être reconnue comme une amorce par la Pol γ (Falkenberg & Gustafsson, 2020).

De plus, une théorie pour expliquer ce délai dans la réplication du brin H est qu'il pourrait être couvert par un long transcrit, formant un second brin provisoire (Holt, 2019a; Holt & Reyes, 2012). Le transcrit permettrait de protéger le brin H, puis servirait de matrice pour amorcer la réplication. Ce modèle appelé RITOLS (*Ribonucleotide Incorporation ThroughOut the Lagging Strand*) est très controversé (Falkenberg & Gustafsson, 2020). Néanmoins, les différents modèles de mécanismes de réplication de l'ADNmt s'accordent sur l'importance de la formation de R-loops par POLRMT, dont la maturation par RNase H1 constitue les amorces de la Pol γ .

La formation d'hybrides ARN:ADN co-transcriptionnels semble donc être une étape clé pour l'initiation de la réplication de l'ADNmt chez les mammifères. En revanche, en cas d'absence ou de défaillance de RNase H1, les R-loops ne sont pas correctement prises en charge et leur stabilisation affecte les cycles de réplication suivants (Holmes *et al.*,

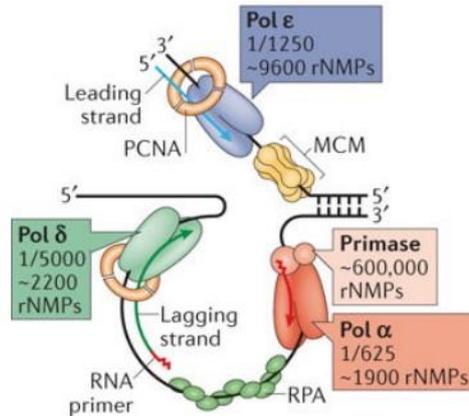


Figure 44. Incorporation de ribonucléotides par les polymérase répliquatives chez *S. cerevisiae*. La fréquence d'incorporation de ribonucléotide (rNMPs) par les polymérase répliquatives est indiquée sous forme de fraction (1 ribonucléotide tous les x désoxyribonucléotides incorporés). Le nombre total estimé de ribonucléotides incorporés dans les 12 millions de paires de bases du génome de *S. cerevisiae* est également renseigné. D'après (J. S. Williams *et al.*, 2016).

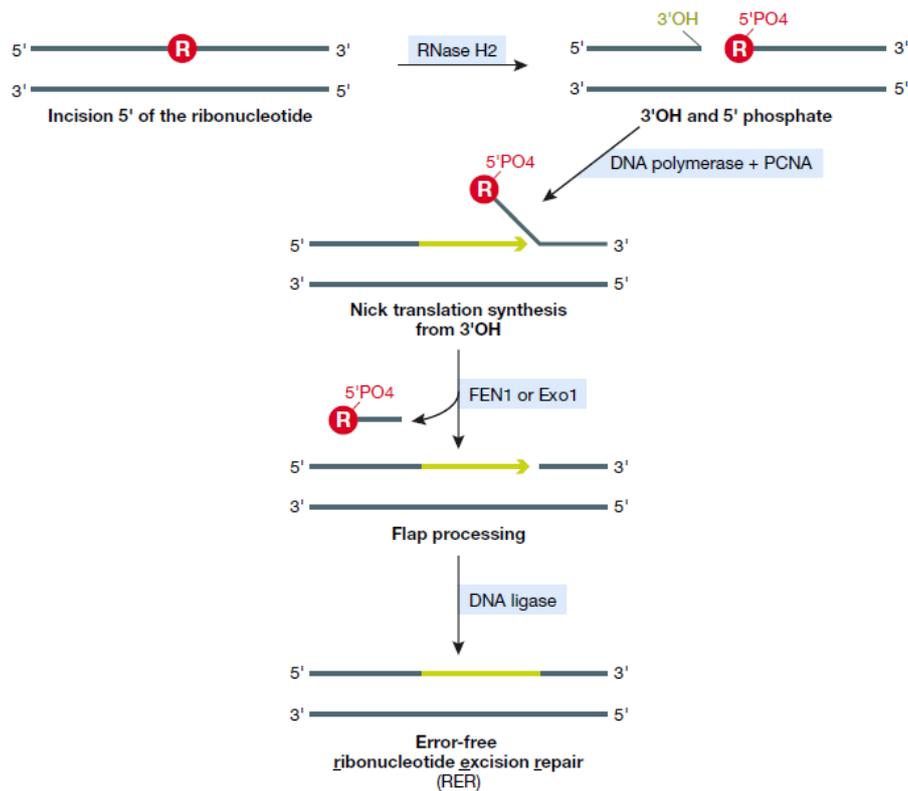


Figure 45. Mécanisme de ribonucleotide excision repair ou RER. RNase H2 initie le RER faisant une incision simple-brin en 5' du ribonucléotide isolé. La synthèse d'ADN débute en ce point, et promeut le soulèvement de l'extrémité contenant le ribonucléotide. Suite à son excision *via* le clivage par Fen1 ou Exo1, l'ADN néo-synthétisé est ligaturé au brin incisé. D'après (Kellner & Luke, 2020).

2015; Holt, 2019b). Chez la souris, l'expression de RNase H1 est d'ailleurs essentielle (Cerritelli *et al.*, 2003). Il est à noter que ce mode de répllication de l'ADNmt asynchrone dépendant de la transcription est propre aux mammifères, et qu'à ce jour, il n'a pas été observé chez d'autres organismes modèles.

3. Des hybrides ARN:ADN sont formés de manière canonique lors de la répllication

3.1. L'incorporation des ribonucléotides par les polymérase répllicative

Dans les cellules eucaryotes, les ribonucléotides sont présents en excès par rapport aux désoxyribonucléotides (McElhinny *et al.*, 2010). Leur abondance constitue un challenge pour la fidélité des polymérase répllicative, qui peuvent parfois les incorporer au brin en cours de synthèse. C'est le type d'erreur des polymérase répllicative le plus fréquent. Chez l'homme, les trois polymérase répllicative principale Pol α , Pol δ , et Pol ϵ incorporent en moyenne un ribonucléotide tous les 1.5-2 Kb d'ADN synthétisé. Leurs homologues chez les levures font de même (McElhinny *et al.*, 2010; Zong *et al.*, 2020) (Figure 44). Le rôle de chacune de ces polymérase dans la répllication des brins précoce ou retard a d'ailleurs été évalué en fonction de l'habilité spécifique de chacune à incorporer des ribonucléotides (Burgers & Kunkel, 2017).

L'accumulation de ribonucléotides est un facteur d'induction de stress répllicatif et d'instabilité génomique (Zong *et al.*, 2020). Afin de préserver l'intégrité et la stabilité du génome, ils doivent donc être retirés avec efficacité dès leur incorporation pour ne pas interférer, entre autres, avec les prochains cycles répllicatifs. Pol δ , et Pol ϵ possèdent des activités de relecture et de correction intrinsèques, leur permettant de remédier à une incorporation de nucléotide incorrecte. Néanmoins, ces activités s'avèrent d'une efficacité limitée sur le retrait des ribonucléotides (Kellner & Luke, 2020). Il existe un moyen de réparation dédié, nommé *Ribonucleotide Excision Repair* ou voie de RER, impliquant l'action d'enzymes spécialisées dans l'élimination de ces ribonucléotides isolés.

3.1.1. La voie de RER ou Ribonucleotide Excision Repair

C'est RNase H2 qui joue un rôle clé dans la mise en place du RER (Sparks *et al.*, 2012). RNase H2 reconnaît les mono- et di-ribonucléotides isolés dans un duplex ADN et fait une incision simple-brin à la jonction 5' ARN - 3' ADN (Figure 45). Ce clivage permet de stimuler la synthèse d'ADN par Pol δ depuis l'extrémité ADN 3'OH. Au passage de Pol δ , l'extrémité de brin contenant le ribonucléotide sera soulevée. Le brin déplacé forme une structure flap, reconnaissable par la flap endonucléase FEN1 ; Rad27 et Rad2 chez *S. cerevisiae* et *S. pombe*, respectivement. PCNA est requis pour coordonner les activités de synthèse et de déplacement de brin de Pol δ avec la coupure du flap par Fen1 (Sparks *et al.*, 2012). Une fois le(s) ribonucléotide(s) éliminé(s), et la séquence

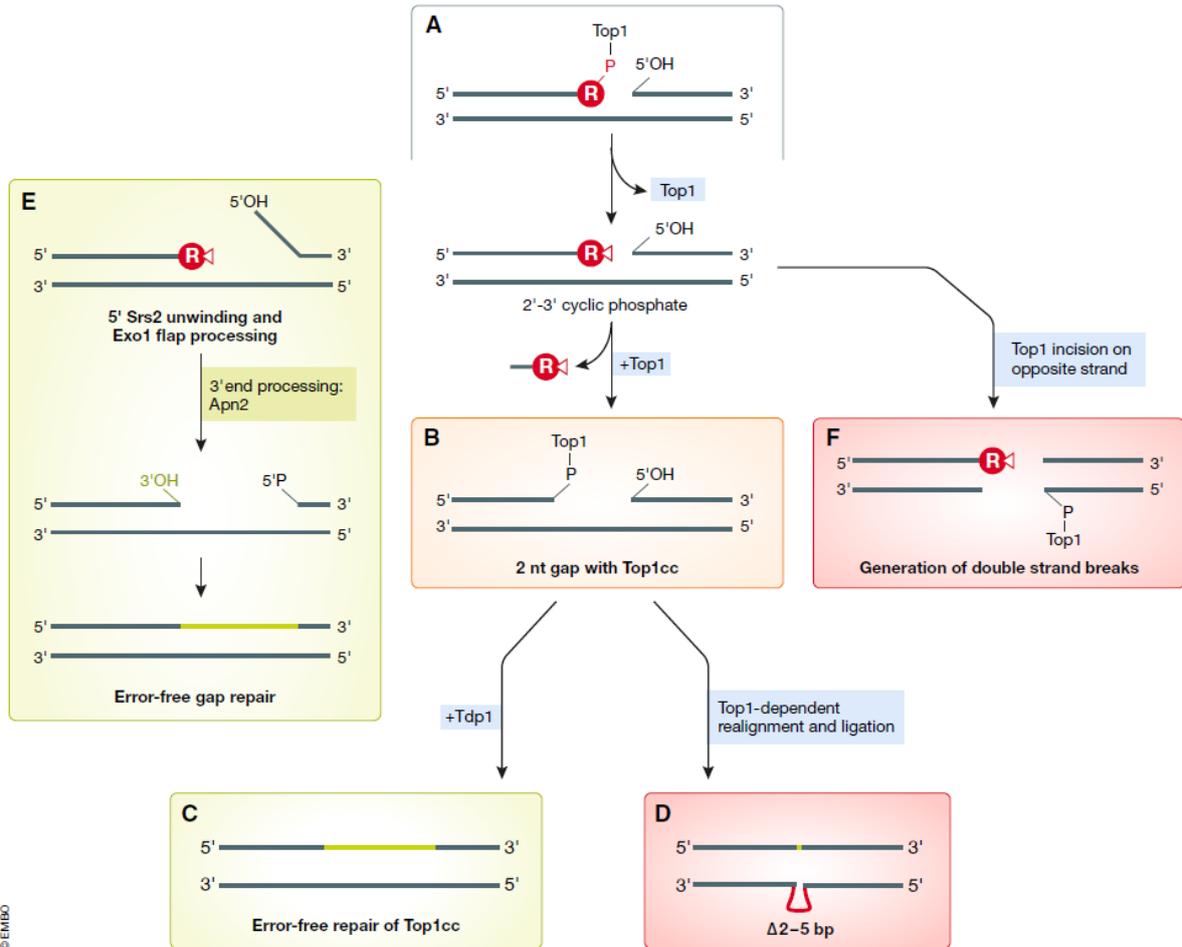


Figure 46. Mécanisme de RER alternatif reposant sur la Topoisomérase 1. (A) En absence de RNase H2, Top1 peut reconnaître les ribonucléotides isolés. Son intervention peut aboutir à une réparation correcte ou bien être source de mutations voire de CDB. (B-D) Top1 peut effectuer une seconde incision, libérant un di-nucléotide. Le processus de réparation de cette petite délétion peut induire (D) ou non (C) la perte d'information génétique. (E) La réparation sans erreur peut être médiée par l'endonucléase Apn2, l'hélicase Srs2 et l'exonucléase Exo1. (F) Si la seconde incision de Top1 se produit sur le brin opposé, cela crée une CDB dont la réparation requiert l'intervention de la RH. D'après (J. S. Williams *et al.*, 2016).

ADN manquante correctement synthétisée, l'intégrité du brin est restaurée par ligature grâce à Lig1. Il est proposé que Pol ϵ et Exo1 puissent se substituer dans ce modèle à Pol δ et Fen1 respectivement, bien qu'alors l'efficacité de réparation soit diminuée de moitié.

En l'absence de RNase H2, on observe une voie de RER alternative reposant sur l'action de la Topoisomérase I (Top1) (Figure 46). Initialement décrite chez *S. cerevisiae*, l'implication de Top1 a récemment été observé chez l'homme (Kellner & Luke, 2020; Zimmermann *et al.*, 2018). Dans ce cas, la tentative d'excision des ribonucléotides peut s'avérer mutagène et conduire à l'apparition de CDBs. Cette voie de secours du RER est active sur le brin précoce et emploie différents mécanismes d'excision (Sparks & Burgers, 2015). L'incision par Top1 produit une extrémité 5'OH ADN et une extrémité 2',3'- phosphate cyclique ARN. Des étapes additionnelles de traitement des extrémités sont requises pour générer l'excision du ribonucléotide et la ligature finale (Kellner & Luke, 2020). Tout d'abord, Top1 peut inciser une seconde fois, et forme alors un complexe avec un di-nucléotide contenant le ribonucléotide à exciser. Ce complexe peut être libérée par Tdp1 (Tyrosyl-DNA Phosphodiesterase 1). Les extrémités sont traitées et la courte séquence re-synthétisée pour assurer une ligature et une réparation sans erreur. Néanmoins, un scénario alternatif est que Top1 promeut la ligature des extrémités après le second clivage, entraînant une délétion de 2 nucléotides suite au réalignement des extrémités à joindre. Dans le cas où le di-nucléotide à inciser correspond à une séquence répétée, le réalignement peut être incorrect et conduire à des délétions allant jusqu'à 5 nucléotides. Ces événements de ligature erronés médiés par Top1 peuvent être contrés par l'action conjointe de l'endonucléase Apn2, de Srs2 et d'Exo1. Dans un dernier scénario, il a été proposé que le second clivage par Top1 soit fait sur le brin d'ADN opposé, générant ainsi une CDB dont la réparation dépend de Rad51 et Rad52 (Kellner & Luke, 2020). Chez l'homme, en absence de RNase H2, la perte de BRCA1 et BRCA2 n'est pas viable pour les cellules, confortant l'importance de la RH lorsque le RER peut être déficient (Zimmermann *et al.*, 2018).

3.1.2. Incorporation de ribonucléotides : des conséquences bénéfiques ?

Des travaux chez *S. cerevisiae* ont permis de mettre en évidence que les incisions de RNase H2 lors du RER servent de repères pour recruter la machinerie du MMR spécifiquement sur le brin néo-synthétisé, aux sites d'erreurs lors de la réplication du brin précoce (Ghodgaonkar *et al.*, 2013; Lujan *et al.*, 2013). La présence des ribonucléotides, de manière transitoire, a donc un rôle bénéfique pour le maintien de l'intégrité du génome. De manière indirecte, la baisse d'efficacité du MMR pourrait

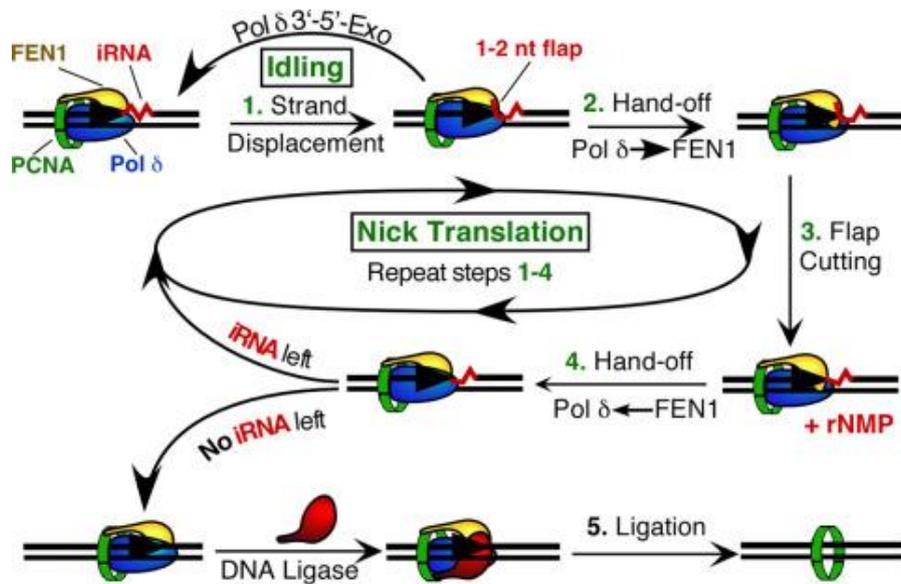


Figure 47. Modèle de dégradation de courts flaps pour la maturation des amorces des fragments d'Okazaki. Durant la maturation des fragments d'Okazaki, Pol δ déplace un court fragment de l'amorce (1 à 2 nucléotides) formant une structure flap. Fen1 reconnaît ce flap, se fixe à sa base et le clive. Ce processus est répété jusqu'à la dégradation complète de l'amorce ARN, voire de l'amorce complète s'il y a le besoin de corriger d'éventuelles erreurs de Pol α. La maturation des fragments d'Okazaki s'achève par la ligature faite par Lig 1. D'après (Burgers, 2009).

contribuer à l'instabilité génomique observée dans les cellules déficientes pour RNase H2.

Aussi, chez *S. pombe*, certaines cellules filles peuvent changer de signe sexuel par rapport à leur cellule mère. Le changement de signe sexuel dépend du retrait d'une empreinte, présente sur un des brins au locus *mat1*. Cette empreinte serait une séquence de di-ribonucléotides, incorporés probablement par la Pol α sur le brin retard, lors de la réplication au locus *mat1* chez la cellule mère (Singh *et al.*, 2019; Vengrova & Dalgaard, 2006). Ces di-ribonucléotides sont déposés lors de la pause programmée d'une fourche de réplication au site MPS1 et sont maintenus jusqu'à la prochaine phase S. Lors de ce nouveau cycle de réplication, l'empreinte va impacter la réplication du brin précoce, car le locus est transcrit de manière unidirectionnelle. Les événements de RH résultant de la prise en charge de ces intermédiaires de réplication vont entraîner le retrait de l'empreinte et le changement de signe sexuel de la cellule. La reprise de la réplication s'accompagne à nouveau d'une pause au site MPS1, et du dépôt d'une empreinte sur le brin tardif. La conservation de ces di-ribonucléotides spécifiques s'avèrent donc cruciale pour *S. pombe*, cependant les mécanismes moléculaires permettant leur incorporation et leur maintien sont encore très obscurs.

3.2. Les amorces des fragments d'Okazaki

Sur le brin retard, le complexe Pol α -primase synthétise des amorces chimériques composées de 7 à 12 ribonucléotides (primase), suivis d'une vingtaine de désoxyribonucléotides (Pol α). Ces amorces sont étendues par Pol δ sur 100 à 200 pb, formant ainsi les fragments d'Okazaki. Afin d'assurer la continuité du brin néo-synthétisé, les amorces ARN doivent être dégradées et leur équivalent ADN doit être synthétisé et ligaturé au fragment voisin. Les amorces ARN des fragments d'Okazaki occupent environ 5% du brin néo-synthétisé, et représentent donc une source non négligeable d'hybrides ARN:ADN. Plusieurs mécanismes peuvent se mettre en place pour assurer le retrait des amorces et la maturation des fragments d'Okazaki.

3.2.1. Modèles de maturation de courts et longs flaps

Lorsque Pol δ atteint l'extrémité 5' ARN de l'amorce du fragment d'Okazaki adjacent, elle la soulève et forme une structure flap. Il est proposé que la taille de ces flaps soient dans la mesure du possible maintenue à une taille très courte : les nucléotides sont soulevés un par un, et leur clivage est assuré par FEN1 (Figure 47). L'amorce est ainsi dégradée, un nucléotide après l'autre, jusqu'à l'élimination complète de la partie ARN.

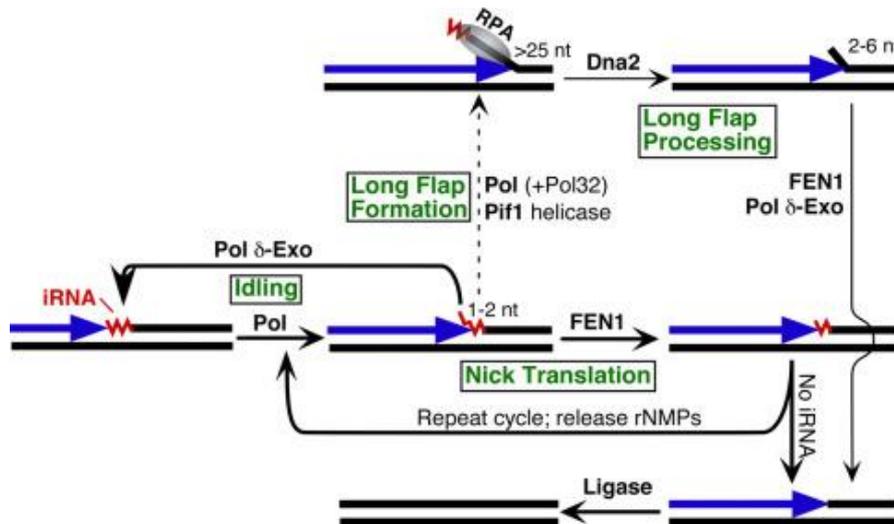


Figure 48. Modèle de dégradation de longs flaps pour la maturation des amorces des fragments d'Okazaki. Certains flaps courts peuvent être allongés notamment *via* la progression excessive de Pol δ et l'action de l'hélicase Pif1. Les flaps de plus de 30 nucléotides sont stabilisés par RPA, qui recrute Dna2. Le clivage par Dna2 induit le raccourcissement du flap. Ces petits flaps peuvent être éliminés par Fen1 ou Pol δ . D'après (Stith *et al.*, 2008).

Aussi, puisque Pol α ne possèdent pas d'activité de relecture/correction, il est proposé que Pol δ puisse continuer à avancer une fois l'amorce ARN passée, afin de permettre de corriger les erreurs faites par Pol α . Une fois que ce processus est achevé, Lig1 assure la ligature des deux fragments d'Okazaki adjacents.

Bien que la perte de FEN1 soit fatale pour le développement embryonnaire chez la souris, chez les levures *S. cerevisiae* et *S. pombe* la déplétion des homologues *rad27* et *rad2* est viable (Burgers, 2009; Larsen *et al.*, 2003). Ces observations suggèrent qu'il existe des moyens alternatifs pour le retrait des flaps. Tout d'abord, il est proposé qu'Exo1 puisse se substituer à Rad27/Rad2, car on observe une létalité synthétique chez les doubles mutants de levure. Aussi, un second modèle de maturation, spécialisé dans le retrait de longs flaps, servirait de mécanisme complémentaire chez les levures (Burgers, 2009).

Dans certains cas, le clivage par FEN1 ne peut se faire, comme en cas d'absence de l'enzyme, mais aussi si le flap arbore une structure secondaire ou est recouvert par RPA. La taille des flaps augmente dans ces circonstances. Les longs flaps peuvent également résulter d'une avancée trop rapide de la Pol δ , dont la progression limitée est régulée par un délicat équilibre de rotation entre ses activités de synthèse (avancée) et de dégradation (arrêt). Dans ce contexte, la maturation des fragments d'Okazaki repose sur l'activité 5' endonucléase de Dna2 (Zheng *et al.*, 2020) ([Figure 48](#)). A l'inverse de FEN1 qui effectue son clivage à la base du flap, *i.e.* à la jonction avec l'ADNdb, Dna2 se fixe et clive dans le flap. Les flaps de plus de 30 nucléotides sont reconnus par RPA, qui inhibe le clivage par FEN1, mais recrute et stimule l'activité de Dna2. Il en résulte la formation d'un petit flap, d'environ 5 nucléotides, qui ne peut ni être fixé par RPA, ni être clivé par Dna2. Pour compléter le clivage d'un long flap, l'action additionnelle de FEN1 ou même de la Pol δ est nécessaire. De plus, en l'absence de Rad27 et Exo1, la capacité de déplacement de brin de Pol δ , stimulée par la présence de l'hélicase Pif1, est indispensable à la création de longs flaps pouvant servir de substrat à DNA2 (Stith *et al.*, 2008; Zheng *et al.*, 2020).

Ces mécanismes de retrait des amorces, reposant sur la formation de flaps courts et longs, sont les modèles prédominants de la maturation des fragments d'Okazaki. Néanmoins, historiquement, un troisième scénario impliquant RNase H2 avait été proposé.

3.2.2. Le retrait des amorces ARN par RNase H2

Dans le modèle initialement proposé, l'amorce n'est pas soulevée et reste hybridée à son brin matrice. Sous cette forme hybride ARN:ADN, elle est alors reconnue par RNase H2. Il a été proposé que tous les ribonucléotides soient dégradés sauf celui à la jonction

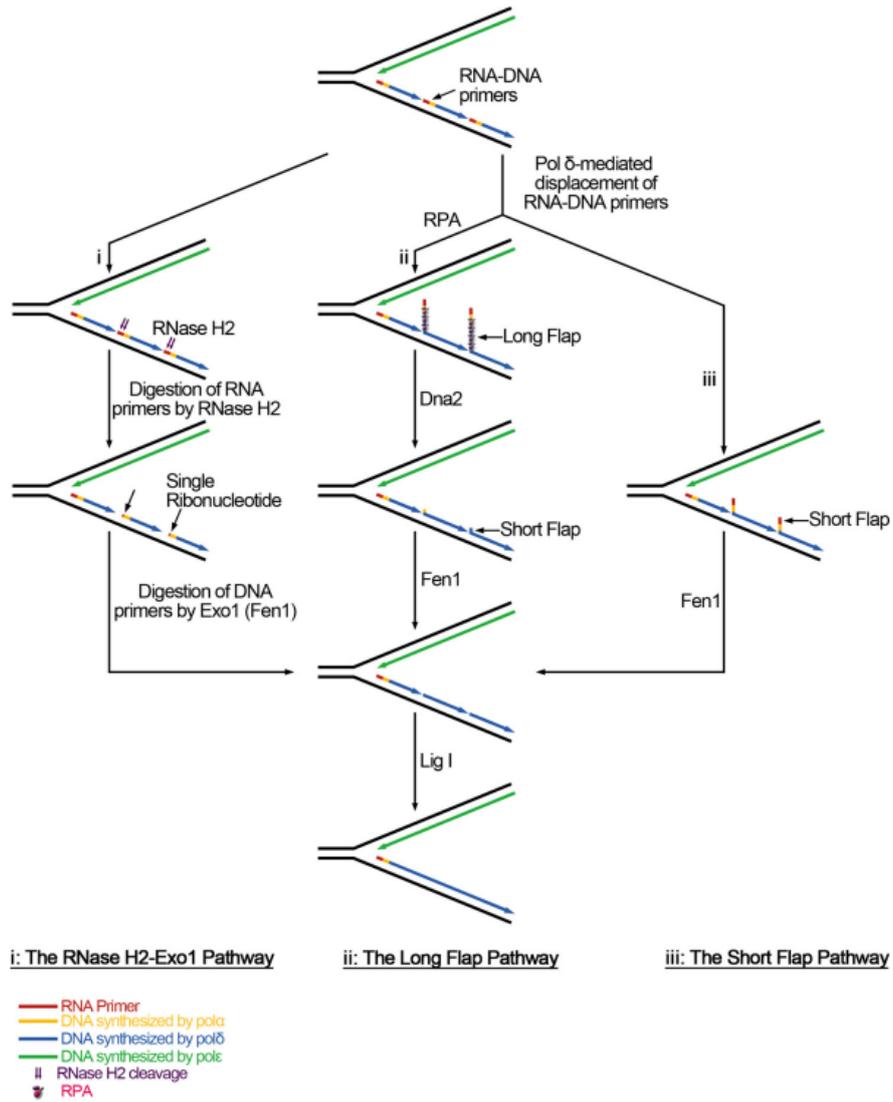


Figure 49. Les trois modèles de dégradation des amorces ARN des fragments d'Okazaki chez *S. pombe*. En parallèle des voies de retrait des flaps, il existe une voie dépendante de RNase H2 et Exo1. Les deux enzymes permettent respectivement la dégradation des parties ARN et ADN de l'amorce. D'après (B. Liu *et al.*, 2017).

ARN-ADN, dont l'excision repose sur l'activité 5' exonucléase de FEN1 (Zheng & Shen, 2011). Par la suite, plusieurs observations ont remis en doute certains aspects de ce modèle. Tout d'abord, l'activité exonucléase de FEN1 est très faible, à l'inverse de son activité d'endonucléase sur les structures flaps. Une variante à ce modèle a été proposée, suggérant que RNase H2 puisse dégrader l'amorce ARN avant son soulèvement par Pol δ . Le flap généré ne contiendrait qu'un ribonucléotide et la partie ADN synthétisée par la Pol α . Ce nouveau modèle semble plus en accord avec les préférences de substrats de FEN1, et la possibilité de corriger les erreurs de Pol α *via* le passage de Pol δ (Kao & Bambara, 2003).

D'autre part, il a été suggéré chez la drosophile que la présence de RNase H2 puisse à la fois stimuler la synthèse d'ADN par Pol α , et induire un raccourcissement de la taille des amorces. En d'autres termes, RNase H2 favoriserait la dissociation de la polymérase et induirait son recyclage à une nouvelle position : avec RNase H2, les amorces sont plus courtes mais plus nombreuses. Ces résultats ont laissé penser que RNase H2 pourrait agir dès la synthèse des amorces des fragments plutôt qu'au moment de la préparation à la ligature finale des fragments adjacents (Kao & Bambara, 2003).

Le fait que la double déplétion de *fen1* et *rnh201* soit viable chez les levures a conduit à la conclusion que ce mécanisme n'était pas le moyen prédominant pour retirer les amorces ARN. Néanmoins, on pourra garder en tête que dans le cas où la génération de flaps ne peut pas se faire, *i.e.* en situation où il n'y a pas de Pol δ convergente, ce mécanisme de retrait d'amorce puisse être indispensable.

Une étude récente chez *S. pombe* a permis de conforter l'existence *in vivo* d'une voie de retrait des amorces ARN-ADN par les activités exonucléases de RNase H2 et Exo1 (B. Liu *et al.*, 2017). La double délétion de *rnh201* et *exo1*, ou *rnh201* et *fen1/rad2*, entraîne une augmentation du nombre et de la taille de flaps par rapport aux simples délétions de *exo1* et *rad2*. Ces résultats suggèrent que RNase H2 peut initier la dégradation de la partie ARN de l'amorce, dont la partie ADN sera prise en charge par Exo1 ou Fen1, comme il l'a été initialement proposé ([Figure 49](#)).

VI. Objectif et système expérimental

1. Objectif principal

L'altération de la progression des fourches de réplication est une des causes principales du stress répliatif. Cela est dû, entre autres, à la formation d'hybrides ARN:ADN qui compromet le maintien de la stabilité du génome en augmentant le risque de TRCs et

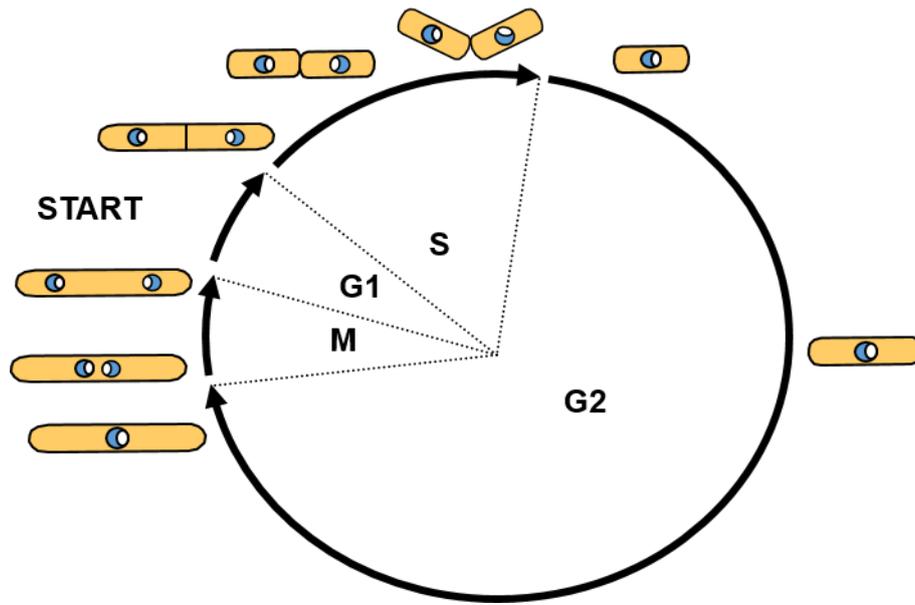


Figure 50. Le cycle cellulaire de *S. pombe*.

de dommages à l'ADN. Récemment, il a été proposé que des hybrides ARN:ADN se forment lors de la réparation des cassures d'ADN double-brin. Ils seraient des intermédiaires du processus de réparation, jouant des rôles positifs comme négatifs, sur les machineries de réparation. Aussi, leur dégradation contrôlée est une étape nécessaire pour achever la réparation des CDBs par la RH.

Lorsqu'une fourche de réplication s'arrête, elle peut être activement redémarrée, notamment grâce à la voie de la RH. L'objectif principal de ma thèse est de déterminer si des hybrides ARN:ADN seraient également des intermédiaires transitoires du processus de redémarrage des fourches de réplication bloquées par la RH.

2. Système expérimental

Pour répondre à l'objectif principal de la thèse, j'ai exploité un système de blocage de fourche conditionnel chez *S. pombe*, le système *RTS1*-RFB, permettant de bloquer une fourche de réplication donnée à un locus défini. J'ai étudié les conséquences de la stabilisation des hybrides ARN:ADN sur l'intégrité et le devenir de cette fourche bloquée.

2.1. *S. pombe* est un organisme modèle

La levure fissipare *S. pombe* est un organisme eucaryote unicellulaire ayant une forme cylindrique avec des bouts arrondis. Sa taille varie de 7 à 15 μ m au cours du cycle cellulaire. C'est un organisme essentiellement haploïde dont la multiplication se fait principalement par reproduction asexuée. Comme le nom le laisse supposer, les levures fissipares forment un septum central d'où elles se divisent par fission transversale. Deux cellules filles de taille identique sont alors formées, tel que l'on peut l'observer chez les cellules mammifères (Hoffman *et al.*, 2015).

En réponse à une carence azotée, les cellules haploïdes peuvent passer d'un mécanisme de croissance végétatif à un mode de reproduction sexué. Dans ce cadre, si deux cellules de type sexuel opposés (*h+* et *h-*) se croisent, elles conjuguent. Les diploïdes résultant de la fusion des deux cellules parentales entrent rapidement en méiose et forment une tétrade : 4 spores dans un asque, qui après la germination formeront 4 nouvelles levures haploïdes (Sabatinos & Forsburg, 2010).

Le temps de génération chez *S. pombe* est de 3 heures en milieu riche. Durant ce laps de temps, l'identification de la phase du cycle cellulaire dans laquelle se trouve une cellule est relativement aisée, de par sa taille, son nombre de noyaux ou encore la présence d'un septum (Hoffman *et al.*, 2015). Les cellules passent près des trois quarts

du temps du cycle en phase G2 (Figure 50). Elles y sont mononuclées et de petite taille, et elles ne présentent pas de septum. En mitose, les chromosomes ségrègent mais la cytodierèse n'aura lieu qu'en fin de phase S. Lors des phases M, G1 et S, les cellules sont donc binuclées. La phase G1 chez *S. pombe* a la particularité d'être très transitoire et difficile à détecter. C'est en phase S que le septum se forme et où les cellules atteindront leur taille maximale. Le 13.8Mb de génome répartis sur trois chromosomes (chI: 5.7Mb, chII: 4.6Mb, et chIII: 3.5Mb) y sont répliqués (Wood *et al.*, 2002). Cette phase s'achève par l'évènement de fission suite à l'invagination du septum. Les cellules filles entament donc leur cycle directement depuis la phase G2.

Utiliser *S. pombe* comme organisme modèle a de multiples avantages (Sabatinos & Forsburg, 2010). Puisqu'elle est non pathogène et que son temps de génération est court, elle peut être aisément manipulée et maintenue en laboratoire. Comme toute levure, la taille de son génome et son état d'organisme unicellulaire sont des caractéristiques qui la rendent idéale pour effectuer des analyses génétiques et éditer son génome à la demande. *S. pombe* possède aussi quelques atouts propres. Elle est d'un point de vue évolutif aussi éloignée de *S. cerevisiae* que les levures de l'homme. Par rapport à *S. cerevisiae*, elle est considérée comme étant une levure plus ancienne, dont l'évolution a été plus limitée depuis la divergence d'avec leur ancêtre commun. *S. pombe* partage donc beaucoup de mécanismes biologiques avec les mammifères. C'est notamment le cas en ce qui concerne la réplication de l'ADN.

2.2. Un système de blocage de fourche conditionnel chez *S. pombe*

Chez les eucaryotes, il existe plusieurs sites de pauses des fourches de réplication naturels. Parmi eux, on trouve la barrière *RTS1* (*Replication Terminator Sequence 1*) à proximité du locus de changement de type sexuel sur le chromosome II de *S. pombe*. Afin d'assurer la mise en place de l'empreinte, il est nécessaire que le locus soit répliqué de manière unidirectionnelle : le brin où sera déposé l'empreinte doit être répliqué en tant que brin retard (*i.e.* impliquer Pol α) (Singh *et al.*, 2019). L'activation de la barrière *RTS1* permet le blocage de la fourche convergente et d'assurer cette orientation unique de réplication (Dalgaard & Klar, 2001).

RTS1 est une séquence de 859pb, composée de deux régions (Codlin & Dalgaard, 2003). La région B de 450pb est essentielle pour l'activation de la barrière. Seule, *RTS1* n'induit pas de blocage. Le blocage dépend de la fixation d'un complexe protéique dont la protéine principale est Rtf1 (*Replication termination factor 1*). La région B contient 4 sites de fixation à Rtf1. L'accumulation de Rtf1 sur *RTS1*, et son interaction avec les autres protéines du complexe (Rtf2, Swi1 et Swi3) constitue une contrainte à la progression de la fourche convergente. La seconde région de *RTS1*, ou région A, fait

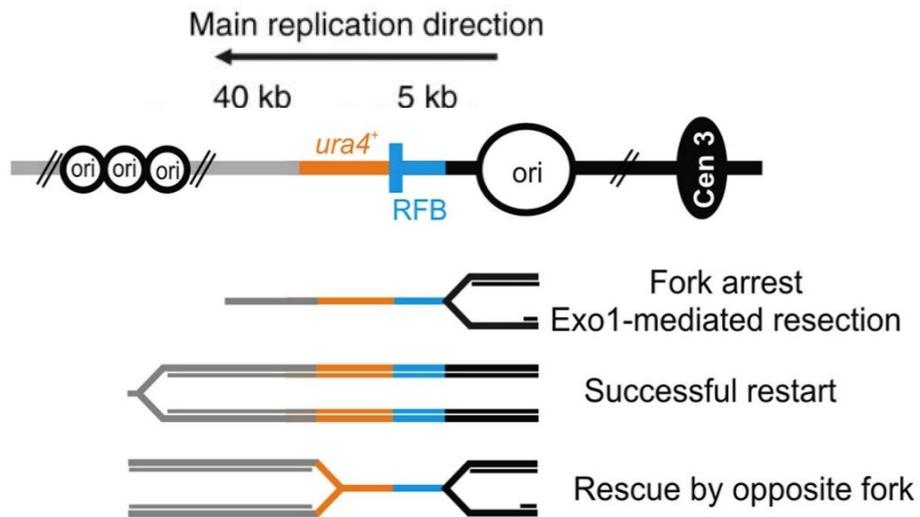


Figure 51. Le système *RTS1-RFB* chez *S. pombe*. Inséré sur le chromosome III, *RTS1-RFB* activé (en bleu) bloque la progression des fourches de réplication progressant du centromère (Cen3) vers le télomère. Les origines de réplication principales (ori) sont représentées par des cercles noir, dont la taille reflète l'efficacité d'activation. Les fourches bloquées peuvent être activement redémarrées par la RH. En absence des facteurs de RH, les fourches sont dysfonctionnelles et leur sauvetage s'effectue *via* fusion à l'arrivée d'une fourche convergente. Modifié de (Ait Saada *et al.*, 2017).

60pb et servirait au renforcement du blocage, notamment car Rtf2 s'y fixe. La caractéristique de la barrière *RTS1* est qu'elle bloque l'avancée des fourches de manière polaire, c'est-à-dire qu'une seule direction de progression est bloquée. Cela est dépendant de l'orientation de la séquence *RTS1*.

Ce système de blocage polaire naturel a été converti en outil génétique pour l'étude des transactions moléculaires intervenant aux fourches de réplication bloquées (Lambert *et al.*, 2005). Une séquence *RTS1* a été introduite sur le chromosome III, en bordure du gène *ura4* du côté centromérique ([Figure 51](#)). La dynamique de réplication à ce locus est bien caractérisée. Il est répliqué essentiellement selon une orientation centromère → télomère, par des fourches émanant d'une forte origine de réplication (*i.e.* origine activée précocement) située à 5kb en amont de *ura4*. L'origine de réplication la plus proche du côté télomérique se trouve à plus de 40kb, et est une origine dite faible (*i.e.* origine activée tardivement en phase S). Lorsque le système *RTS1*-RFB est activé, il bloque l'avancée de la fourche en provenance du côté centromérique. La nature et le lieu du blocage de fourche sont donc des paramètres contrôlés. Aussi, l'induction du blocage se fait *via* le contrôle de l'expression de Rtf1. Le gène *Rtf1* est soumis, à son locus endogène, au contrôle du promoteur *nmt41*, dont l'activité est modulée par la présence ou l'absence de thiamine. En présence de thiamine, le système est OFF : Rtf1 n'est pas exprimé, le blocage n'est pas induit. A l'inverse, en absence de thiamine, *nmt41* n'est plus réprimé, Rtf1 est exprimé et la barrière est activée : on est en condition RFB ON. Les levures portant le système *RTS1*-RFB sont donc conservées en présence de thiamine, qui n'est retirée que pour la mise en place d'un protocole expérimental. Lors du passage d'une condition RFB OFF à RFB ON, on observe un pic d'expression de Rtf1 16h après le retrait de la thiamine. Dans ce contexte, au sein de la population étudiée, 90% des fourches suivant le sens de réplication principal seront bloquées au site *RTS1*. Le système *RTS1*-RFB est un outil de choix pour modéliser un blocage de fourche, dont le lieu, la nature et l'induction pourront être définis et contrôlés.

Les fourches bloquées à *RTS1*-RFB pourront être activement redémarrées *via* la mise en place de la RH, ou sauvées par fusion avec les fourches convergentes ([Figure 51](#)). Divers essais génétiques ont été développés sur la base de l'utilisation de *RTS1*-RFB pour étudier l'intégrité et le devenir de la fourche bloquée. Parmi les techniques phares, on pourra citer le suivi du locus *in vivo* par microscopie grâce à un système rapporteur fluorescent à proximité ; l'étude du recrutement de facteurs protéiques à ce locus (par ChIP ou microscopie) ou encore l'analyse des intermédiaires de réplication par 2DGE ou électrophorèse sur gel bidimensionnelle (Ait Saada *et al.*, 2017; Hardy *et al.*, 2019; Kramarz *et al.*, 2020; Teixeira-Silva *et al.*, 2017). Ces diverses méthodes d'analyse

permettent l'étude des facteurs impliqués dans la résection, le redémarrage et la protection des fourches de réplication bloquées au locus *RTS1-RFB*.

3. Rôle des hybrides ARN:ADN à la *RTS1-RFB* ?

Le redémarrage par la RH survient 20min après le blocage au site *RTS1-RFB*, grâce à l'exposition d'ADNsb (Miyabe *et al.*, 2015; Nguyen *et al.*, 2015). Il est important de garder en tête que dans ce cas, les fourches ne sont pas forcément des fourches cassées. Les travaux d'une doctorante du laboratoire ont permis de mettre en évidence un processus de résection des brins naissants en deux étapes, régulé par la présence de Ku (Teixeira-Silva *et al.*, 2017). Ce modèle ressemble à celui des CDBs. Les fourches bloquées réversent, procurant une extrémité double-brin sur laquelle Ku peut se fixer. Le complexe MRN-Ctp1 permet l'éviction de Ku, ce qui promeut l'initiation de la résection sur environ 110pb. Cette résection est nécessaire et suffisante pour le recrutement et la nucléation de Rad51. Elle permet de plus de fournir un point d'entrée à Exo1, qui assure une résection plus extensive. En l'absence de Ku, les fourches réversées sont soumises à une dégradation incontrôlée par Exo1.

Les similarités observées entre la réparation des CDBs et le redémarrage des fourches par la RH conduisent à l'hypothèse attrayante de la présence transitoire d'hybrides ARN:ADN aux fourches de réplication bloquées. Dans un contexte de déficience en activité RNase H, des hybrides ARN:ADN ont d'ailleurs été visualisés autour du système *RTS1-RFB* activé (Naiman *et al.*, 2021).

Au cours de ma thèse, j'ai cherché à définir quel était l'impact de la stabilisation des hybrides ARN:ADN pour la mise en place du processus de redémarrage par la RH des fourches de réplication bloquées. J'ai donc exploré le rôle des enzymes RNase H au cours de ce processus. Enfin, je me suis attachée à définir quelle pouvait être l'origine de ces hybrides. Dans l'ensemble, ce travail met en lumière le rôle d'hybrides ARN:ADN formés de manière post-réplivative aux fourches de réplication bloquées, et aide à mieux comprendre les mécanismes moléculaires mis en place en réponse au stress répliatif.

RESULTATS

Les travaux produits durant cette thèse seront présentés en trois parties :

I. Publication #1

Les principaux résultats obtenus au cours de ma thèse sont décrits dans cette partie. Ils sont présentés sous forme d'article, intitulé : « *RNA:DNA hybrids from Okazaki fragment are cis-regulators of Ku function in safeguarding replication fork integrity* ».

II. Publication #2

Les questionnements abordés au cours de cette thèse m'ont amené à m'intéresser à l'impact d'une composante ARN dans la régulation des activités des facteurs de NHEJ, notamment pour le maintien de l'intégrité génétique en cas de stress réplcatif. Ces interrogations ont abouti à la rédaction d'une revue publiée dans *Trends in Genetics*, que je signe en première auteure. Cette revue intitulée : « *Non-homologous end-joining at challenged replication forks: an RNA connection ?* » sera présentée dans cette seconde section.

III. Résultats supplémentaires

Dans cette dernière partie, je présente quelques autres données générées au cours de ma thèse, complémentaires à la **publication #1**.

Publication #1

RNA:DNA hybrids from Okazaki fragment are cis-regulators of Ku function in safeguarding replication fork integrity

RNA:DNA hybrids from Okazaki fragments are *cis*-regulators of Ku function in safeguarding replication fork integrity

Charlotte Audoynaud^{1,2}, Anissia Ait Saada^{1,2*}, Paloma Fernández Varela^{3*}, Armelle Gesnik^{3*}, Virginie Boucherit^{1,2}, Virginie Ropars³, Karine Fréon^{1,2} Jean Baptiste Charbonnier³, Sarah AE Lambert^{1,2**}

1. Institut Curie, Université PSL, CNRS UMR3348, 91400 Orsay, France

2. Université Paris-Saclay, CNRS UMR3348, 91400 Orsay, Ligue Nationale Contre le cancer (équipe labélisée) France

3. Université Paris-Saclay, CEA, CNRS, Institute for Integrative Biology of the Cell (I2BC), 91198, Gif-sur-Yvette, France.

* Equal contribution.

** Corresponding author and lead contact: sarah.lambert@curie.fr

ABSTRACT

Non-homologous end-joining (NHEJ) factors act in replication fork protection, restart and repair. Here, we identified a novel RNA:DNA hybrid-related mechanism to overcome the NHEJ factor Ku-mediated barrier to nascent strand degradation, in fission yeast. RNase H activities promote nascent strand degradation and replication restart, with a prominent role of RNase H2 in processing RNA:DNA hybrids to engage physiological and pathological fork-resection. RNase H2 acts in a parallel pathway to MRN-Ctp1 to sustain cell resistance to replication stress, in a Ku-dependent manner. Mechanistically, RNase H2 allows bypassing the Ku-mediated barrier to initiate the short-range resection by processing the RNA primer of the unligated Okazaki fragment. Supporting Okazaki fragments being a source of RNA:DNA hybrids at reversed fork, Fen1, but not Senataxin, also promotes nascent strand degradation. Finally replication stress favors Ku binding to RNA:DNA hybrids, indicating a novel function for Okazaki fragments in controlling Ku-mediated barrier to safeguard fork integrity.

- Unprocessed RNA:DNA hybrid impairs the short-range resection of nascent strands
- RNA primers of Okazaki Fragments are sources of RNA:DNA hybrids at arrested forks
- Ku binds RNA:DNA hybrids *in vivo* upon replication stress
- RNase H2 overcomes Ku-mediated barrier by processing RNA:DNA hybrids

INTRODUCTION

A myriad of unavoidable replication fork obstacles threaten faithful DNA duplication (Zeman & Cimprich, 2014). As fork obstacles lead to stalling, collapse or fork breakage, they are direct sources of replication stress-induced genome instability, an underlying cause of human diseases and a well-recognized hallmark of most cancer cells (Gaillard *et al.*, 2015). Therefore, investigating the molecular circuits preserving genome integrity and replication competence at stressed replication forks is substantial to understand the etiology of human diseases.

Elongating transcription machineries are one type of fork obstacle causing fork arrest. Head-on collision upon transcription-replication conflict (TRC) triggers unscheduled R-loop formation, *i.e.* a triple-stranded structure composed of a co-transcriptionally formed RNA:DNA hybrid opposite to a displaced single-stranded DNA (ssDNA) (Crossley *et al.*, 2019; García-Muse & Aguilera, 2019). Head-on TRC activates ATR-dependent DNA damage-response (DDR) pathway and R-loops formed at TRCs are detrimental to genome stability maintenance (Hamperl *et al.*, 2017), although it remains unclear how the RNA:DNA hybrid itself and/or the stalled RNA polymerase contribute to fork stalling (Kemiha *et al.*, 2021). Nonetheless, several studies have established that a subset of R-loops is genotoxic (Costantino & Koshland, 2018; Promonet *et al.*, 2020).

RNA:DNA hybrids are also a consequence of double-strand break (DSB) repair (Marnef & Legube, 2020; Ohle *et al.*, 2016). Whereas the ways they originate at DSBs are still under debate, they are proposed to act as mediators of DSB repair and signaling (Domingo-Prim *et al.*, 2020; Pessina *et al.*, 2019). RNA:DNA hybrids modulate the activity of DNA repair machineries allowing the recruitment of DNA repair factors from the homologous recombination (HR) and non-homologous end-joining (NHEJ) pathways (Audouyoud *et al.*, 2021; Bhatia *et al.*, 2018; Dang & Morales, 2020; L. Li *et al.*, 2016; Michelini *et al.*, 2017; Sessa *et al.*, 2021). RNA:DNA hybrids have been also proposed to mediate RNA-templated DNA repair and to influence the fidelity of DSB repair by NHEJ (A. Chakraborty *et al.*, 2016; Zong *et al.*, 2020). However, it is also evident that RNA:DNA hybrids at DSBs are removed or degraded to allow the completion of DNA repair, requiring therefore the activity of RNA helicases such as Senataxin or RNase H activities (Cohen *et al.*, 2018; D'Alessandro *et al.*, 2018; L. Li *et al.*, 2016; Ohle *et al.*, 2016; Rawal *et al.*, 2020; Sessa *et al.*, 2021).

Protection, restart and repair of stressed replication forks is critical to genomic stability, giving rise to the identification of a diversity of fork rescue pathways, underscoring the

plasticity of the replication fork (Berti *et al.*, 2020). Error-free repair of replication-born DNA damage usually rely on the HR pathway to protect nascent strands from hyper-degradation and to resume DNA replication (Ait Saada *et al.*, 2018). Recent works support that NHEJ is active during DNA replication to repair stressed forks and to safeguard fork integrity (Audoynaud *et al.*, 2021). In both yeast and mammals, several NHEJ factors, such as Ku, XLF, RIF1 and 53BP1, are engaged at stalled or broken forks to act as anti-resection barriers, independently of their canonical function in NHEJ (B.-R. Chen *et al.*, 2019; Garzón *et al.*, 2019; Joshi *et al.*, 2019; W. Liu *et al.*, 2020; Miyoshi *et al.*, 2009; Sánchez & Russell, 2015; Teixeira-Silva *et al.*, 2017). Moreover, Ku binding at reversed or broken forks precedes HR activity, ensuring coordinated nascent strand degradation or Rad51 loading (Chanut *et al.*, 2016; Teixeira-Silva *et al.*, 2017). However, erroneous NHEJ events at halted forks trigger chromosomal rearrangements and therefore NHEJ-mediated fork processing is tightly regulated by mechanisms that remain poorly understood (Balmus *et al.*, 2019; Britton *et al.*, 2020).

Many RNA species are physiologically associated to DNA replication (Zong *et al.*, 2020). Ribonucleotides are frequently incorporated by replicative DNA polymerases generating thousands of DNA-embedded RNA species that are further removed by RNase H2 (Burgers & Kunkel, 2017; Lazzaro *et al.*, 2012). During Okazaki fragment (OF) synthesis on the lagging strand, the primase synthesizes RNA primers of 8-12 ribonucleotides in size, that are successively elongated by Pol α and δ (Balakrishnan & Bambara, 2013; Burgers & Kunkel, 2017). OF are therefore potential sources of RNA:DNA hybrids inherently associated to the DNA replication process. Whether such physiological RNA:DNA hybrids could be modulators of replication fork repair, as proposed for DSB repair, is currently unknown. In addition, RNAs are well-described *cis* and *trans*-modulators of NHEJ activity (reviewed in (Audoynaud *et al.*, 2021) but the role of RNA-associated DNA replication in regulating NHEJ function at replication stress sites has not been explored yet.

Here, we address the function of RNA:DNA hybrids during fork repair by taking advantage of a transcription-independent replication fork barrier (RFB) (Lambert *et al.*, 2005). We employed the previously described *RTS1*-RFB that allows the block of a single replisome by a DNA-bound protein complex. Forks arrested at the *RTS1*-RFB are restarted by an HR-dependent but DSB-independent mechanism called Recombination-Dependent Replication (RDR) (Lambert *et al.*, 2010; Mizuno *et al.*, 2013; Nguyen *et al.*, 2015). Nascent strand degradation by nucleases allows ssDNA gaps to form and recruit HR factors to promote replication restart (Tsang *et al.*, 2014). The

restarted fork is associated to a non-canonical DNA synthesis insensitive to the RFB (Iraqi *et al.*, 2012; Jalan *et al.*, 2019; Naiman *et al.*, 2021). We found that unprocessed RNA:DNA hybrids at the RFB prevent the degradation of nascent strands and replication restart. Nascent strand degradation relies on the catalytic activity of RNase H2 to overcome the NHEJ factor Ku-mediated barrier. We propose that the unprocessed primer of the last synthesized OF is embedded in the reversed fork, triggering RNA:DNA hybrids formation on which Ku can bind, revealing that RNA:DNA hybrids from OF play a regulatory function in safeguarding fork integrity.

RESULTS

Unresolved RNA:DNA hybrids at arrested fork impair nascent strand degradation.

RNA:DNA hybrids were shown to accumulate both upstream and downstream of the *RTS1*-RFB during S-phase (Naiman *et al.*, 2021). To investigate the dynamics of those RNA:DNA hybrids, we performed real-time microscopy. We asked how frequently the catalytic-dead form of RNase H1 fused to GFP (Rnh1-D129N-GFP), used to detect RNA:DNA hybrids (Chédin *et al.*, 2021), co-localizes with the *LacO*-marked RFB which nuclear positioning is visualized by mCherry-LacI foci (Figure S1A). RNA:DNA hybrids significantly accumulated in S-phase cells upon activation of the RFB (in 48% of cells in RFB ON versus 30% in RFB OFF, $p < 0.005$) compared to control conditions (Figure S1B-C). Most of the co-localization events lasted for less than 40s, suggesting a short-life time and fast processing of RNA:DNA hybrids (Figure S1D). We thus questioned the origin of those RFB-induced RNA:DNA hybrids and their potential influence on fork repair.

As reported (Ohle *et al.*, 2016; H. Zhao *et al.*, 2018), the lack of RNase H1 and H2 activities result in cell sensitivity to replication blocking agents and accumulation of RNA:DNA hybrids (Figure S2A-B). Thus, we investigated the role of RNase H1 and H2 in promoting replication resumption at the RFB. The absence of RNase H1 and H2 led to a 2-fold reduction in the frequency of replication slippage occurring downstream the RFB, a mutational signature left by HR-mediated restarted forks (Iraqi *et al.*, 2012; Jalan *et al.*, 2019), indicating a reduced RDR efficiency (Figure 1A-B). By analyzing the replication intermediates (RIs) by bi-dimensional gel electrophoresis (2DGE), the formation of large ssDNA gaps (>100 bp) at the RFB resulted into a specific "tail" DNA structure, emanating from arrested fork signal and descending toward the linear arc (red arrow on Figure 1C) (Ait Saada *et al.*, 2017; Teixeira-Silva *et al.*, 2017). The absence of RNase H1 and H2 led to the disappearance of the "tail" signal with the RNase H2

defect being mainly responsible for this phenotype (Figure 1C-D and S2C). This lack of ssDNA gap can be caused either by the need to process RNA:DNA hybrids to engage nascent strand degradation or by an accumulation of de novo RNA:DNA hybrids, in a post-resection manner, as previously proposed (S. Liu *et al.*, 2021; Ohle *et al.*, 2016). To distinguish between these two hypotheses, purified RIs were treated with RNase H1 in vitro before resolution by 2DGE. We reasoned that if ssDNA gaps are masked by de novo RNA:DNA hybrids in vivo, their processing in vitro should restore the “tail” signal. In contrast, if RNA:DNA hybrids need to be processed in vivo to engage nascent strand resection, the “tail” signal should not be restored. Most RNA:DNA hybrids co-eluted with the ssDNA-enriched fraction and were fully eliminated upon RNase H1 treatment (Figure 1E), without affecting the intensity of the “tail” signal in wild type (WT) and *rnh1* · *rnh201* · cells (Figure 1F), supporting the hypothesis that unprocessed RNA:DNA hybrids at arrested fork impair nascent strand degradation in vivo. RNase H2 is involved in the processing of RNA:DNA hybrids and promotes ribonucleotide excision repair (RER) (Nava *et al.*, 2020). The *Rnh201-G72S*, an analogous Aicardi-Goutières patient mutation, is a nearly catalytic-dead form of RNase H2 (Chon *et al.*, 2013; Crow *et al.*, 2006; Rohman *et al.*, 2008). This mutation did not lead to major accumulation of RNA:DNA hybrids nor sensitivity to replication stress when combined with *rnh1* deletion (Figure S2A-B), but it exhibited defect in nascent strand degradation (Figure 1C-D). In contrast, the *Rnh201-RED* mutant that is specifically defective for the excision of mono and di-ribonucleotides (Chon *et al.*, 2013) showed neither accumulation of RNA:DNA hybrids nor defective nascent strand degradation (Figure 1C-D and S2B). Of note, *rnh201-red* conferred a slight sensitivity to hydroxyurea when combined with *rnh1* deletion (Figure S2A), consistent with a higher incorporation of ribonucleotides during replication under dNTP pool starvation and cell survival relying on RER pathway (Cerritelli & El Hage, 2020; Meroni *et al.*, 2019). Since RNase H2 is also involved in the hyper-resection of arrested forks observed in the absence of Rad3^{ATR} (Figure 1G) (Tsang *et al.*, 2014), we concluded that the ability of RNase H2 to process RNA:DNA hybrids promotes physiological and pathological nascent strand degradation.

RNase H2 counteracts Ku-mediated barrier to nascent strand degradation.

The degradation of nascent strand is a two-step process with a short-range resection mediated by the MRN (Mre11-Rad50-Nbs1)-Ctp1 axis generating ~ 110 bp sized gaps that are obligatory for subsequent Exo1-mediated long-range resection (Teixeira-Silva *et al.*, 2017). Ku binding to reversed fork restricts Exo1 activity and MRN-Ctp1 promotes

Ku eviction to engage the long-range resection. The profile of RPA binding downstream the RFB in *rnh201Δ* cells revealed that RNase H2 acts during the short-range resection (Figure 2A). Genetic analysis revealed that defect in both RNase H2 and Rad50, or Ctp1, led to synthetic lethality upon treatment with replication-blocking agents (Figure 2B and S3A). This synthetic lethality was dependent on the catalytic activity of RNase H2 but partly alleviated when RNase H2 retains its ability to process RNA:DNA hybrids (Figure 2C). Furthermore, this synthetic lethality was fully dependent on Ku (Figure 2B and S3A), revealing that the ability of RNase H2 to process RNA:DNA hybrid acts in a parallel pathway to MRN-Ctp1 axis to overcome Ku function during replication stress. To gauge this function, we asked if RNase H2 counteracts Ku-mediated barrier to nascent strand degradation. The analysis of the “tail” signal revealed that in the absence of Ku, nascent strand degradation is independent of RNase H2 while remaining Exo1 dependent (Figure 2D-E), similarly to MRN-Ctp1 axis defect (Teixeira-Silva *et al.*, 2017). Furthermore, MRN-Ctp1 axis also mediates Ku eviction from replication-born DNA damage, a function not shared by RNase H2. Indeed, Pku80-GFP foci accumulated in *rad50Δ* cells upon 4 hours of CPT treatment but such accumulation did not occur in *rnh201Δ* cells and was not exacerbated in the double mutant (Figure 3A-B) (Jones & Forsburg, 2021). Since topoisomerase I inhibition by CPT can result in single ended DSB, we analyzed Pku80-GFP localization to the *LacO*-marked RFB and obtained similar data (Figure 3C-D), supporting that RNA:DNA hybrid processing by RNase H2 at arrested fork offers an entry point for Exo1 activity, while Ku eviction relies on MRN-Ctp1 axis. We previously reported that the nuclease activity of MRN is dispensable to overcome Ku-mediated barrier to nascent strand degradation (Teixeira-Silva *et al.*, 2017), raising the possibility that RNase H2 may compensate for this. Nonetheless, no synthetic lethality was observed when combining *rnh201* deletion with a nuclease dead allele of *mre11* (*mre11-D65M*) neither a more drastic defect in nascent strand degradation at the RFB (Figure S3B-C).

Lack of RNase H activities do not impair fork reversal at the RFB

In human cells, reversed fork is an entry point for nuclease activities to promote nascent strand degradation and would provide a double-stranded DNA end for Ku binding (Berti *et al.*, 2020; Lemaçon *et al.*, 2017; Mijic *et al.*, 2017). Unresolved RNA:DNA hybrids at arrested fork may prevent fork reversal and thus nascent strand degradation. To explore this, we investigated the formation of reversed fork at the RFB. We exploited that, following restriction digestion, reversed fork would release a linear DNA fragment specific to the regressed arm, whose length corresponds to the distance between the site of fork arrest and the first restriction site upstream the RFB (Figure 4A) (Neelsen &

Lopes, 2015). First, we employed a construct for which the expected size of the reversed arm is of 1.1 Kb in a *rad50Δ exo1Δ* background to avoid its degradation. After RIs enrichment and resolution by 1DGE, we detected signals corresponding to the monomer (M), the arrested fork (AF) and a linear fragment of ~1.1 Kb (RA) (Figure 4B, left panel). This last signal was restricted to RFB ON condition and detected exclusively when using a probe specific to the reversed arm (compare red and black probes), consistent with fork reversal occurring at the active RFB. Similar results were obtained with a construct for which the expected size of the reversed arm is of 3 Kb. Consistent with this linear fragment corresponding to the reversed arm, it migrated as a smear in WT cells in which nascent strand degradation occurs (Figure 4B, right panel). Reversed fork is an X-shaped DNA structure detectable by 2DGE as a diagonal spike emanating from arrested fork signal (Neelsen & Lopes, 2015). To date, such signal was undetectable in our 2DGE blots when using restriction enzyme cutting 1.1 Kb away from the RFB, possibly cutting the reversed arm leading to the loss of the X-shaped structure. To relieve this effect, we performed 2DGE using restriction enzyme cutting 3 Kb upstream the RFB and observed an X-shaped structure emanating from fork arrest signal in a *rad50Δ exo1Δ* cells but not in WT cells (Figure 4C), consistent with fork reversal undergoing nascent strand degradation and thus disappearing from a X-shaped structure.

Breakage of the arrested fork would similarly result in the detection of the observed linear fragment. To exclude this possibility, we analyzed the dynamics of the linear fragment during cell cycle. Because of difficulties in getting well-synchronized population in a *rad50Δ exo1Δ* cells, we shifted to the single *exo1Δ* mutant in which the reversed arm, while moderately resected, was detectable by 1DGE (Figure 4D). The reversed arm appeared and disappeared concomitantly to the AF signal during S-phase progression and was not persistent in G2 cells, indicating similar kinetics resolution. While the repair of a broken arm would rely on the HR pathway, the intensity of the linear fragment in *rad51Δ* or *rad52Δ* cells was not significantly different from WT cells (Figure S4). We also excluded the hypothesis that the linear fragment resulted from Mus81-dependent fork cleavage (Figure S4) (Froget *et al.*, 2008; Hanada *et al.*, 2007). Altogether, the linear fragment exhibited hallmarks of a reversed arm, consistent with arrested fork undergoing fork reversal at the RFB. The lack of RNase H2 or both RNase H activities did not impact the intensity of the reversed arm (Figure 4G) revealing that fork reversal was not impaired by unresolved RNA:DNA hybrids at the RFB and placing RNase H2 function downstream fork remodeling to overcome Ku-mediated barrier to nascent strand degradation.

RNA primer from Okazaki fragment is an RNase H2 substrate at arrested fork

To address the origin of RNA:DNA hybrids at arrested forks making RNase H2 necessary to engage nascent strand degradation, we focused on Okazaki fragment (OF) metabolism as recurrent synthesis of RNA primer on the lagging strand is a source of RNA:DNA hybrids coupled to DNA replication (Burgers & Kunkel, 2017). We made use of the *spp1-4*, a temperature-sensitive allele of the primase catalytic subunit leading to unstable Pol α -primase complex that is thus less efficient in synthesizing optimal RNA primer size (Griffiths *et al.*, 2001). This allele restored nascent strand degradation at the RFB in the absence of RNase H2 at 32°C, but not at 25°C (Figure 5A-B). In addition, RPA binding behind the RFB was improved in *spp1-4 rnh201 Δ* cells compared to *rnh201 Δ* cells (Figure 5C). Hence, shortening RNA primer length bypasses RNase H2 requirement in promoting nascent strand degradation supporting that OF synthesis generates RNA:DNA hybrids processed by RNase H2 at reversed forks. Furthermore, we asked if alteration in OF processing impairs nascent strand degradation. As opposed to a defect in Sen1, an RNA helicase involved in R-loop processing (Cohen *et al.*, 2018; Rawal *et al.*, 2020; San Martin-Alonso *et al.*, 2021), a defect in Fen1 (*i.e.* *rad2 Δ*), a prominent OF maturation factor, resulted in a reduced "tail" signal in a Ku-dependent manner (Figure 5D-E), reinforcing the notion that OF plays a pivotal role in regulating nascent strand degradation by modulating Ku-mediated barrier.

Ku binds to OF *in vitro* and to RNA:DNA hybrids *in vivo* upon replication stress

Collectively, our data led us to hypothesize that the reversed arm embeds the last unligated OF being annealed to its complementary nascent leading strand, making RNase H2 necessary to process the resulting RNA:DNA hybrid to offer an entry point to Exo1 activity, thus counteracting Ku-mediated barrier to nascent strand degradation. This model implies that Ku binds to RNA:DNA hybrids. In CPT (4 hours, 20 μ M) treated cells, immuno-precipitated Pku70-HA associated with RNA:DNA hybrids, as revealed with the S9.6 antibody. No S9.6 signal was enriched in control strains and untreated condition (Figure 6A). Such Ku-RNA:DNA hybrids interaction did not result from an higher expression of Pku70-HA upon CPT treatment (Figure 6B). To gauge if RNA:DNA hybrids are direct substrates of Ku, we investigated the interaction of purified *S. pombe* Ku (SpKu) with RNA:DNA hybrids by biophysical methods. We co-expressed *S. pombe* Pku70 and Pku80 in insect cells and purified the complex at homogeneity in large quantity for calorimetry analyses (Figure S5A). We first measured the affinity of SpKu for double-strand DNA (dsDNA), the classical DNA substrate of Ku in canonical NHEJ and measured a K_d of 0.41 \pm 0.27 nM (Figure 6C and Figure S5B). This represents a slightly higher affinity compared to the affinity measured by calorimetry with human

Ku and the same DNA substrate (Nemoz *et al.*, 2018). We then designed a substrate that mimics an OF substrate. We hybridized a single-strand DNA, 18 nucleotides long and labelled with a biotin in 5', with a molecule containing 10 ribonucleotides in 5' followed by 8 deoxyribonucleotides (Figure 6D, left panel). We measured an interaction with a tight affinity, K_d of 4.0 ± 1.3 nM, similar to the one measured between human Ku and dsDNA (Figure 6C). We repeated the titration in presence of streptavidin to block the access opposite to the ribonucleotide part that may serve as an entry point for Ku in the experiment. The affinity observed was in the same range, K_d of 5.8 ± 2.9 nM, indicating that SpKu interacts tightly *in vitro* with OF substrates (Figure 6C-D, middle panel). To evaluate the influence of the size of the ribonucleotide part, we perform an experiment with a longer ribonucleotide region (18nt). We observed a weaker affinity (K_d of 77 ± 4 nM) with this last substrate suggesting that, beyond a certain length, the structure of the RNA:DNA hybrid molecule is less favorable for the interaction with SpKu (Figure 6C-D, right panel). We cross-validated these calorimetry results with EMSA analyses that show a similar interaction between dsDNA and a substrate containing an OF (Figure S5C). Overall, we concluded that RNA:DNA hybrids are physiological substrates for Ku binding in response to replication stress and that Ku is able to bind substrates mimicking OF *in vitro*.

DISCUSSION

Collectively, this study uncovers a novel RNA:DNA hybrid-related mechanism to counteract Ku-mediated barrier to nascent strand degradation. RNA primers originating from OF synthesis are embedded in the reversed arm of reversed fork, creating a substrate for Ku binding and specifying nuclease requirement to engage fork resection. Coordinated action of MRN-Ctp1 axis and RNase H2 promotes Ku eviction and RNA:DNA hybrids degradation, respectively, allowing Exo1 to degrade nascent strands. This RNA:DNA hybrid-based mechanism contributes to safeguard fork integrity and timely replication resumption, revealing novel function for DNA-embedded RNA species in maintaining genome stability.

Several individual NHEJ factors are involved in fork protection, in repairing replication-induced DSBs and in restarting replication fork (Audouyoud *et al.*, 2021). RIF1, 53BP1 and Ku have been proposed to act as barrier against nascent strand degradation and thus to contribute to fork protection (Garzón *et al.*, 2019; W. Liu *et al.*, 2020; Mukherjee *et al.*, 2019; Teixeira-Silva *et al.*, 2017). In human cells, the lack of NHEJ-mediated fork protection results in delayed fork restart leading to under-replicated DNA, chromosome breakage and genome instability. Similarly, in fission yeast, Ku binding to

arrested forks is necessary for recovery from replication stress by promoting timely fork restart and fork protection (Naiman *et al.*, 2021; Teixeira-Silva *et al.*, 2017), underscoring the importance of regulating NHEJ-mediated fork protection pathways. RNAs are known *cis* and *trans*-modulators of NHEJ activity, in particular during DSB repair (Audouyoud *et al.*, 2021). Here, we propose that RNA:DNA hybrids are novel *cis*-regulators of Ku function at reversed forks to protect nascent strands from unscheduled degradation. Beyond the RTS1-RFB scenario, we establish that Ku binds RNA:DNA hybrids upon replication stress and substrates mimicking OF. Moreover, defects in RNase H2 and MRN lead to synthetic lethality upon replication stress, in a Ku-dependent manner. The synthesis of OF on the lagging strand is a recurrent source of RNA:DNA hybrids associated to DNA replication. Shortening RNA primers during OF synthesis bypasses RNase H2 requirement to overcome Ku-mediated barrier to nascent strand degradation. In human cells, two pathways of replication fork protection were identified providing distinct nuclease substrates and engagement of distinct fork protection factors (W. Liu *et al.*, 2020). We speculate that the presence of the last unprocessed OF, embedded as RNA:DNA hybrid within the reversed arm of the reversed fork, may provide substrate specificity for nucleases and Ku binding. In this scenario, overcoming Ku-barrier would require nucleases able to process RNA:DNA hybrids from OF such as RNase H2 and Fen1. Of note, RIF1 and 53BP1 promote fork-protection by counteracting DNA2-dependent resection, a nuclease previously involved in OF processing (Garzón *et al.*, 2019; W. Liu *et al.*, 2020; Mukherjee *et al.*, 2019).

At DSBs, short and long-range resection are coordinated by a complex interplay between Ku and MRN-CtIP^{Ctp1}, with Ku being an early responder to restrict the long-range resection (Reginato & Cejka, 2020). In both fission yeast and mammalian cells, Ku eviction from DSB ends depends on MRN-CtIP^{Ctp1} and Mre11 nuclease activity (Chanut *et al.*, 2016; Langerak *et al.*, 2011). Recently, Ku protein block was proposed to stimulate Mre11-mediated initial endonucleolytic cleavage of 5'-terminated DNA strands, promoting a switch toward short-range resection (Reginato *et al.*, 2017). In yeasts, MRN promotes nascent strand degradation at the *RTS1*-RFB and stalled forks, in a nuclease-independent manner (Delamarre *et al.*, 2020; Teixeira-Silva *et al.*, 2017). The presence of RNA:DNA hybrids within the reversed arm constitutes an additional level of complexity in the understanding of MRN and Ku antagonism in controlling fork-resection. One hypothesis is that MRN-Ctp1 is inefficient in promoting 5' incision of RNA:DNA hybrids, as previously suggested (Chang *et al.*, 2019), requiring additional nuclease activity to promote long-range resection. We found that RNase H2 and Fen1 overcome Ku-mediated barrier to Exo1 activity. By processing RNA:DNA hybrids, they

likely provide nicks used as an entry point for Exo1 activity while Ku remains bound to reversed forks (W. Wang *et al.*, 2018). In such a scenario, Ku eviction remains dependent on MRN-Ctp1 but independent of Mre11 nuclease activity, a mechanism that remains to be understood. Moreover, in the absence of RNase H2 and Ku, nascent strand degradation depends on Exo1, suggesting that Exo1 is able to process the RNA moiety of RNA:DNA hybrids. In vitro, Exo1 can degrade RNA:DNA hybrids containing up to 10 consecutive ribonucleotides, but not 15 (Daley *et al.*, 2020). RNA primer during OF synthesis ranges from 8 to 12 ribonucleotides (Burgers & Kunkel, 2017) raising the possibility that Exo1 can process them, unless additional nucleases are acting at RNA:DNA-hybrid-containing reversed forks.

Mutations in any of the 3 subunits of RNase H2 account for more than half of the Aicardi-Goutières syndrome (AGS) cases, an autoimmune genetic disorder characterized by an upregulation of type I interferon (IFN) expression and microcephaly (Crow *et al.*, 2006). To date, the molecular tenants of this pathology are still unclear. Another gene frequently mutated in AGS is SAMHD1 that has been recently involved in nascent strand degradation at HU-stalled forks in human cells (Coquel *et al.*, 2018). Mechanistically, SAMHD1 stimulates the exonuclease activity of MRE11 to allow replication restart. In SAMHD1-depleted cells, alternative processing of stalled forks by RECQ1 leads to ssDNA accumulation in the cytoplasm that in turn triggers cGAS-STING pathway activation and IFN production. Our work establishes that fission yeast RNase H2 also contributes to fork-resection, further linking AGS to defect in nascent strand degradation and fork restart. Patient-derived AGS cells carrying defect in RNase H2 exhibit signs of replication stress and chronic activation of the DDR, in particular of the post-replication repair pathway (Pizzi *et al.*, 2015). So far, these cellular phenotypes were linked to the accumulation of ribonucleotides by replicative DNA polymerases and RER defect, a known pathway of genome instability (Nava *et al.*, 2020). Our study provide evidences that RNA:DNA hybrids processing by fission yeast RNase H2 is critical to nascent strand degradation, acting in a parallel pathway to MRN-Ctp1 to deal with replication stress and overcome Ku function. We speculate that in the absence of human RNase H2, alternative processing of stalled forks may trigger cytosolic DNA accumulation. Interestingly, human Ku is a cytosolic DNA sensor that induces type III IFN response to promote proliferation and activation of aged lymphocytes T, favoring auto-immunity (Y. Wang *et al.*, 2021; Wu & Yan, 2021). Collectively, these knowledge indicate that the ability of RNase H2 to process RNA:DNA hybrids at arrested fork to overcome Ku-mediated barrier to nascent strand degradation could be relevant to pathological situations.

The role of DNA-embedded RNAs species in regulating fork repair has received little attention so far. We establish that RNA:DNA hybrids embedded in reversed forks and originating from OF are novel cis-regulators of Ku function to maintain replication fork integrity. We uncover a role for RNA:DNA in dictating requirement for specific dismantling activities to ensure proper replication fork restart. We do not exclude that additional replication stress-induced RNA:DNA hybrids may be at work at replication stress sites to regulate DNA repair pathway and maintain genome integrity.

ACKNOWLEDGEMENTS

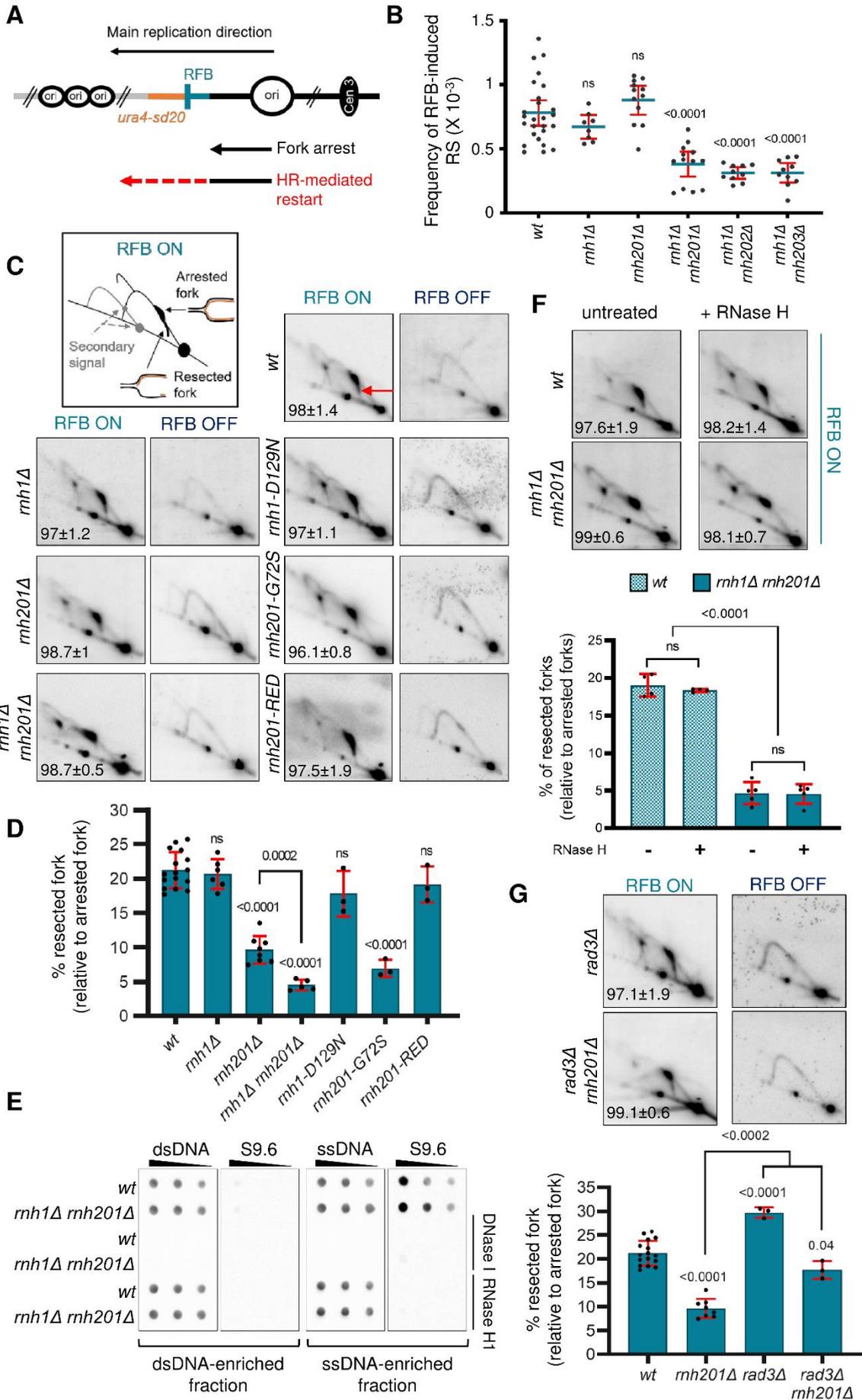
The authors thank Vincent Vanoosthuyse, Antony Carr and Theresa Wang for exchanging strains and reagents, A. Bourand-Plantefol (I2BC, Gif surYvette) for protocol for EMSA, the I2BC platform for Protein Interactions and French Infrastructure for Integrated Structural Biology (FRISBI) ANR-10-INBS-0005 for access to calorimetry. We also thank the PICT-IBiSA@Orsay Imaging Facility of the Institut Curie and the Flow Cytometry Facility of the Orsay site of Institut Curie. We thank Stephan Vagner for his helpful comments on this work. This study was supported by grants from the Institut Curie, the CNRS, the Fondation LIGUE "Equipe Labellisée 2020" (EL2020LNCC/Sal), the ANR grant REDEFINE (ANR-19-CE12-0016-03) to SAEL. JBC is supported by grants from ANR-18-CE44-0008, ANR-CE12-17-0020, ANR-20-CE11-0026. C.A. was funded by a French governmental fellowship and a fourth-year PhD grant from Fondation ARC. The funders had no role in study design, data collection and analysis, the decision to publish, or preparation of the manuscript.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

CA and KK performed the experiments on Figure 1, 2, 3, 5, 6 A-B, S1, S2, S3. AAS and VB performed the experiments of Figure 4 and S4. PFV, AG and VR performed the experiments on Figure 6 C-D and S5. CA, JBC and SAEL contributed to experimental design and data analysis and presentation. CA and SAEL wrote the manuscript. JBC and SAEL edited the manuscript.

DECLARATION OF INTEREST

The authors declare no competing interests.



FIGURES

Figure 1: RNase H2-mediated processing of RNA:DNA hybrid engages nascent strand degradation.

(A) Diagram of the *t-ura4sd20<ori* construct containing a single *RTS1*-RFB (<, blue bars) that leads to the polar arrest of replisomes traveling from the centromere (Cen3) toward the telomere (t). "Ori" (black circles) indicate the main replication origins upstream and downstream the RFB. Polar fork arrest is mediated by the binding of Rtf1 to the *RTS1* sequence. Rtf1 expression is under the thiamine-repressible *nmt41* promoter: with thiamine, Rtf1 is repressed and the RFB is poorly active (RFB OFF); without thiamine, Rtf1 is expressed and the RFB is strongly active (RFB ON). The non-functional *ura4-sd20* allele contains a 20 nt duplication flanked by micro-homology. HR-mediated restart is associated to a non-canonical DNA synthesis prone to frequent replication slippage (RS) leading to the deletion of the duplication, thus restoring a functional *ura4⁺* marker (Iraqi et al., 2012).

(B) Frequency of RFB-induced RS in indicated strains and conditions. Each dot represents one sample from independent biological replicate. Bars indicate mean values \pm 95 % confidence interval. Statistics were calculated using Mann-Whitney U test, compare to *WT*.

(C) RIs analysis by neutral-neutral 2DGE. Top left: Scheme of RIs observed within the *AseI* restriction fragment in RFB ON condition using *ura4* as probe. Gray lines indicate secondary signal caused by partial digestion of psoralen-cross linked RIs. Left and right: representative 2DGE analysis in indicated strains and conditions. The red arrow indicates the "tail" signal in *WT* strain. Numbers indicate the efficiency of the RFB \pm standard deviation (SD).

(D) "Tail" quantification from panel C. Dots represent values obtained from independent biological replicates. Bars indicate mean values \pm SD. Statistical analysis was performed using student's t-test, compared to *WT*.

(E) Separation of digested and psoralen-cross linked DNA samples on BND-cellulose columns resulted in a dsDNA and a ssDNA-enriched fractions which were treated *in vitro* with RNase H1 or DNase I and analyzed by dot blot using anti-dsDNA (dsDNA), anti-ssDNA (ssDNA) and S9.6 antibodies.

(F) Resolution of RNase H1-treated RIs by 2DGE. Top panels: representative 2DGE analysis in indicated strains and RFB ON condition as described in C. Bottom panel: "tail" quantification as described in D.

(G) Top panels: representative 2DGE analysis in indicated strains and conditions as described in C. Bottom panel: "tail" quantification as described in D.

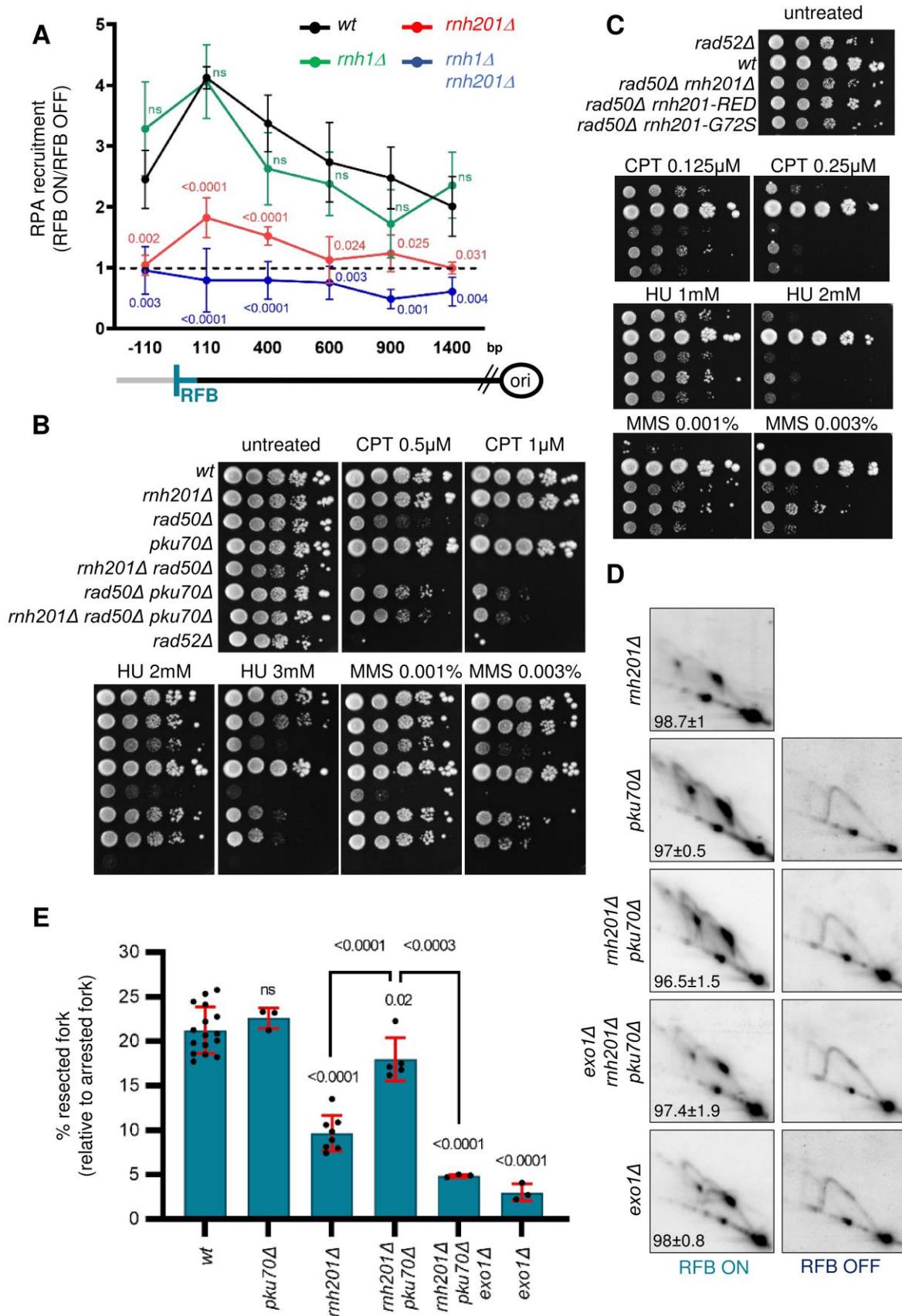


Figure 2: RNase H2 acts synergistically with MRN to overcome Ku-mediated barrier to resection.

(A) Analysis of RPA recruitment (OFF/ON ratio) to the *RTS1*-RFB by ChIP-qPCR in indicated strains. Distances from the RFB are indicated in base pairs (bp). Values are means of at least three independent experiments \pm SD. Statistical analysis was performed using student's t-test, compared to *WT*.

(B) and (C) Tenfold serial dilutions of indicated strains on indicated media conditions (CPT: camptothecin, HU: hydroxyurea, MMS: methyl methane sulfonate).

(D) Representative 2DGE analysis in indicated strains and conditions as described in Figure 1C.

(E) "Tail" quantification of panel D as described in Figure 1D.

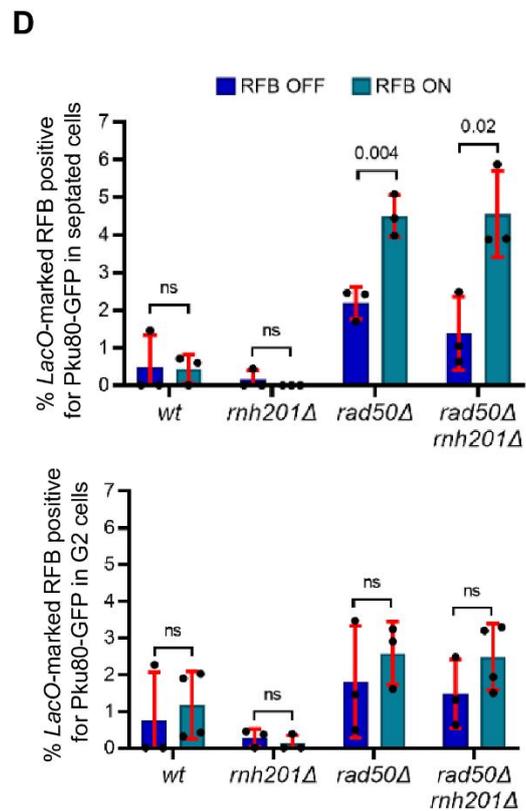
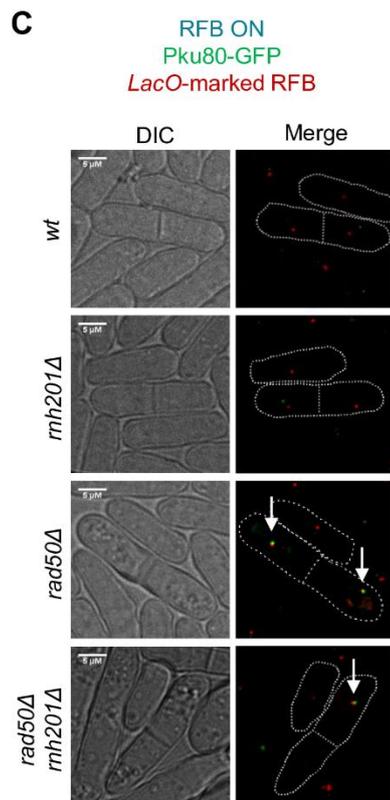
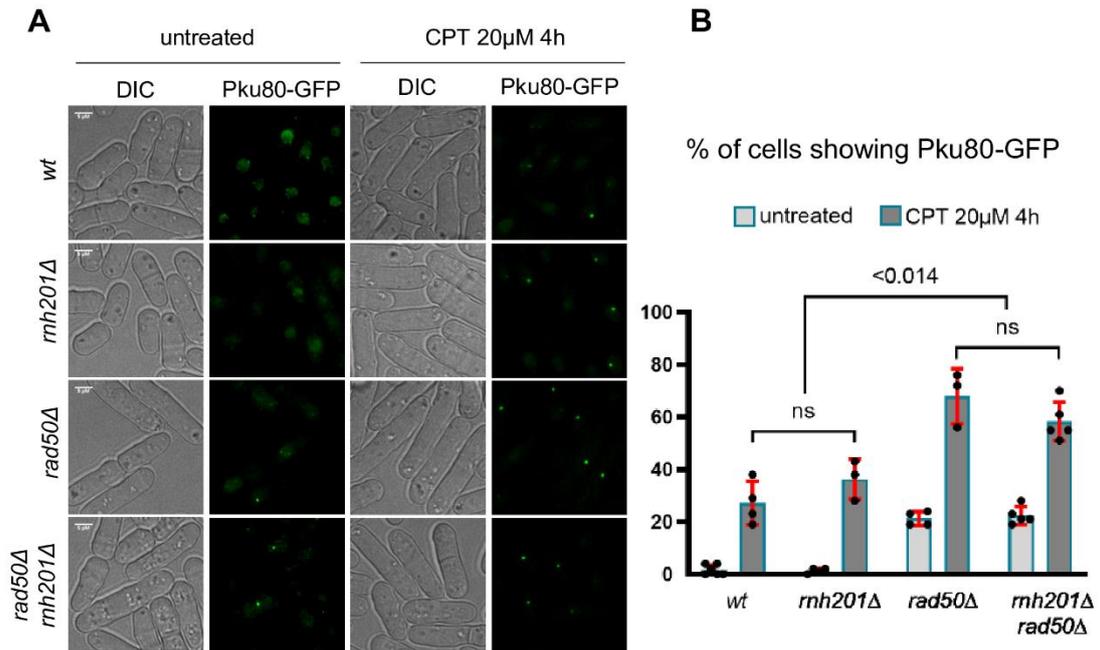


Figure 3: Ku eviction from replication-born DNA damage is RNase H2 independent.

(A) Examples of cells showing Pku80-GFP foci in indicated strains and conditions (CPT at 20 μ M for 4 hours).

(B) Quantification of panel A. Dots represent values obtained from independent biological replicates. Bars indicate mean values \pm SD. Statistical analysis was performed using student's t-test.

(C) Examples of Pku80-GFP (green foci) co-localizing with the LacO-marked RFB (visualized by LacI-mCherry dot). White arrows indicate co-localization events.

(D) Quantification of panel C. Dots represent values obtained from independent biological replicate. Bars indicate mean values \pm SD. Statistical analysis was performed using student's t-test.

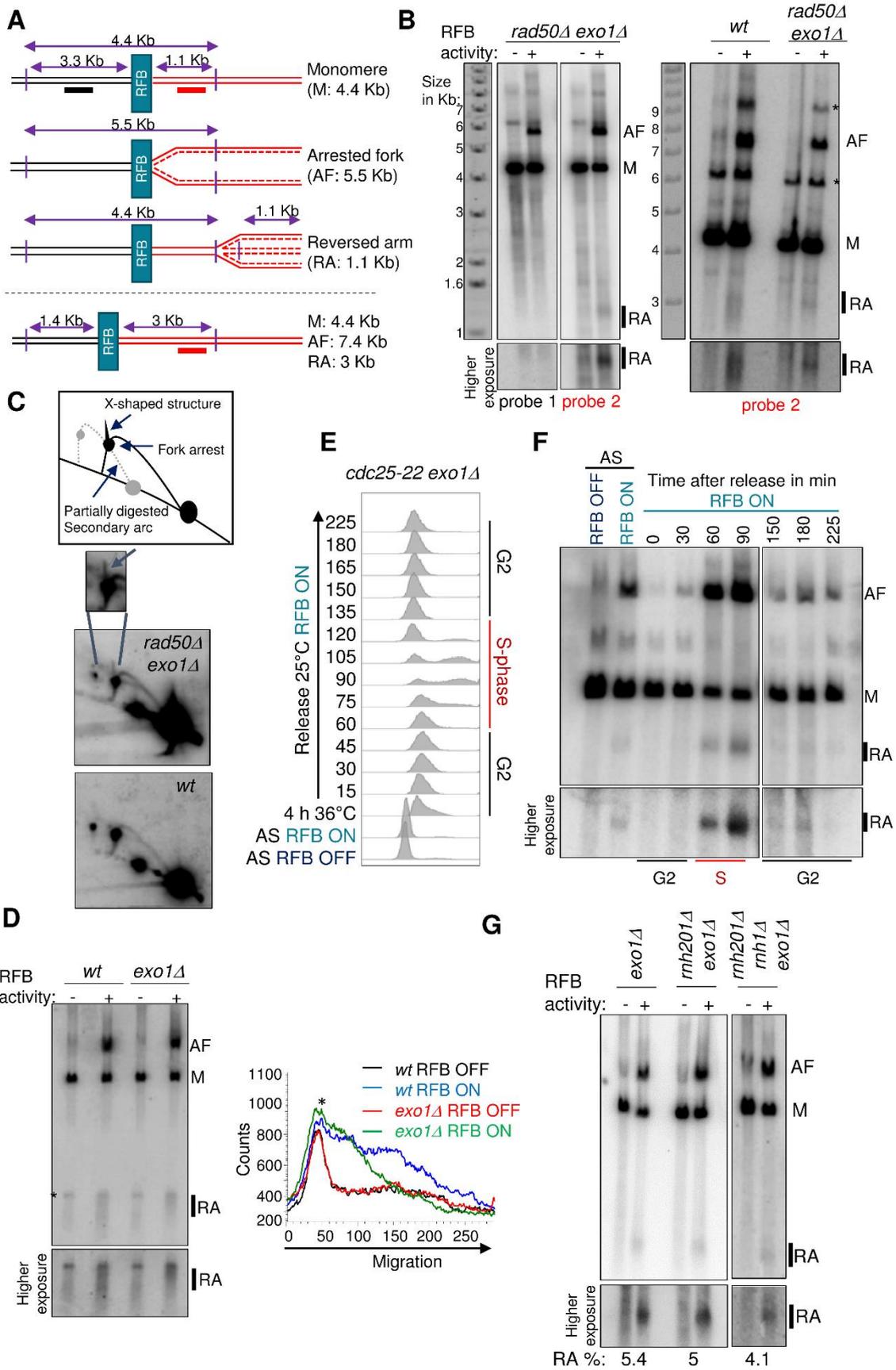


Figure 4: Fork reversal at the RFB is not impaired by unresolved RNA:DNA hybrids

(A) Scheme of the constructs used with the expected mass of RIs species and the probes used (Probe 1 and 2 in black and red, respectively).

(B) Representative Southern-blot analysis after 1DGE resolution of RIs in indicated strains and conditions, using indicated probes. A higher exposure of the RA is shown. * indicates partial digestion caused by psoralen-crosslinks. 1.1 Kb-RA and 3 Kb-RA constructs, as described in panel A, on left and right, respectively.

(C) Top panel: Scheme of RIs observed within the *AseI* restriction fragment in RFB ON condition using the probe 2 (red) and the 3 Kb-RA construct described in panel A. Gray lines indicate secondary signal caused by partial digestion of psoralen-cross linked RIs. Bottom: representative 2DGE analysis in indicated strains in RFB ON condition.

(D) Left panel: Representative Southern-blot analysis after 1DGE resolution of RIs in indicated strains and conditions, using the probe 2 (red) and the 1.1 Kb-RA construct described in panel A. Right panel: corresponding scan lines of RA intensity according to migration distance for each strain and condition. The unspecific band marked by * was used as reference.

(E) Flow cytometry analysis of *cdc25-22 exo1Δ* cells synchronized in G2 (4hours at 36°C) and released in cell cycle at 25°C in RFB ON condition. Time points are indicated in minutes. AS: asynchronous cells.

(F) Representative Southern-blot analysis after 1DGE resolution of RIs from cell synchronization described in panel E, using the probe 2 (red) and the 3 Kb-RA construct described in panel A.

(G) Representative Southern-blot analysis after 1DGE resolution of RIs in indicated strains and conditions using the probe 2 (red) and the 1.1 Kb-RA construct described in panel A. Number indicate the estimation of % RA relative to arrested fork (AF) signal.

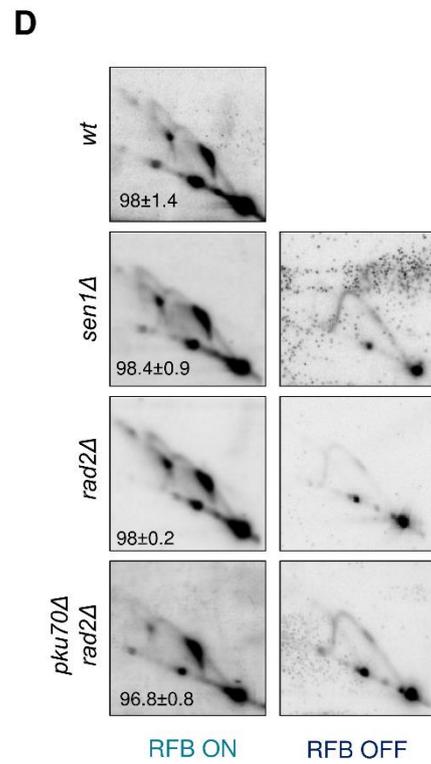
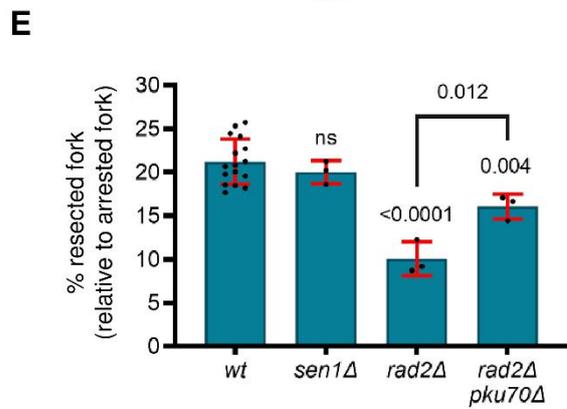
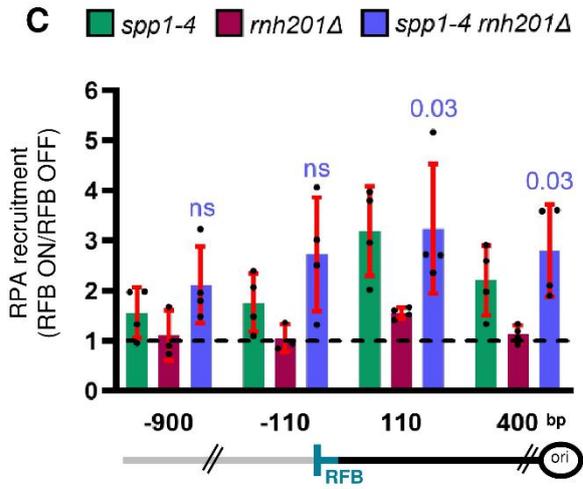
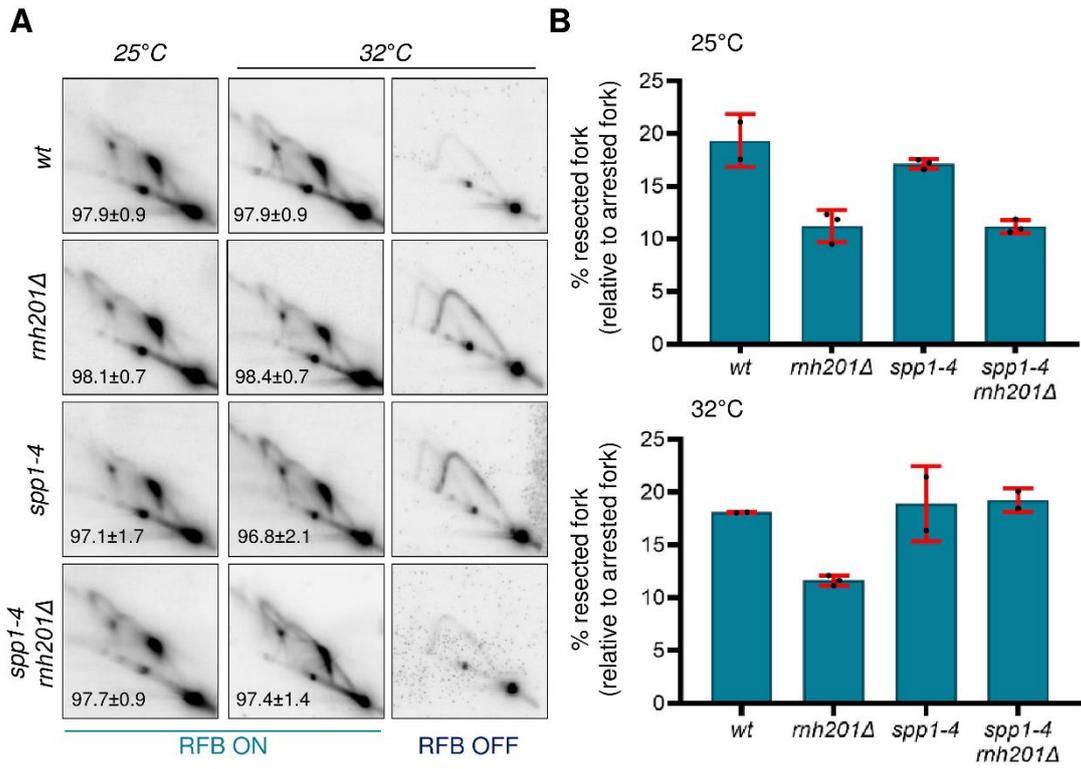


Figure 5: RNA:DNA hybrids from Okazaki fragments are substrates of RNase H2 at the RFB.

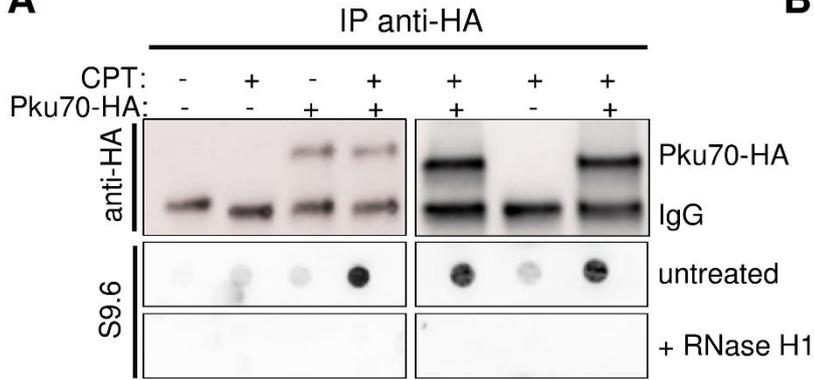
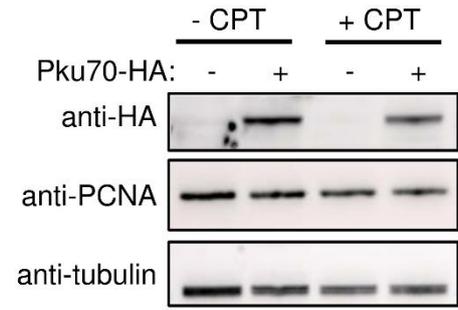
(A) Representative 2DGE analysis in indicated strains and conditions as described in Figure 1C.

(B) "Tail" quantification from panel A as described in Figure 1D.

(C) Analysis of RPA recruitment (OFF/ON ratio) to the *RTS1*-RFB by ChIP-qPCR in indicated strains at 32°C. Distances from the RFB are indicated in base pairs (bp). Values are means of at least three independent experiments \pm SD. Statistics were calculated using Mann-Whitney U test, compare to *rnh201Δ*. A locus located 900 bp away from the RFB was used as control.

(D) Representative 2DGE analysis in indicated strains and conditions as described in Figure 1C.

(E) "Tail" quantification from panel D as described in Figure 1D.

A**B****C**

ITC's cell	Titrant	Kd (nM)
<i>Sp</i> Ku	dsDNA	0.41 ± 0.27
<i>Sp</i> Ku	OF-biot	4.0 ± 1.3
<i>Sp</i> Ku	OF(biot-strep)	5.8 ± 2.9
<i>Sp</i> Ku	RNA:DNA	77 ± 4

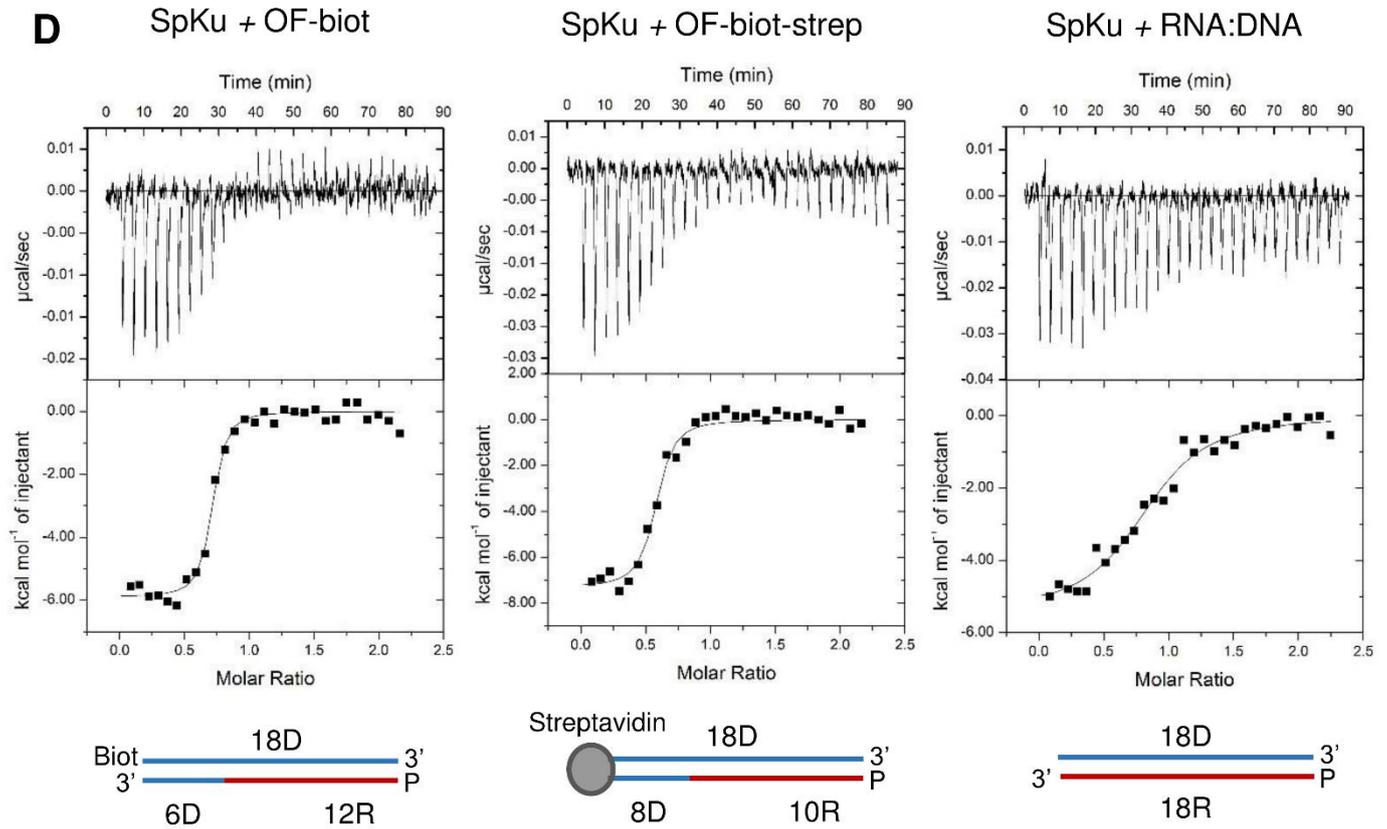
D

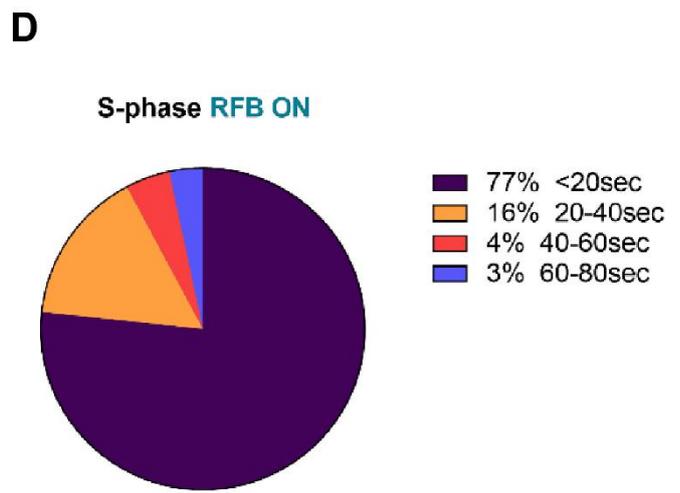
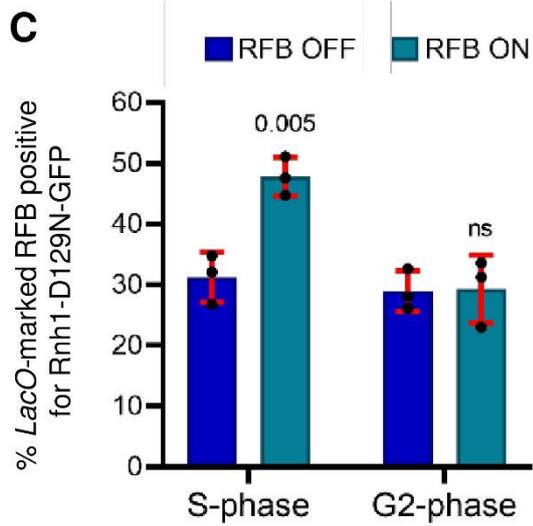
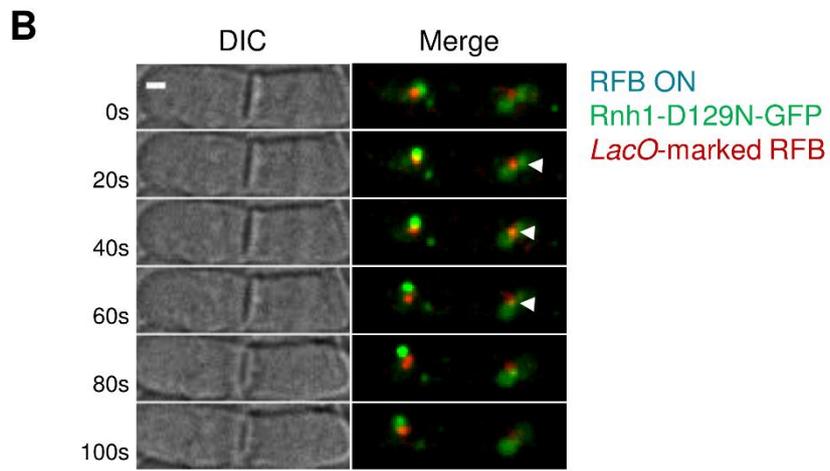
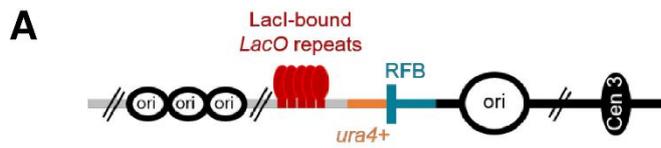
Figure 6: Ku binds RNA:DNA hybrids related substrates *in vivo* and *in vitro*.

(A) Analysis of RNA:DNA hybrids co-immunoprecipitated with anti-HA antibody in indicated strains and conditions. Top panel: Immunoblots using anti-HA antibody. The position of Pku70-HA and IgG are indicated. Bottom panels: detection of RNA:DNA hybrids by dot blot using S9.6 antibody. Treatment with RNase H1 *in vitro* revealed the specificity of the signal.

(B) Expression of Pku70-HA by immunoblot in indicated strains and conditions. Tubulin and PCNA were used as loading control.

(C) Calorimetry measurements of the interaction between SpKu and dsDNA, OF or RNA:DNA substrates.

(D) Thermograms and Isothermal Titration Curves of SpKu with an OF substrate (left), an OF blocked by streptavidin at one extremity (middle) and with a 18bp RNA:DNA substrate.



SUPPLEMENTARY DATA

Figure S1: Transient RNA:DNA hybrids accumulate at the *RTS1*-RFB (related to figure 1)

(A) Scheme of the LacO-marked RFB. mCherry-LacI (red ellipses) bound to LacO arrays (red), integrated ~7 kb away from *ura4+*.

(B) Example of time-lapse microscopy to track Rnh1-D129N-GFP (green signal) recruitment to the LacO-marked RFB (Red dot) in RFB ON condition. Time is indicated in seconds. Septated cells are considered in S-phase. White arrow indicates colocalization between Rnh1 and LacO-marked RFB.

(C) Quantification of co-localization events in indicated conditions. Septated cells were considered in S-phase and mono-nucleated cells were considered in G2. Dots represent values obtained from independent biological replicates. Bars indicate mean values \pm standard deviation (SD). Statistical analysis was performed using student's t-test, compared to RFB OFF condition.

(D) Diagram depicting the duration of co-localization events measured in S-phase in RFB ON condition.

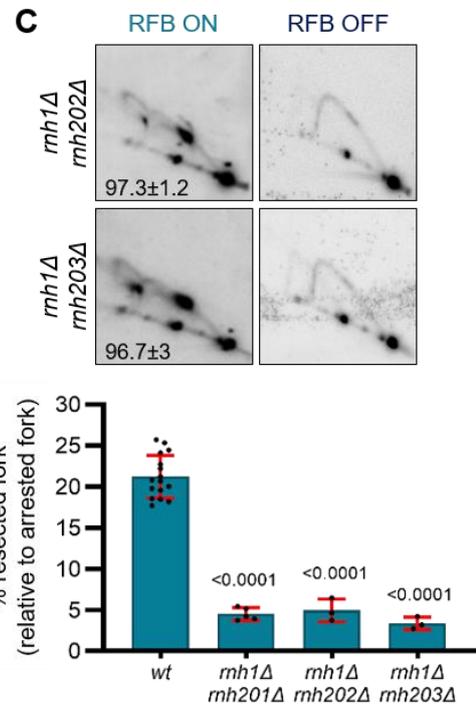
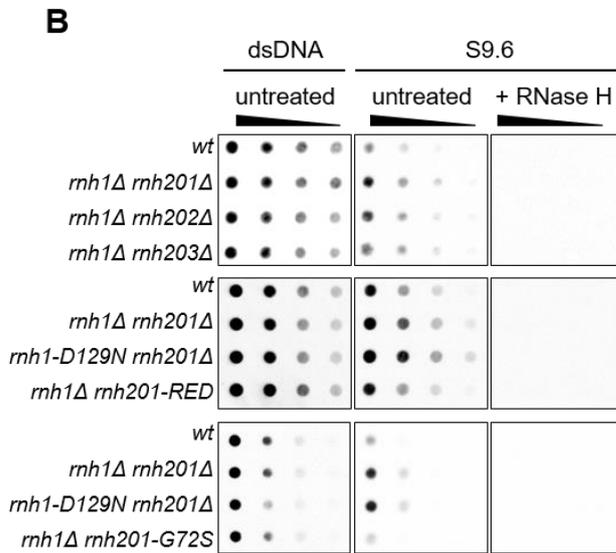
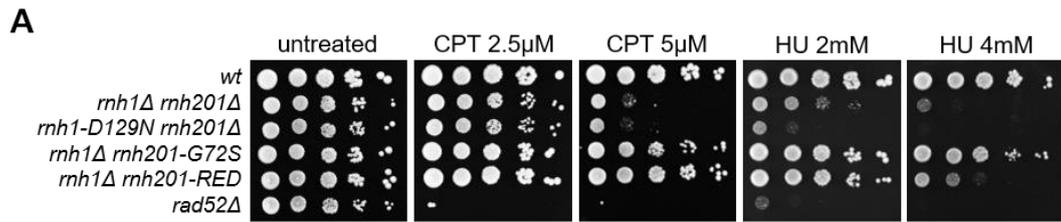


Figure S2: The lack of RNase H activities leads to a defect in nascent strand degradation (related to figure 1).

(A) Tenfold serial dilutions of indicated strains on indicated media conditions (CPT: camptothecin, HU: hydroxyurea).

(B) RNA:DNA hybrid accumulation was analyzed by dot blot in indicated strains. Nucleic acid extracts were treated with RNase H, or not. Membranes were probed with the S9.6 or dsDNA antibodies.

(C) Top panels: Representative 2DGE analysis in indicated strains and conditions. Numbers indicate the efficiency of the RFB \pm SD. Bottom panel: "Tail" quantification. Dots represent values obtained from independent biological replicate. Bars indicate mean values \pm SD. Statistical analysis was performed using student's t-test, compared to *WT*.

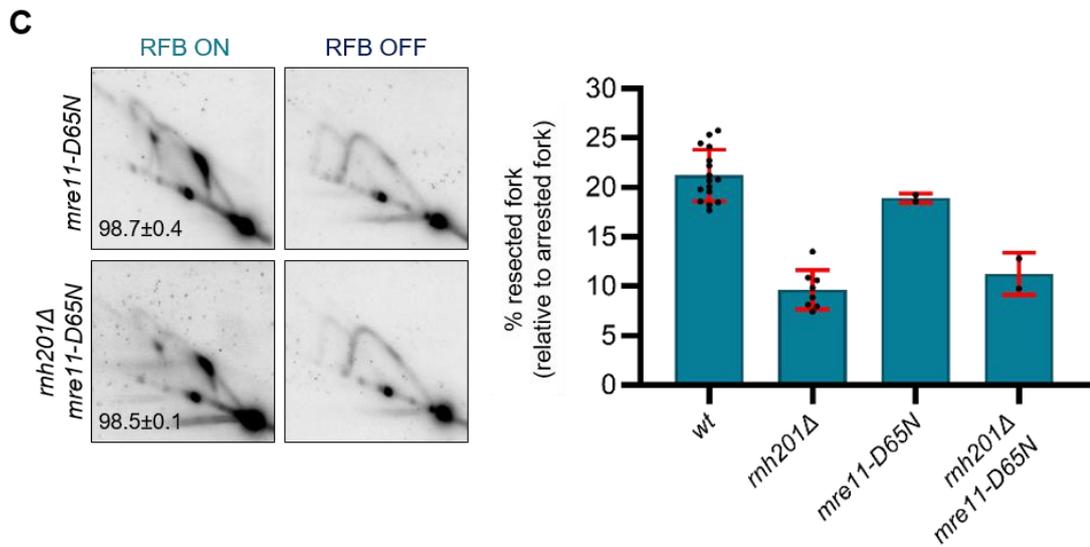
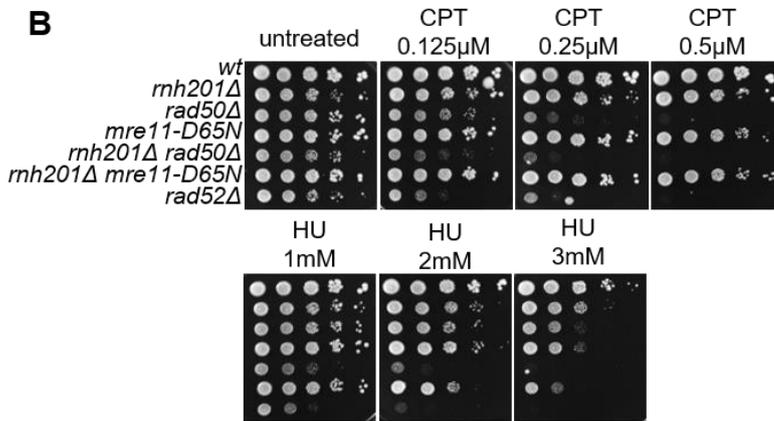
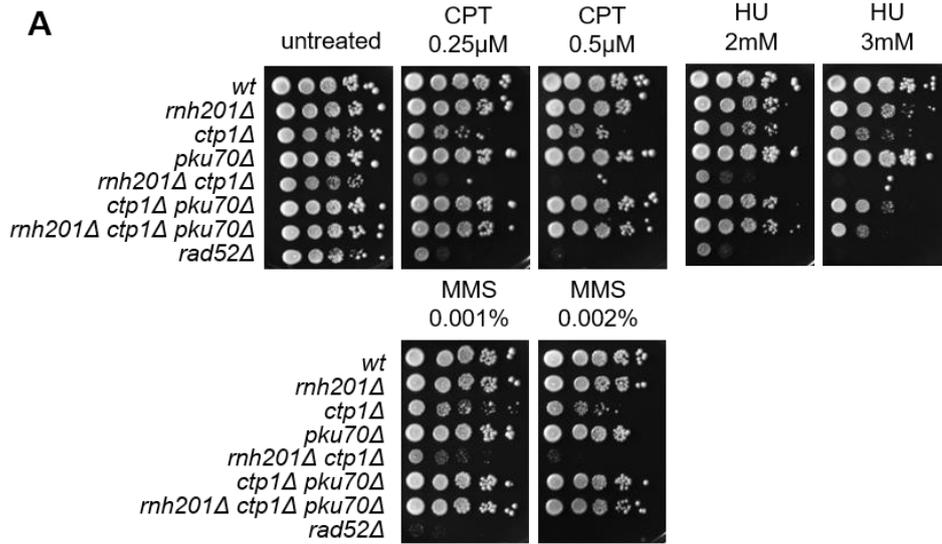


Figure S3: RNase H2 acts in a parallel pathway to MRN-Ctp1 to promote cell resistance to replication stress (related to Figure 2).

(A) And (B) Tenfold serial dilution of indicated strains on indicated media conditions (CPT: camptothecin, HU: hydroxyurea, MMS: methyl methane sulfonate).

(C) Left panels: Representative 2DGE analysis in indicated strains and conditions. Numbers indicate the efficiency of the RFB \pm SD. Right panel: "Tail" quantification. Dots represent values obtained from independent biological replicate. Bars indicate mean values \pm SD. Statistical analysis was performed using student's t-test, compared to *WT*.

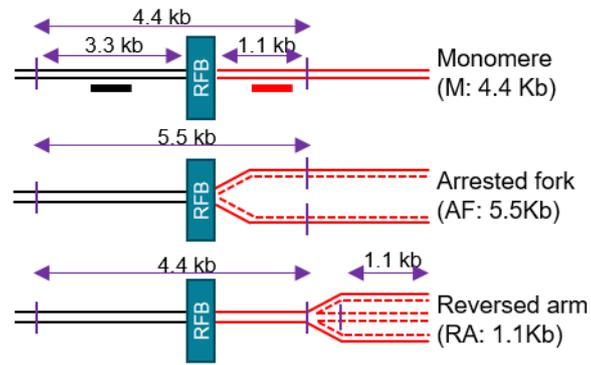
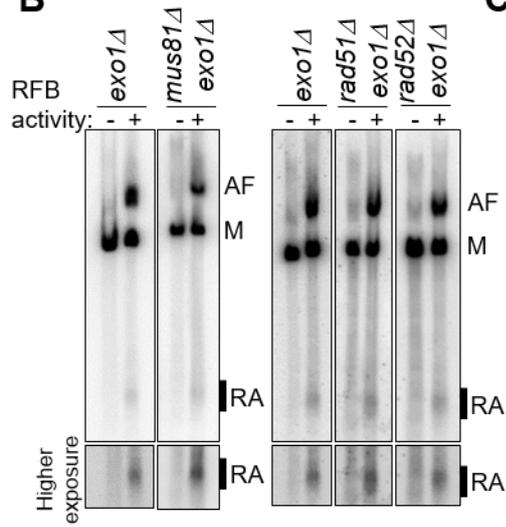
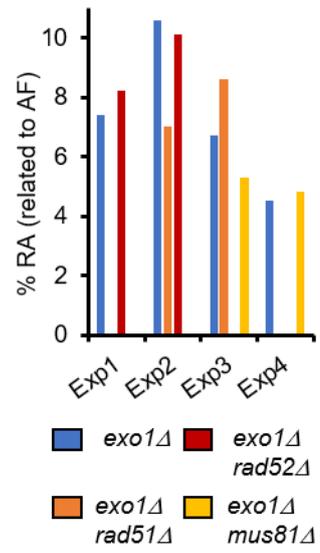
A**B****C**

Figure S4: HR and Mus81-independent accumulation of reversed linear fragment at the RFB (related to Figure 4)

(A) Scheme of the construct used with the expected mass of RI species and the probes used (Probe 1 and 2 in black and red, respectively).

(B) Representative Southern-blot analysis after 1DGE resolution of RIs in indicated strains and conditions, using the red probe. A higher exposure of the RA is shown.

(C) RA quantification (relative to AF signal) in indicated strains and experiments.

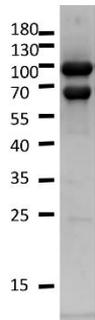
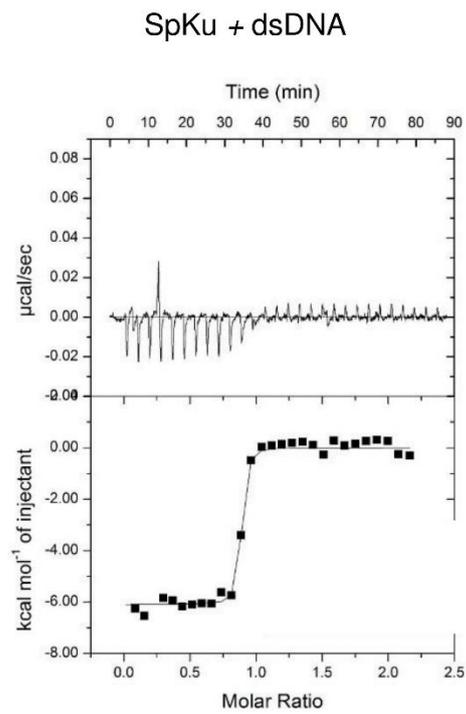
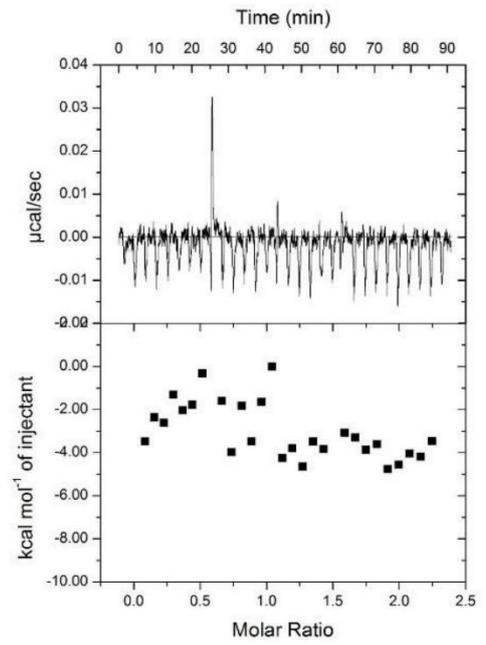
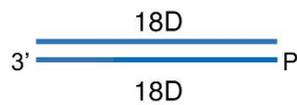
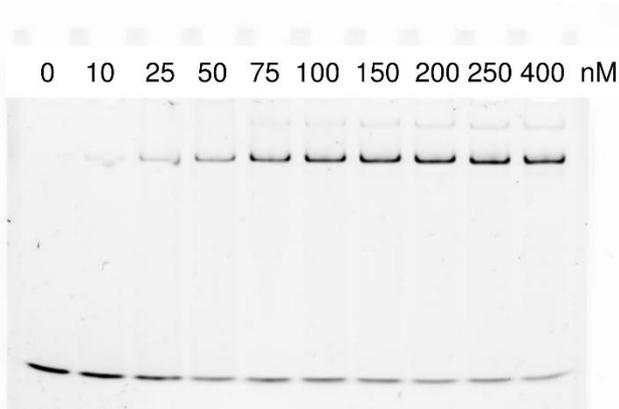
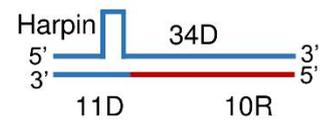
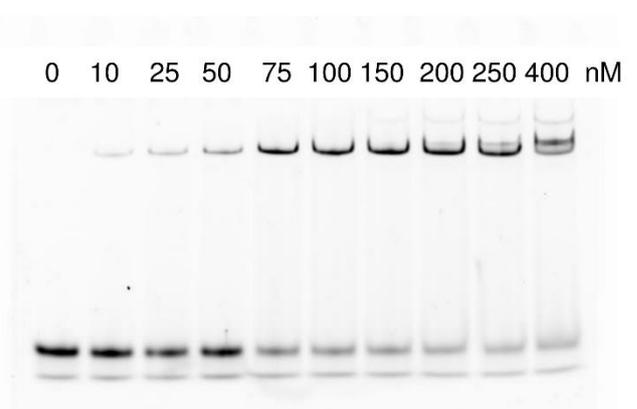
A**B****Buffer + ARN:ADN****C****SpKu + dsDNA****SpKu + hp (OF:DNA)**

Figure S5: Calorimetry and EMSA of SpKu (related to Figure 6)

(A) Purified *S. pombe* Ku70-80 heterodimer

(B) ITC between SpKu and a 18bp DNA, K_d of 0.41 ± 0.27 nM (left panel) and control ITC between RNA:DNA hybrid and buffer (right panel).

(C) EMSA of SpKu versus dsDNA labeled with FAM (left panel) and of SpKu versus OF positioned next to a hairpin to orientate Ku70-80 entering labeled with FAM (right panel).

Table S1: Strains used in this study

Strain number	Mating type	Genotype	Reference
SL3494	<i>h-</i>	<i>nmt41:rtf1:sup35 t-ura4-sd20<ori ade6-704 leu1-32</i>	This study
SL3319	<i>h+</i>	<i>rnh1::hygro nmt41:rtf1:sup35 t-ura4-sd20<ori ade6-704 leu1-32</i>	This study
SL3496	<i>h+</i>	<i>rnh201::kan nmt41:rtf1:sup35 t-ura4-sd20<ori ade6-704 leu1-32</i>	This study
SL3197	<i>h-</i>	<i>rnh1::hygro rnh201::kan nmt41:rtf1:sup35 t-ura4-sd20<ori ade6-704 leu1-32</i>	This study
SL2453	<i>h-</i>	<i>rnh1::hygro rnh202::hygro nmt41:rtf1:sup35 t-ura4-d20<ori ade6-704 leu1-32</i>	This study
SL2677	<i>h-</i>	<i>rnh1::hygro rnh203::hygro nmt41:rtf1:sup35 t-ura4-d20<ori ade6-704 leu1-32</i>	This study
SL1999	<i>h-</i>	<i>rnh1-D129N-GFP:kan nmt41:rtf1:sup35 t-ura4-sd20<ori ade6-704 leu1-32</i>	This study
SL3518	<i>h+</i>	<i>rnh201-G72S nmt41:rtf1:sup35 t-ura4-sd20<ori ade6-704 leu1-32</i>	This study
SL3262	<i>h-</i>	<i>loxP-rnh201RED(P75D-Y245A)-kanMX6-loxM3 nmt41:rtf1:sup35 t-ura4-sd20<ori ade6-704 leu1-32</i>	This study
SL3510	<i>h+</i>	<i>rad3::hygro nmt41:rtf1:sup35 t-ura4-sd20<ori ade6-704 leu1-32</i>	This study
SL3514	<i>h-</i>	<i>rad3::hygro rnh201::kan nmt41:rtf1:sup35 t-ura4-sd20<ori ade6-704 leu1-32</i>	This study
SL0687	<i>h-smt0</i>	<i>rad52::kan nmt41:rtf1:sup35 t-ura4+ <ori ade6-704 leu1-32</i>	Lambert et al., 2010
SL1672	<i>h+</i>	<i>rnh1-D129N-GFP:kan arg3::psv40-mcherry-LacI** ade6-704 leu1-32 nmt41:rtf1:sup35 LacO 7,9Kb:kan t-ura4+ <ori</i>	This study
SL1990	<i>h-</i>	<i>rnh1-D129N-GFP:kan rnh201::kan nmt41:rtf1:sup35 t-ura4-sd20<ori ade6-704 leu1-32</i>	This study
SL3343	<i>h-</i>	<i>rnh1::hygro rnh201-G72S nmt41:rtf1:sup35 t-ura4-sd20<ori ade6-704 leu1-32</i>	This study
SL3272	<i>h-</i>	<i>rnh1::hygro loxP-rnh201RED(P75D-Y245A)-kanMX6-loxM3 nmt41:rtf1:sup35 t-ura4-sd20<ori ade6-704 leu1-32</i>	This study
SL3312	<i>h+</i>	<i>ssb3-YFP:nat nmt41:rtf1:sup35 t-ura4-sd20<ori ade6-704 leu1-32</i>	This study
SL2032	<i>h+</i>	<i>rnh1::hygro ssb3-YFP:nat nmt41:rtf1:sup35 t-ura4-sd20<ori ade6-704 leu1-32</i>	This study

SL2035	<i>h+</i>	<i>rnh201::kan ssb3-YFP:nat nmt41:rtf1:sup35 t-ura4-sd20<ori ade6-704 leu1-32</i>	This study
SL2038	<i>h+</i>	<i>rnh1::hygro rnh201::kan ssb3-YFP:nat nmt41:rtf1:sup35 t-ura4-sd20<ori ade6-704 leu1-32</i>	This study
SL2407	<i>h-</i>	<i>rad50::kan nmt41:rtf1:sup35 t-ura4-sd20<ori ade6-704 leu1-32</i>	This study
SL3498	<i>h+</i>	<i>pku70::hygro nmt41:rtf1:sup35 t-ura4-sd20<ori ade6-704 leu1-32</i>	This study
SL3257	<i>h-</i>	<i>rnh201::kan rad50::kan nmt41:rtf1:sup35 t-ura4-sd20<ori ade6-704 leu1-32</i>	This study
SL2409	<i>h-</i>	<i>rad50::kan pku70::hygro nmt41:rtf1:sup35 t-ura4+ <ori ade6-704 leu1-32</i>	This study
SL2415	<i>h+</i>	<i>rnh201::kan rad50::kan pku70::hygro nmt41:rtf1:sup35 t-ura4-sd20<ori ade6-704 leu1-32</i>	This study
SL3264	<i>h+</i>	<i>rad50::kan loxP-rnh201RED(P75D-Y245A)-kanMX6-loxM3 nmt41:rtf1:sup35 t-ura4-sd20<ori ade6-704 leu1-32</i>	This study
SL3583	<i>h+</i>	<i>rad50::kan rnh201-G72S nmt41:rtf1:sup35 t-ura4-sd20<ori ade6-704 leu1-32</i>	This study
SL3502	<i>h-</i>	<i>rnh201::kan pku70::hygro nmt41:rtf1:sup35 t-ura4-sd20<ori ade6-704 leu1-32</i>	This study
SL3508	<i>h+</i>	<i>rnh201::kan pku70::hygro exo1::nat nmt41:rtf1:sup35 t-ura4-sd20<ori ade6-704 leu1-32</i>	This study
SL3501	<i>h-</i>	<i>exo1::nat nmt41:rtf1:sup35 t-ura4-sd20<ori ade6-704 leu1-32</i>	This study
SL2431	<i>h+</i>	<i>ctp1::hygro nmt41:rtf1:sup35 t-ura4-sd20<ori ade6-704 leu1-32</i>	This study
SL2285	<i>h+</i>	<i>ctp1::hygro rnh201::kan nmt41:rtf1:sup35 t-ura4-sd20<ori ade6-704 leu1-32</i>	This study
SL2617	<i>h-</i>	<i>ctp1::hygro pku70::hygro nmt41:rtf1:sup35 t-ura4-sd20<ori ade6-704 leu1-32</i>	This study
SL2433	<i>h+</i>	<i>ctp1::hygro rnh201::kan pku70::hygro nmt41:rtf1:sup35 t-ura4-sd20<ori ade6-704 leu1-32</i>	This study
SL3687	<i>h+</i>	<i>mre11-D65N nmt41:rtf1:sup35 t-ura4-sd20<ori ade6-704 leu1-32</i>	This study
SL3689	<i>h+</i>	<i>rnh201::kan mre11-D65N nmt41:rtf1:sup35 t-ura4-sd20<ori ade6-704 leu1-32</i>	This study
SL3526	<i>h+</i>	<i>pku80-GFP:kan arg3::psv40-mcherry-LacI** ade6-704 leu1-32 nmt41:rtf1:sup35 LacO 7,9Kb:kan t-ura4+ <ori</i>	This study

SL3531	<i>h+</i>	<i>rnh201::kan pku80-GFP:kan arg3::psv40-mcherry-LacI** ade6-704 leu1-32 nmt41:rtf1:sup35 LacO 7,9Kb:kan t-ura4+ <ori</i>	This study
SL3534	<i>h+</i>	<i>rad50::kan pku80-GFP:kan arg3::psv40-mcherry-LacI** ade6-704 leu1-32 nmt41:rtf1:sup35 LacO 7,9Kb:kan t-ura4+ <ori</i>	This study
SL3538	<i>h-</i>	<i>rnh201::kan rad50::kan pku80-GFP:kan arg3::psv40-mcherry-LacI** ade6-704 leu1-32 nmt41:rtf1:sup35 LacO 7,9Kb:kan t-ura4+ <ori</i>	This study
SL0504	<i>h-</i>	<i>nmt41:rtf1:sup35 t<ura4+-ori ade6-704 leu1-32</i>	This study
II535	<i>h-</i>	<i>rad50::kan exo1::nat nmt41:rtf1:sup35 t-ura4-sd20<ori ade6-704 leu1-32</i>	This study
II539	<i>h-</i>	<i>rad50::kan exo1::nat nmt41:rtf1:sup35 t<ura4-sd20-ori ade6-704 leu1-32</i>	This study
II272	<i>h+</i>	<i>exo1::nat nmt41:rtf1:sup35 ade6-704 leu1-32 [AscI-ura4+-RTS1]</i>	This study
II209	<i>h-</i>	<i>nmt41:rtf1:sup35 ade6-704 leu1-32 [AscI-ura4+-RTS1]</i>	This study
SL2460	<i>h+</i>	<i>cdc25 exo1::nat nmt41:sup35:rtf1 ade 6-704 leu1-32 [AscI-RTS1-ura4+]</i>	This study
SL2445	<i>h-</i>	<i>rnh201::kan exo1::nat nmt41:rtf1:sup35 ade6-704 leu1-32 [AscI-ura4+-RTS1]</i>	This study
SL2553	<i>h+</i>	<i>rnh1::hygro rnh201::kan exo1::nat nmt41:rtf1:sup35 ade6-704 leu1-32 [AscI-ura4+-RTS1]</i>	This study
SL2264	<i>h+</i>	<i>rad52::kan exo1::nat rtf1:nmt41:sup35 ade6-704 leu1-32 [AscI-ura4+-RTS1]</i>	This study
SL2240	<i>h-smt0</i>	<i>rad51::kan exo1::nat rtf1:nmt41:sup35 ade6-704 leu1-32 [AscI-ura4+-RTS1]</i>	This study
SL2249	<i>h-</i>	<i>mus81::kan exo1::nat rtf1:nmt41:sup35 ade6-704 leu1-32 [AscI-ura4+-RTS1]</i>	This study
SL3482	<i>h+</i>	<i>spp1-4:ura4+ nmt41:rtf1:sup35 t-ura4-sd20<ori ade6-704 leu1-32</i>	This study
SL3484	<i>h-</i>	<i>spp1-4:ura4+ rnh201::kan nmt41:rtf1:sup35 t-ura4-sd20<ori ade6-704 leu1-32</i>	This study
SL3435	<i>h-</i>	<i>spp1-4:ura4+ ssb3-YFP:nat nmt41:rtf1:sup35 t-ura4-sd20<ori ade6-704 leu1-32</i>	This study
SL3359	<i>h+</i>	<i>rnh201::kan ssb3-YFP:nat nmt41:rtf1:sup35 t-ura4-sd20<ori ade6-704 leu1-32</i>	This study
SL3362	<i>h+</i>	<i>spp1-4:ura4+ rnh201::kan ssb3-YFP:nat nmt41:rtf1:sup35 t-ura4-sd20<ori ade6-704 leu1-32</i>	This study

SL3221	<i>h-</i>	<i>rad2::kan nmt41:rtf1:sup35 t-ura4-sd20<ori ade6-704 leu1-32</i>	This study
SL3347	<i>h-</i>	<i>rad2::kan pku70::hygro nmt41:rtf1:sup35 t-ura4-sd20<ori ade6-704 leu1-32</i>	This study
SL2062	<i>h-</i>	<i>sen1::nat nmt41:rtf1:sup35 t-ura4-sd20<ori ade6-704 leu1-32</i>	This study
SL3134	<i>h+</i>	<i>pku70-3HA:ura4+ nmt41:rtf1:sup35 t-ura4-sd20<ori ade6-704 leu1-32</i>	This study

Table S2: Primers used in this study

Name	Distance (pb) from the <i>RTS1</i>-RFB position	Sequence (5' → 3')
AseICen		GTCAAGTAAAACGTTGAATCG
Ura4-2F	-900	TGATATGAGCCCAAGAAGCA
Ura4-2R		CAAATTCGCAGACATTGGAA
L5F	-110	AGGGCATTAAAGGCTTATTTACAGA
L5R		TCACGTTTAATTTCAAACATCCA
L3F	110	TTTAAATCAAATCTTCCATGCG
L3R		TGTACCCATGAGCAAACCTGC
L400F	400	ATCTGACATGGCATTCTCA
L400R		GATGCCAGACCGTAATGACA
L600F	600	CCATTGACTAGGAGGACTTTGAG
L600R		CCCTGGCGGTTGTAGTTAGT
L900F	900	AACGGTTGTAGAAGACGAGCA
L900R		TGTAAGCACACCTTCAATGTATCA
L1400F	1400	AACATCGGTGACCTCGTTCT
L1400R		CTCTTCGCTCCAAGCGTTAT
Calorimetry and EMSA experiments		
AG1		5'-GTTATCCGAGCGTGAGAC-3'
AG2		5'-GTCTCACGCTCGGATAAC-3'
AG3		5'-(Biotin-TEG)-GTTATCCGAGCGTGAGAC-3'
AG4		5'-(P)GUCUCACGCUCGGATAAC-3'.
AG5		5'-(P)GUCUCACGCUCGGAUAAC-3'
AG6		5'-(FAM) GTTATCCGAGCGTGAGAC-3'
AG7		5'-(FAM)-CGCGCCAGCTTTCCAGCTAATAAACTAAAAAC
AG8		(5'- (P) <u>GUUUUUAGUUUA</u> TTGGGCGCG

Ribonucleotides are underlined

METHODS

EXPERIMENTAL MODEL AND SUBJECT DETAILS

Yeast strains were freshly thawed from frozen stocks and grown at 25 °C or 30 °C using standard yeast genetics practices.

METHOD DETAILS

Standard yeast genetics

Yeast strains used in this study are listed in Table S1. The *rnh201-G72S* mutant was obtained by classical genetic techniques. Strains carrying the *RTS1*-RFB system were grown in supplemented EMM-glutamate, where the *RTS1* barrier was kept inactive by adding 60 μ M thiamine (condition RFB OFF). To induce fork blockade, cells were washed twice in water and placed into fresh thiamine-free medium for 24 hours' incubation (condition RFB ON). For *spp1-4* thermosensitive mutants, cells were grown at the permissive temperature of 25 °C in the RFB OFF condition, and then shifted to the semipermissive temperature of 32 °C for 24 hours prior RFB induction. To assess the sensitivity of chosen mutants to genotoxic drugs, exponentially growing cultures were serially diluted and spotted onto plates containing hydroxyurea (HU), camptotecin (CPT) or methyl methanesulfonate (MMS).

Replication slippage assay

5-FOA (EUROMEDEX, 1555) resistant colonies were grown on uracil-containing plates with or without thiamine for 2 days at 30 °C. They were subsequently inoculated into EMMg supplemented with uracil, with or without thiamine, for 24 hours. Cells were diluted and plated on EMMg complete (for cell survival) and on EMMg uracil-free plates, both supplemented with 60 μ M thiamine. To determine the reversion frequency, colonies were counted after 5 to 7 days of incubation at 30 °C as previously described (Iraqi et al., 2012).

Analysis of replication intermediates by 2DGE

Exponentially growing cells (2.5×10^9) were treated with 0.1% sodium azide and mixed with frozen EDTA. Genomic DNA was crosslinked upon trimethyl psoralen (0.01 mg/mL, TMP, Sigma, T6137) addition to cell suspensions, for 5 min in the dark with occasional swirling. Then, cells were irradiated with UV-A (365 nm) for 90 s at a constant flow of 50 mW/cm². Cell lysis was performed using 0.625 mg/mL lysing enzymes (Sigma, L1412) and 0.5 mg/mL zymolyase 100 T (Amsbio, 120493-1). Resulting spheroplasts were embedded into 2 % low-melting agarose (Lonza, 50081) plugs. Next, plugs were incubated overnight at 55 °C, in a digestion buffer with 1 mg/mL of proteinase K

(Euromedex, EU0090), prior washing and storage in TE buffer (50 mM Tris, 10 mM EDTA) at 4 °C. DNA digestion was performed using 60 units per plug of restriction enzyme *AseI* (NEB, R0526M). Samples were treated with beta-agarase (NEB, M0392L) and RNase A (Roche, 11119915001) and equilibrated to 0.3 M NaCl. Replication intermediates (RIs) were purified using BND cellulose columns (Sigma, B6385; Biorad, 731-1550), as previously described (Lambert *et al.*, 2010). Double-stranded DNA (dsDNA) was eluted by washing with 0.8 M NaCl, 10mM Tris-HCl (pH 7.5), and 1 mM EDTA. DNA containing single-stranded regions (ssDNA), such as RIs, was eluted by addition of 3 ml of 1 M NaCl, 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1 mM EDTA, and 1.8% caffeine (Sigma, C-8960). RIs were precipitated with glycogen (Roche, 1090139001) and then separated by two-dimensional electrophoresis using 0.35 % and 0.9 % (+EtBr) agarose gels (1xTBE) for the first and second dimensions, respectively. Migrated DNA was transferred to a nylon membrane (Perkin-Elmer, NEF988001PK) in 10x SSC and probed with ³²P-radiolabeled *ura4* probe (TaKaRa *BcaBEST*TM Labeling Kit, 6046 and alpha-³²P dCTP, Perkin-Elmer, BLU013Z250UC) in Ultra-Hyb buffer (Invitrogen, AM8669) at 42°C. Signal of replication intermediates was collected in phosphor-imager software (Typhoon-trio) and quantified by densitometric analysis with ImageQuantTL software (GE healthcare). The 'tail signal' was normalized to the overall signal corresponding to arrested forks.

For the *in vitro* treatment of purified RIs with RNase H1 (NEB, M0297L), the following modifications were performed. Samples were treated with RNase T1 (Thermo Scientific, EN0541) instead of RNase A. Eluted DNA fractions enriched in dsDNA and ssDNA were both precipitated and washed with 70 % EtOH. 3 µg of isolated DNA was saved for the dotblot analysis. The rest is processed for 2DGE analysis: half was digested 2 hours at 37 °C with RNase H1 before migration on the first dimension.

Fork reversal detection by 1DGE

RIs were prepared as described above for 2DGE analysis. For *AscI*-containing constructs (Figures 4D-G, S4), DNA digestion was done with 30 units per plug of restriction enzyme *AvaI* (NEB, R0152M). After the first dimensional migration, 0.35 % agarose gels were stained with EtBr. Crosslinks were reversed by UV-c (254nm) irradiation (5.555 kJ/m²) before transfer to a nylon membrane. Transfer was performed using a vacuum machine in 0.5N NaOH for 1 hour and 50 min, at 50mBar. Membranes' probing was performed as for 2DGE. Probe 1 (Figure 4B, left panel) and Probe 2 used to detect the 3Kb-RA (Figure 4B, right panel) correspond to the *ura4* probe. The probes used to detect the 1Kb-RA (Figures 4 and S4) were made using L3 primer combined either with L600 (Figure 4B, left panel) or *AseI*Cen (see primers list in Table S2).

Nucleic acid extraction

2.5x10⁸ of exponentially growing cultures were harvested, washed in water and resuspended in 600 µL of lysis solution (2% Triton X-100, 1% SDS, 0.1 M NaCl, 10 mM

Tris pH 8, 1 mM EDTA) and 600 μ L phenol-chloroform. Cell lysis was performed with a Precellys homogenizer. After lysate clarification, nucleic acids were precipitated by adding cold 100% EtOH. Resulting pellets were then washed in cold 70% EtOH, air dried and let to resuspend into 100 μ L of water overnight at 4 °C.

Dot blot

Before blotting, all DNA samples were evenly split and submitted to the following digestions. 4 μ g DNA of each sample were treated with 6U RNase III (NEB, M0245L) for 2 hours at 37°C, followed by inactivation for 20 min at 65°C. As controls, for each sample, the same amount of DNA was additionally treated with 10U RNase H1 (NEB, M0297L) or 50U DNase I (Worthington Biochemical, LS006333). All digested products were diluted to an equal concentration in 2x SSC and then serially diluted. 200 μ L of the resulting dilutions were spotted onto a Nylon membrane (Perkin-Elmer, NEF988001PK), using a dot blot apparatus. Spotting was performed in replicates on the same membrane, that is subsequently cut to isolate replicates that will be incubated for 2 hours 30 min with the following antibodies: S9.6 (I. Curie, 1:5.000 in TBS-Tween 5% milk), α -dsDNA (Santa Cruz, Sc-58749; 1:5.000 in TBS-Tween 5% BSA) or α -ssDNA (Millipore, MAB3034; 1:10.000 in TBS-Tween 5% BSA). Goat anti-mouse HRP conjugate (Jackson ImmunoResearch, 115-035-003) was used as secondary antibody and was incubated with all membranes (1:10.000 in TBS-Tween 5% milk) for 1 hour. Blotting and all incubations were done at room temperature.

Flow cytometry

Flow cytometry analysis of DNA content was performed as described previously (Sabatinos & Forsburg, 2015). Briefly, cells fixed in 70 % EtOH were washed with 50 mM sodium citrate then digested with RNase A (Sigma, R5503) for 2 hours and stained with 1 μ M Sytox Green nucleic acid stain (Invitrogen, S7020). Samples were subjected to flow cytometry using FACSCANTO II (BD Biosciences).

Live cell imaging

All image acquisition was performed on the PICT-IBiSA Orsay Imaging facility of Institut Curie. For snapshot microscopy, in RFB OFF and RFB ON conditions, cells were grown in filtered supplemented EMM-glutamate, with or without thiamine respectively, for 24 hours. Exponentially growing cultures were centrifuged and resuspended in 50 μ L of fresh medium. 2 μ L from this concentrated solution was dropped onto a Thermo Scientific slide (ER-201B-CE24) covered with a thin layer of 1.4 % agarose in filtered EMMg. 13 z-stack pictures (each z step of 300 nm) were captured using a Spinning Disk Nikon inverted microscope equipped with the Perfect Focus System, Yokogawa CSUX1 confocal unit, Photometrics Evolve512 EM-CCD camera, 100X/1.45-NA PlanApo oil immersion objective and a laser bench (Errol) with 491 and 561 nm diode lasers, 100 mX (Cobolt). Pictures were collected with METAMORPH software and analyzed with

ImageJ. To investigate the colocalization between Pku80-GFP and *lacO*-bound mCherry-LacI, both channels were merged. Foci that merged or partially overlap were counted as colocalization event.

For the analysis of Pku80-GFP foci formation in response to CPT treatment, cells were grown in complete media and 20 μ M CPT was added 4 hours prior slide preparation. Cells were visualized with a Nikon inverted microscope as described above, using only a 491 nm diode laser, 100 mX (Cobolt). Pictures were collected with METAMORPH software and analyzed with ImageJ.

Pku80-GFP foci required observer-based thresholding before analysis (Jones and Forsburg, 2021). Threshold was put as the same level for each genetic background analyzed within the same experiment. Data were collected from at least 3 independent biological repeats.

Movie analysis

To study the colocalization time between the LacO-marked RFB (LacI foci) and Rnh1-D129N-GFP foci, cells were prepared and visualized with a Nikon inverted microscope as described above, using two fluorescent channels with 491 and 561 nm diode lasers, 100 mX (Cobolt). Images were captured every 10 s with 21 optical slices (each z step of 200 nm) for 45 min with 200 ms exposure time both for GFP and mCherry channels, using METAMORPH software. Movies have been mounted using ImageJ. To investigate the colocalization between Rnh1-D129N-GFP and *lacO*-bound mCherry-LacI, both channels were merged. The duration of colocalization events was estimated based on the overlap of RTS1-RFB LacO/lacI-mCherry and Rnh1-D129N-GFP signals (Figure S1).

Chromatin Immunoprecipitation (ChIP)

Chromatin immunoprecipitations against RPA (Ssb3-YFP) were performed as described in (Tsang *et al.*, 2014) with the following modifications. 2x100 mL of culture (at 1x10⁷ concentration) for each condition (*RTS1*-RFB OFF/ON) was crosslinked with 10 mM DMA (dimethyl adipimidate, thermo scientific, 20660) and subsequently 1% formaldehyde (Sigma, F-8775). Each duplicate was frozen in liquid nitrogen and then lysed by bead beating in 400 μ L of lysis buffer (50 mM HEPES pH 7.5, 1 % Triton X100, 0.1 % Nadeoxycholate, 1 mM EDTA with 1 mM PMSF and Complete EDTA-free protease inhibitor cocktail tablets (Roche, 1873580). Chromatin sonication was performed using a Diagenode Bioruptor in a High mode (10 cycles of 30s ON and 30s OFF). For each condition, duplicates were pooled (2x400 μ L of sonicated chromatin) and overnight immunoprecipitation was performed as follows: 300 μ L was incubated with anti-GFP antibody (Invitrogen, A11122) at 1:150 while 300 μ L was incubated with Normal Rabbit IgG antibody (Cell Signaling Technology, #2729S) at concentration 1:75. 5 μ L was preserved as INPUT fraction. Next morning Dynabeads Protein G (Invitrogen, 10003D) were added for 1 hour and immunoprecipitated complexes have been decrosslinked for 2 hours at 65°C. DNA was purified with a Qiaquick PCR purification kit (QIAGEN,

28104) and eluted in 400 μ L of water. qPCR (iQ SYBR green supermix, Biorad, 1708882, primers listed in Table S2) was performed to determine the relative amounts of DNA. Calculated starting quantity values (based on standard curves for each pair of primers) were normalized by subtracting the rabbit IgG control signal from the specific GFP signal. RPA enrichment is presented as ON/OFF ratio.

Pku70-3xHA ChIP was performed as described in (Teixeira-Silva *et al.*, 2017). Briefly, experiments were performed as follows. Samples were crosslinked with 1 % formaldehyde for 15 min. Sonication was performed using a Diagenod Bioruptor at High setting for 8 cycles (30s ON and 30s OFF). Immunoprecipitation was performed using 50 μ l anti-HA antibody coupled to magnetic beads (Thermo Scientific, Pierce 88837) for 600 μ l of sonicated chromatin. Cell lysis and immunoprecipitation steps were performed in presence of RNase inhibitors (10 units/sample of RNasIN® Plus, Promega, N261B). Crosslink was reversed over night at 70 °C, followed by proteinase K treatment. DNA was purified using Qiaquick PCR purification kit and eluted in 40 μ l of water.

Whole protein extract analysis

Aliquots of 2×10^7 cells from the cultures used for Pku70-3HA ChIP experiments were collected. Cells were disrupted by bead beating in 1 mL of 20 % TCA (Sigma, T9159). Pellets of denatured proteins were washed with 1M Tris pH 8 and resuspended in 2x Laemmli buffer (62.5 mM Tris pH 6.8, 20 % glycerol, 2 % SDS, 5 % β -mercaptoethanol with bromophenol blue). Samples were boiled before being subjected to SDS-PAGE on Mini-PROTEAN TGX Precast Gel 4-15 % (Biorad, 4561086). Western blot using anti-HA (Santa Cruz Biotechnology, sc-57592) or anti-tubulin (Abcam, Ab6160) antibodies was performed.

Purification of *S. pombe* Ku70-80

Full-length PKu70 and PKu80 were co-expressed in Sf21 insect cells and used for calorimetry and EMSA analyses. A 10His-tag was added on the N-terminus of PKu80. Protein production was initiated in Sf21 cells by infection with the baculovirus stock at MOI of 5×10^{-3} and cells were collected 5-6 days after the infection (3-4 days after the proliferation arrest). Cells were sonicated and the supernatant was incubated with Benzonase (300 units for 30 min at 4°C). The Ku heterodimer was purified on a NiNTA-Agarose affinity column (Protino, Macherey Nagel) with a 1M NaCl wash step to remove DNA excess. The eluted Ku was then bound onto an anion exchange column (Resource Q, GE Healthcare) equilibrate with buffer Q (20 mM Tris pH 8.0, 50 mM NaCl, 50 mM KCl, 10 mM β -mercaptoethanol). The final yield was ~8 mg of purified heterodimer by liter of culture. Human Ku70/80 heterodimer was purified with the same protocol (Nemoz *et al.*, 2018).

Calorimetry

Interactions between Ku and DNA or RNA:DNA substrates were determined by isothermal titration calorimetry (ITC) using a VP-ITC calorimeter (Malvern). Prior to measurements, all solutions were degassed under vacuum. The reaction cell of the ITC (volume 1.8 mL) was loaded with Ku heterodimers. Proteins were extensively dialyzed against 20 mM Tris, pH 8.0, 150 mM NaCl, and 5 mM β -mercaptoethanol. The Ku heterodimer present in the cell was titrated by automatic injections of 6-10 μ L of the different DNA and RNA:DNA substrates. Enthalpy ΔH (in kcal.mol⁻¹), stoichiometry of the reaction N , and association constant K_a (in M⁻¹) were obtained by nonlinear least-squares fitting of the experimental data using the single set of independent binding sites model of the Origin software provided with the instrument. Control experiments were performed with DNA and RNA:DNA molecules injected into the buffer to evaluate the heat of the dilution. The experiments were performed at 25°C. To generate the substrates, primers were used as follows (see Table S2):

18bp dsDNA for ITC = AG1 +AG2

OF-biot for ITC = AG3 + AG4

DNA:RNA hybrid for ITC = AG1 + AG5

EMSA

Binding reactions (10 μ L) were performed by incubating Ku and the annealed oligonucleotides listed above. One oligonucleotides is labelled with a FAM fluorophore. They are used at a final concentration of 405 nM (or 40nM), with the indicated final concentrations of proteins in 10mM Tris-HCl pH8, 50mM NaCl (with 5% Glycerol). Reactions were incubated at room temperature for 1 hr and fractionated by 6% PAGE 29% (or 19%)/1% [w/v] Acrylamide:Bis-acrylamide) in 0.5x standard Tris-borate- EDTA (TBE) buffer at 80 V for 45 min at 4°C. After electrophoresis, DNA was visualized using a ChemiDoc MP imaging system (Bio-Rad) by direct detection of the fluorescently labeled DNA (FAM). To generate the substrates, primers were used as follows (see Table S2):

18bp dsDNA with FAM for EMSA = AG6+AG2

OF with hairpin with FAM for EMSA = AG7+AG8

QUANTIFICATION AND STATISTICAL ANALYSIS

Quantitative densitometric analysis of Southern-blot was performed using ImageQuant software. The 'tail signal' of resected forks was normalized to the overall signal of arrested forks.

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

Definitions of represented values and error bars are mentioned within the figure legends. For most experiments, the number of samples is $n > 3$, obtained from independent biological replicate to ensure biological reproducibility.

Statistical analysis was carried using Mann-Whitney U tests and Student's t test, as mentioned within the figure legends.

DATA AND SOFTWARE AVAILABILITY

Data have been deposited to Mendeley data and are available at: Lambert, sarah AE (2021), "Audoynaud et al. 2021", Mendeley Data, V1, doi: 10.17632/k5xm5fpyxt.1

REFERENCES

- Ait Saada, A., Teixeira-Silva, A., Iraqui, I., Costes, A., Hardy, J., Paoletti, G., Fréon, K., and Lambert, S.A.E. (2017). Unprotected Replication Forks Are Converted into Mitotic Sister Chromatid Bridges. *Mol. Cell* *66*, 398–410.e4.
- Ait Saada, A., Lambert, S.A.E., and Carr, A.M. (2018). Preserving replication fork integrity and competence via the homologous recombination pathway. *DNA Repair (Amst)*. *71*, 135–147.
- Audoynaud, C., Vagner, S., and Lambert, S. (2021). Non-homologous end-joining at challenged replication forks: an RNA connection? *Trends Genet.* *37*, 937–985.
- Balakrishnan, L., and Bambara, R.A. (2013). Okazaki fragment metabolism. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* *5*, a010173.
- Balmus, G., Pilger, D., Coates, J., Demir, M., Sczaniecka-Clift, M., Barros, A.C., Woods, M., Fu, B., Yang, F., Chen, E., et al. (2019). ATM orchestrates the DNA-damage response to counter toxic non-homologous end-joining at broken replication forks. *Nat. Commun.* *10*, 87.
- Berti, M., Cortez, D., and Lopes, M. (2020). The plasticity of DNA replication forks in response to clinically relevant genotoxic stress. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *21*, 633–651.
- Bhatia, V., Valdés-Sánchez, L., Rodriguez-Martinez, D., and Bhattacharya, S.S. (2018). Formation of 53BP1 foci and ATM activation under oxidative stress is facilitated by RNA:DNA hybrids and loss of ATM-53BP1 expression promotes photoreceptor cell survival in mice [version 1; peer review: 1 approved, 3 approved with reservations]. *F1000Research* *7*, 1233.
- Britton, S., Chanut, P., Delteil, C., Barboule, N., Frit, P., and Calsou, P. (2020). ATM antagonizes NHEJ proteins assembly and DNA-ends synapsis at single-ended DNA double strand breaks. *Nucleic Acids Res.* *48*, 9710–9723.
- Burgers, P.M.J., and Kunkel, T.A. (2017). Eukaryotic DNA replication fork. *Annu. Rev. Biochem.* *86*, 417–438.
- Cerritelli, S.M., and El Hage, A. (2020). RNases H1 and H2: guardians of the stability of the nuclear genome when supply of dNTPs is limiting for DNA synthesis. *Curr. Genet.* *66*, 1073–1084.
- Chakraborty, A., Tapryal, N., Venkova, T., Horikoshi, N., Pandita, R.K., Sarker, A.H., Sarker, P.S., Pandita, T.K., and Hazra, T.K. (2016). Classical non-homologous end-joining pathway utilizes nascent RNA for error-free double-strand break repair of transcribed genes. *Nat. Commun.* *7*, 13049.
- Chang, E.Y.C., Tsai, S., Aristizabal, M.J., Wells, J.P., Coulombe, Y., Busatto, F.F., Chan, Y.A., Kumar, A., Dan Zhu, Y., Wang, A.Y.H., et al. (2019). MRE11-RAD50-NBS1 promotes Fanconi Anemia R-loop suppression at transcription–replication conflicts. *Nat. Commun.* *10*, 4265.
- Chanut, P., Britton, S., Coates, J., Jackson, S.P., and Calsou, P. (2016). Coordinated nuclease activities counteract Ku at single-ended DNA double-strand breaks. *Nat. Commun.* *7*, 12889.
- Chédin, F., Hartono, S.R., Sanz, L.A., and Vanoosthuysen, V. (2021). Best practices for the visualization, mapping, and manipulation of R-loops. *EMBO J.* *40*, e106394.
- Chen, B.R., Quinet, A., Byrum, A.K., Jackson, J., Berti, M., Thangavel, S., Bredemeyer, A.L., Hindi, I., Mosammamaparast, N., Tyler, J.K., et al. (2019). XLF and H2AX function in series to promote replication fork stability. *J. Cell Biol.* *218*, 2113–2123.
- Chon, H., Sparks, J.L., Rychlik, M., Nowotny, M., Burgers, P.M., Crouch, R.J., and Cerritelli, S.M. (2013). RNase H2 roles in genome integrity revealed by unlinking its activities. *Nucleic Acids Res.* *41*, 3130–3143.
- Cohen, S., Puget, N., Lin, Y.L., Clouaire, T., Aguirrebengoa, M., Rocher, V., Pasero, P., Canitrot, Y., and Legube, G. (2018). Senataxin resolves RNA:DNA hybrids forming at DNA double-strand breaks to prevent translocations. *Nat. Commun.* *9*, 533.

- Coquel, F., Silva, M.J., Técher, H., Zadorozhny, K., Sharma, S., Nieminuszczy, J., Mettling, C., Dardillac, E., Barthe, A., Schmitz, A.L., et al. (2018). SAMHD1 acts at stalled replication forks to prevent interferon induction. *Nature* *557*, 57–61.
- Costantino, L., and Koshland, D. (2018). Genome-wide Map of R-Loop-Induced Damage Reveals How a Subset of R-Loops Contributes to Genomic Instability. *Mol. Cell* *71*, 487-497.e3.
- Crossley, M.P., Bocek, M., and Cimprich, K.A. (2019). R-Loops as Cellular Regulators and Genomic Threats. *Mol. Cell* *73*, 398–411.
- Crow, Y.J., Leitch, A., Hayward, B.E., Garner, A., Parmar, R., Griffith, E., Ali, M., Semple, C., Aicardi, J., Babul-Hirji, R., et al. (2006). Mutations in genes encoding ribonuclease H2 subunits cause Aicardi-Goutières syndrome and mimic congenital viral brain infection. *Nat. Genet.* *38*, 910–916.
- D’Alessandro, G., Whelan, D.R., Howard, S.M., Vitelli, V., Renaudin, X., Adamowicz, M., Iannelli, F., Jones-Weinert, C.W., Lee, M.Y., Matti, V., et al. (2018). BRCA2 controls DNA:RNA hybrid level at DSBs by mediating RNase H2 recruitment. *Nat. Commun.* *9*, 5376.
- Daley, J.M., Tomimatsu, N., Hooks, G., Wang, W., Miller, A.S., Xue, X., Nguyen, K.A., Kaur, H., Williamson, E., Mukherjee, B., et al. (2020). Specificity of end resection pathways for double-strand break regions containing ribonucleotides and base lesions. *Nat. Commun.* *11*, 3088.
- Dang, T.T., and Morales, J.C. (2020). Xrn2 links RNA: Dna hybrid resolution to double strand break repair pathway choice. *Cancers (Basel)*. *12*, 1–15.
- Delamarre, A., Barthe, A., de la Roche Saint-André, C., Luciano, P., Forey, R., Padioleau, I., Skrzypczak, M., Ginalski, K., Géli, V., Pasero, P., et al. (2020). MRX Increases Chromatin Accessibility at Stalled Replication Forks to Promote Nascent DNA Resection and Cohesin Loading. *Mol. Cell* *77*, 395-410.e3.
- Domingo-Prim, J., Bonath, F., and Visa, N. (2020). RNA at DNA Double-Strand Breaks: The Challenge of Dealing with DNA:RNA Hybrids. *BioEssays* *42*, e1900225.
- Froget, B., Blaisonneau, J., Lambert, S., and Baldacci, G. (2008). Cleavage of stalled forks by fission yeast Mus81/Eme1 in absence of DNA replication checkpoint. *Mol. Biol. Cell* *19*, 445–456.
- Gaillard, H., García-Muse, T., and Aguilera, A. (2015). Replication stress and cancer. *Nat. Rev. Cancer* *15*, 276–280.
- García-Muse, T., and Aguilera, A. (2019). R Loops: From Physiological to Pathological Roles. *Cell* *179*, 604–618.
- Garzón, J., Ursich, S., Lopes, M., Hiraga, S. ichiro, and Donaldson, A.D. (2019). Human RIF1-Protein Phosphatase 1 Prevents Degradation and Breakage of Nascent DNA on Replication Stalling. *Cell Rep.* *27*, 2558–2566.
- Griffiths, D.J.F., Liu, V.F., Nurse, P., and Wang, T.S.F. (2001). Role of fission yeast primase catalytic subunit in the replication checkpoint. *Mol. Biol. Cell* *12*, 115–128.
- Hamperl, S., Bocek, M.J., Saldivar, J.C., Swigut, T., and Cimprich, K.A. (2017). Transcription-Replication Conflict Orientation Modulates R-Loop Levels and Activates Distinct DNA Damage Responses. *Cell* *170*, 774-786.e19.
- Hanada, K., Budzowska, M., Davies, S.L., Van Druenen, E., Onizawa, H., Beverloo, H.B., Maas, A., Essers, J., Hickson, I.D., and Kanaar, R. (2007). The structure-specific endonuclease Mus81 contributes to replication restart by generating double-strand DNA breaks. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *14*, 1096–1104.
- Iraqi, I., Chekkal, Y., Jmari, N., Pietrobon, V., Fréon, K., Costes, A., and Lambert, S.A.E. (2012). Recovery of Arrested Replication Forks by Homologous Recombination Is Error-Prone. *PLoS Genet.* *8*, e1002976.
- Jalan, M., Oehler, J., Morrow, C.A., Osman, F., and Whitby, M.C. (2019). Factors affecting template switch recombination associated with restarted DNA replication. *Elife* *8*, e41697.
- Jones, C.E., and Forsburg, S.L. (2021). Monitoring *Schizosaccharomyces pombe* genome stress by visualizing end-binding protein Ku. *Biol. Open* *10*, bio054346.

- Joshi, R.R., Ali, S.I., and Ashley, A.K. (2019). DNA Ligase IV Prevents Replication Fork Stalling and Promotes Cellular Proliferation in Triple Negative Breast Cancer. *J. Nucleic Acids* 9170341.
- Kemiha, S., Poli, J., Lin, Y.L., Lengronne, A., and Pasero, P. (2021). Toxic R-loops: Cause or consequence of replication stress? *DNA Repair (Amst)*. 107, 103199.
- Kramarz, K., Saada, A.A., and Lambert, S.A.E. (2021). The Analysis of Recombination-Dependent Processing of Blocked Replication Forks by Bidimensional Gel Electrophoresis. In *Methods in Molecular Biology*, (Humana Press Inc.), pp. 365–381.
- Lambert, S., Watson, A., Sheedy, D.M., Martin, B., and Carr, A.M. (2005). Gross chromosomal rearrangements and elevated recombination at an inducible site-specific replication fork barrier. *Cell* 121, 689–702.
- Lambert, S., Mizuno, K., Blaisonneau, J., Martineau, S., Chanet, R., Fréon, K., Murray, J.M., Carr, A.M., and Baldacci, G. (2010). Homologous recombination restarts blocked replication forks at the expense of genome rearrangements by template exchange. *Mol. Cell* 39, 346–359.
- Langerak, P., Mejia-Ramirez, E., Limbo, O., and Russell, P. (2011). Release of Ku and MRN from DNA ends by Mre11 nuclease activity and Ctp1 is required for homologous recombination repair of double-strand breaks. *PLoS Genet.* 7, e1002271.
- Lazzaro, F., Novarina, D., Amara, F., Watt, D.L., Stone, J.E., Costanzo, V., Burgers, P.M., Kunkel, T.A., Plevani, P., and Muzi-Falconi, M. (2012). RNase H and postreplication repair protect cells from ribonucleotides incorporated in DNA. *Mol. Cell* 45, 99–110.
- Lemaçon, D., Jackson, J., Quinet, A., Brickner, J.R., Li, S., Yazinski, S., You, Z., Ira, G., Zou, L., Mosammamparast, N., et al. (2017). MRE11 and EXO1 nucleases degrade reversed forks and elicit MUS81-dependent fork rescue in BRCA2-deficient cells. *Nat. Commun.* 8, 860.
- Li, L., Germain, D.R., Poon, H.-Y., Hildebrandt, M.R., Monckton, E.A., McDonald, D., Hendzel, M.J., and Godbout, R. (2016). DEAD Box 1 Facilitates Removal of RNA and Homologous Recombination at DNA Double-Strand Breaks. *Mol. Cell. Biol.* 36, 2794–2810.
- Liu, S., Hua, Y., Wang, J., Li, L., Yuan, J., Zhang, B., Wang, Z., Ji, J., and Kong, D. (2021). RNA polymerase III is required for the repair of DNA double-strand breaks by homologous recombination. *Cell* 184, 1314–1329.
- Liu, W., Krishnamoorthy, A., Zhao, R., and Cortez, D. (2020). Two replication fork remodeling pathways generate nuclease substrates for distinct fork protection factors. *Sci. Adv.* 6, eabc3598.
- Marnef, A., and Legube, G. (2021). R-loops as Janus-faced modulators of DNA repair. *Nat. Cell Biol.* 23, 305–313.
- Meroni, A., Nava, G.M., Bianco, E., Grasso, L., Galati, E., Bosio, M.C., Delmastro, D., Muzi-Falconi, M., and Lazzaro, F. (2019). RNase H activities counteract a toxic effect of Polymerase in cells replicating with depleted dNTP pools. *Nucleic Acids Res.* 47, 4612–4623.
- Michelini, F., Pitchiaya, S., Vitelli, V., Sharma, S., Gioia, U., Pessina, F., Cabrini, M., Wang, Y., Capozzo, I., Iannelli, F., et al. (2017). Damage-induced lncRNAs control the DNA damage response through interaction with DDRNAs at individual double-strand breaks. *Nat. Cell Biol.* 19, 1400–1411.
- Mijic, S., Zellweger, R., Chappidi, N., Berti, M., Jacobs, K., Mutreja, K., Ursich, S., Ray Chaudhuri, A., Nussenzweig, A., Janscak, P., et al. (2017). Replication fork reversal triggers fork degradation in BRCA2-defective cells. *Nat. Commun.* 8, 859.
- Miyoshi, T., Kanoh, J., and Ishikawa, F. (2009). Fission yeast Ku protein is required for recovery from DNA replication stress. *Genes to Cells* 14, 1091–1103.
- Mizuno, K., Miyabe, I., Schalbetter, S.A., Carr, A.M., and Murray, J.M. (2012). Recombination-restarted replication makes inverted chromosome fusions at inverted repeats. *Nature* 493, 246–249.

- Mukherjee, C., Tripathi, V., Manolika, E.M., Heijink, A.M., Ricci, G., Merzouk, S., de Boer, H.R., Demmers, J., van Vugt, M.A.T.M., and Ray Chaudhuri, A. (2019). RIF1 promotes replication fork protection and efficient restart to maintain genome stability. *Nat. Commun.* *10*, 3287.
- Naiman, K., Campillo-Funollet, E., Watson, A.T., Budden, A., Miyabe, I., and Carr, A.M. (2021). Replication dynamics of recombination-dependent replication forks. *Nat. Commun.* *12*, 923.
- Nava, G.M., Grasso, L., Sertic, S., Pelliccioli, A., Falconi, M.M., and Lazzaro, F. (2020). One, no one, and one hundred thousand: The many forms of ribonucleotides in DNA. *Int. J. Mol. Sci.* *21*, 1706.
- Neelsen, K.J., and Lopes, M. (2015). Replication fork reversal in eukaryotes: From dead end to dynamic response. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *16*, 207–220.
- Nemoz, C., Ropars, V., Frit, P., Gontier, A., Drevet, P., Yu, J., Guerois, R., Pitois, A., Comte, A., Delteil, C., et al. (2018). XLF and APLF bind Ku80 at two remote sites to ensure DNA repair by non-homologous end joining. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *25*, 971–980.
- Nguyen, M.O., Jalan, M., Morrow, C.A., Osman, F., and Whitby, M.C. (2015). Recombination occurs within minutes of replication blockage by RTS1 producing restarted forks that are prone to collapse. *Elife* *4*, e04539.
- Ohle, C., Tesorero, R., Schermann, G., Dobrev, N., Sinning, I., and Fischer, T. (2016). Transient RNA-DNA Hybrids Are Required for Efficient Double-Strand Break Repair. *Cell* *167*, 1001–1013.
- Pessina, F., Giavazzi, F., Yin, Y., Gioia, U., Vitelli, V., Galbiati, A., Barozzi, S., Garre, M., Oldani, A., Flaus, A., et al. (2019). Functional transcription promoters at DNA double-strand breaks mediate RNA-driven phase separation of damage-response factors. *Nat. Cell Biol.* *21*, 1286–1299.
- Pizzi, S., Sertic, S., Orcesi, S., Cereda, C., Bianchi, M., Jackson, A.P., Lazzaro, F., Plevani, P., and Muzi-Falconi, M. (2015). Reduction of hRNase H2 activity in Aicardi-Goutières syndrome cells leads to replication stress and genome instability. *Hum. Mol. Genet.* *24*, 649–658.
- Promonet, A., Padioleau, I., Liu, Y., Sanz, L., Biernacka, A., Schmitz, A.L., Skrzypczak, M., Sarrazin, A., Mettling, C., Rowicka, M., et al. (2020). Topoisomerase 1 prevents replication stress at R-loop-enriched transcription termination sites. *Nat. Commun.* *11*, 3940.
- Rawal, C.C., Zardoni, L., Di Terlizzi, M., Galati, E., Brambati, A., Lazzaro, F., Liberi, G., and Pelliccioli, A. (2020). Senataxin Ortholog Sen1 Limits DNA:RNA Hybrid Accumulation at DNA Double-Strand Breaks to Control End Resection and Repair Fidelity. *Cell Rep.* *31*, 107603.
- Reginato, G., and Cejka, P. (2020). The MRE11 complex: A versatile toolkit for the repair of broken DNA. *DNA Repair (Amst)*. *91–92*, 102869.
- Reginato, G., Cannavo, E., and Cejka, P. (2017). Physiological protein blocks direct the Mre11-Rad50-Xrs2 and Sae2 nuclease complex to initiate DNA end resection. *Genes Dev.* *31*, 2325–2330.
- Rohman, M.S., Koga, Y., Takano, K., Chon, H., Crouch, R.J., and Kanaya, S. (2008). Effect of the disease-causing mutations identified in human ribonuclease (RNase) H2 on the activities and stabilities of yeast RNase H2 and archaeal RNase HII. *FEBS J.* *275*, 4836–4849.
- Sabatinos, S.A., and Forsburg, S.L. (2009). Measuring DNA content by flow cytometry in fission yeast. *Methods Mol. Biol.* *521*, 449–461.
- San Martin-Alonso, M., Soler-Oliva, M.E., García-Rubio, M., García-Muse, T., and Aguilera, A. (2021). Harmful R-loops are prevented via different cell cycle-specific mechanisms. *Nat. Commun.* *12*, 4451.
- Sánchez, A., and Russell, P. (2015). Ku Stabilizes replication forks in the absence of Brc1. *PLoS One* *10*, e0126598.
- Sessa, G., Gómez-González, B., Silva, S., Pérez-Calero, C., Beaupere, R., Barroso, S., Martineau, S., Martin, C., Ehlén, Å., Martínez, J.S., et al. (2021). BRCA2 promotes DNA-RNA hybrid resolution by DDX5 helicase at DNA breaks to

facilitate their repair[‡]. *EMBO J.* *40*, e106018.

Teixeira-Silva, A., Ait Saada, A., Hardy, J., Iraqui, I., Nocente, M.C., Fréon, K., and Lambert, S.A.E. (2017). The end-joining factor Ku acts in the end-resection of double strand break-free arrested replication forks. *Nat. Commun.* *8*, 1982.

Tsang, E., Miyabe, I., Iraqui, I., Zheng, J., Lambert, S.A.E., and Carr, A.M. (2014). The extent of error-prone replication restart by homologous recombination is controlled by Exo1 and checkpoint proteins. *J. Cell Sci.* *127*, 2983–2994.

Wang, W., Daley, J.M., Kwon, Y., Xue, X., Krasner, D.S., Miller, A.S., Nguyen, K.A., Williamson, E.A., Shim, E.Y., Lee, S.E., et al. (2018). A DNA nick at Ku-blocked double-strand break ends serves as an entry site for exonuclease 1 (Exo1) or Sgs1–Dna2 in long-range DNA end resection. *J. Biol. Chem.* *293*, 17061–17069.

Wang, Y., Fu, Z., Li, X., Liang, Y., Pei, S., Hao, S., Zhu, Q., Yu, T., Pei, Y., Yuan, J., et al. (2021). Cytoplasmic DNA sensing by KU complex in aged CD4⁺ T cell potentiates T cell activation and aging-related autoimmune inflammation. *Immunity* *54*, 632–647.e9.

Wu, J., and Yan, N. (2021). A “KU” new sensor for cytosolic DNA in T cells. *Immunity* *54*, 603–605.

Zeman, M.K., and Cimprich, K.A. (2014). Causes and consequences of replication stress. *Nat. Cell Biol.* *16*, 2–9.

Zhao, H., Zhu, M., Limbo, O., and Russell, P. (2018). RNase H eliminates R-loops that disrupt DNA replication but is nonessential for efficient DSB repair. *EMBO Rep.* *19*, e45335.

Zong, D., Oberdoerffer, P., Batista, P.J., and Nussenzweig, A. (2020). RNA: a double-edged sword in genome maintenance. *Nat. Rev. Genet.* *21*, 651–670.

Publication #2

Non-homologous end-joining at challenged replication forks: an RNA connection?



Opinion

Non-homologous end-joining at challenged replication forks: an RNA connection?

Charlotte Audouinaud,^{1,2,3} Stéphan Vagner,^{1,2,3} and Sarah Lambert^{1,2,3,*}

Defective DNA replication, known as ‘replication stress’, is a source of DNA damage, a hallmark of numerous human diseases, including cancer, developmental defect, neurological disorders, and premature aging. Recent work indicates that non-homologous end-joining (NHEJ) is unexpectedly active during DNA replication to repair replication-born DNA lesions and to safeguard replication fork integrity. However, erroneous NHEJ events are deleterious to genome stability. RNAs are novel regulators of NHEJ activity through their ability to modulate the assembly of repair complexes in *trans*. At DNA damage sites, RNAs and DNA-embedded ribonucleotides modulate repair efficiency and fidelity. We discuss here how RNAs and associated proteins, including RNA binding proteins, may regulate NHEJ to sustain genome stability during DNA replication.

Double-ended double-strand break repair pathways

Double-ended DNA double-strand breaks (deDSBs) are considered the most toxic lesions because they are drivers of chromosomal rearrangement. These deDSBs are repaired by two distinct pathways: **homologous recombination (HR)** (see [Glossary](#)) and **non-homologous end-joining (NHEJ)** [1]. HR requires the presence of an intact homologous sequence and is initiated by a well-orchestrated nucleolytic degradation (named ‘end resection’) of DSB ends to expose single-stranded DNA (ssDNA) [2]. The canonical NHEJ (cNHEJ) pathway acts at deDSBs by rejoining the two DNA extremities with no or little end trimming, regardless of sequence homology [3]. cNHEJ factors, such as KU, 53BP1, and RIF1, counteract the resection step, which is key for deDSB repair pathway choice [4]. When a limited end resection is engaged, an error-prone **alternative end-joining (Alt-EJ)** can exploit microhomologies to anneal and ligate DNA ends [3].

Replication-associated DNA damage usually relies on HR for error-free repair. Nevertheless, several reports indicate that NHEJ is also active during DNA replication in unicellular organisms and in metazoan, supporting evolutionarily conserved functions in sustaining cell proliferation upon **replication stress (RS)**. Many NHEJ factors are engaged at damaged replication forks, although not in their canonical functional mode to drive DNA transactions, either beneficial or toxic for genome stability. Here, we discuss the distinct functions of NHEJ in DNA replication and how RNAs may contribute to regulating its activity to avoid mutagenic repair of replicative DNA lesions.

EJ factors are active during DNA replication

RS is an underlying source of genome instability [5]. Converging results indicate a role for NHEJ factors in safeguarding the integrity of newly replicated strands, in repairing replication-induced DSBs, and in restarting replication forks ([Figure 1](#)). In many organisms, the lack of NHEJ factors leads to cellular sensitivity to various replication-blocking agents [6,7] and mammalian core NHEJ components (KU, DNA-PKcs, 53BP1, RIF1) are found at newly replicated DNA of halted forks [8–10], although their precise functions are not always understood. When the major components

Highlights

Non-homologous end-joining (NHEJ), a double-strand break (DSB) repair pathway, is active during DNA replication, as several NHEJ factors are involved in safeguarding the integrity of newly replicated strands, in repairing replication-induced DSBs, and in restarting replication forks.

RNAs at DSBs are instrumental in fueling the DNA damage response and guiding modulation of the fidelity of DNA repair by NHEJ.

RNAs are modulators of NHEJ activity acting in *trans* as scaffolds or in *cis* to promote RNA-templated DSB repair, thereby regulating the repair pathway choice.

Ribonucleotides coexist in the DNA template during unstressed and stressed DNA replication and may influence NHEJ activity at halted replication forks.

¹Institut Curie, Université PSL, CNRS UMR3348, INSERM U1278, 91400 Orsay, France

²Université Paris-Saclay, CNRS UMR3348, INSERM U1278, 91400 Orsay, France

³Equipes Labélisées Ligue Nationale Contre Le Cancer, 91400 Orsay, France

*Correspondence: sarah.lambert@curie.fr (S. Lambert).

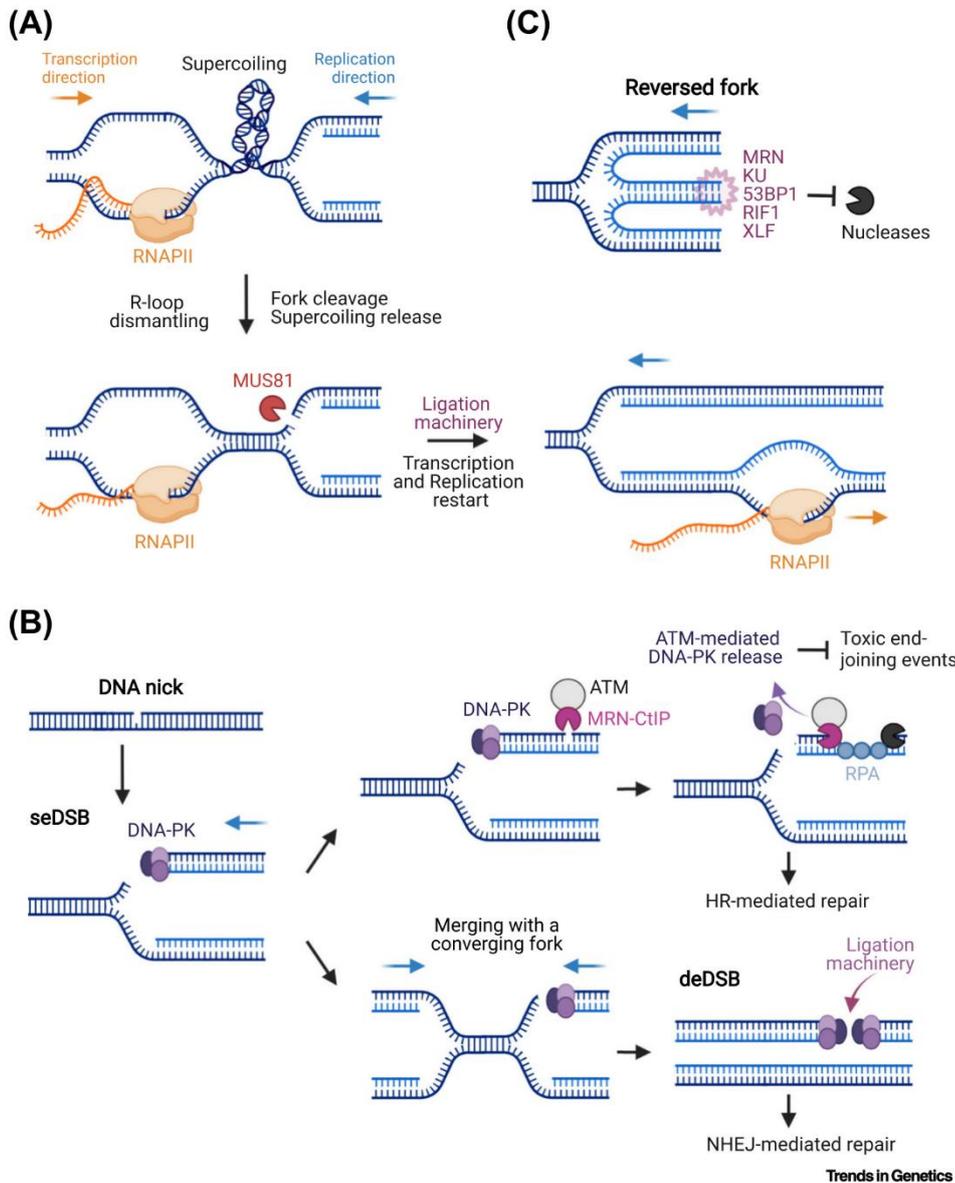


Figure 1. Non-homologous end-joining (NHEJ) pathways at stressed replication forks. (A) NHEJ at transcription–replication conflicts. At the site of a head-on transcription–replication encounter, topological stress favors cotranscriptional R-loop formation. Fork stalling is resolved by Mus81-dependent fork cleavage, allowing the release of topological stress and the progression of RNA polymerase II (RNAPII). Fork repair is then achieved by ligation of the break by the NHEJ ligation machinery, allowing replication restart. (B) NHEJ at broken replication forks. When a fork encounters a nick in the DNA template, it results in a broken fork harboring a single-ended double-strand break (seDSB) bound by KU (light purple circles) and DNA-PKcs (dark purple circle) that form the holocomplex DNA-PK, restricting DNA end resection. DNA-PK eviction requires the nuclease activities of the MRN–CtIP complex regulated by the ATM kinase, allowing the formation of replication protein A (RPA)-coated single-stranded DNA to switch fork repair toward the homologous recombination (HR) pathway (top panel). At this stage, ATM activity is critical to prevent toxic end-joining events destabilizing genome stability. When the converging fork is approaching, the seDSB is converted to a double-ended DSB (deDSB) that is repaired by the NHEJ ligation machinery, allowing the completion of DNA replication. (C) NHEJ as replication fork protection factors. Various replication-blocking agents lead to replication fork reversal, providing a double-stranded DNA end. Reversed forks are an entry point for numerous nucleases degrading nascent strands, a process that becomes toxic to cell survival when not restrained. Several NHEJ factors act at replication forks to protect nascent strands from degradation by distinct mechanisms (see main text for details).

Glossary

Alternative end-joining (Alt-EJ): an error-prone DSB repair mechanism alternative to canonical non-homologous end-joining acting when a limited end resection is engaged at deDSBs and that exploits microhomology to anneal and ligate DNA ends.

BRCA1 and BRCA2: Breast cancer 1 and 2, respectively. They are genes for which the mutation or silencing is associated with human breast or ovarian cancer susceptibility. They encode for proteins involved in DNA damage signaling and repair.

Damage-induced long noncoding RNAs (dilncRNAs): actively transcribed at deDSBs by RNAPII and contributing to formation of long double-stranded RNAs, further converted to shorter DNA damage response RNAs (DDRnAs) of ~21 ribonucleotides in size by RNase III enzymes.

DNA damage response (DDR): the cellular response to DNA damaging agents, including the molecular pathways to sense, signal, and repair DNA lesions.

G-quadruplexes: secondary structures that form in nucleic acids when the sequence is rich in guanine.

Homologous recombination (HR): a DSB repair pathway, initiated by a tightly orchestrated nucleolytic degradation of DSB ends to expose single-stranded DNA (ssDNA) on which the ssDNA-binding protein RPA is loaded. With the help of HR mediators such as human BRCA2 and yeast Rad52, the recombinase RAD51 is then loaded onto ssDNA to form a well-structured nucleoprotein filament, responsible for homology search.

Non-homologous end-joining (NHEJ): a pathway that acts at deDSBs by rejoining the two DNA extremities. Canonical NHEJ (cNHEJ) is initiated by the binding of the heterodimer KU70–KU80 (also known as XRCC5 and XRCC6) to each double-stranded DNA end. KU binding further engages the DNA-dependent protein kinase catalytic subunit (DNA-PKcs), forming the DNA-PK holocomplex.

Okazaki fragments: discontinuous newly replicated DNA stretches formed on the lagging strand.

Quelling pathway: a *Neurospora crassa* RNAi-related mechanism that post-transcriptionally silences repetitive

of HR are lost, the repair of replication-associated DSBs relies on Alt-EJ factors such as PolQ, but NHEJ factors can also cooperate with HR to repair replicative DNA damage [11,12].

Upon head-on collisions between the transcription and replication machineries, the nascent RNA has the tendency to anneal with its DNA template to form an **R-loop**, contributing to fork stalling (Figure 1A) [13]. Enzymatic cleavage of the stalled fork is proposed to facilitate RNA polymerase II (RNAPII) progression. The cleaved fork is then repaired by the coaction of Rad52 and the ligase IV–Xrcc4 complex, known to join DNA ends during DSB repair by NHEJ, allowing replication restart [13]. This type of EJ-dependent fork repair likely ensures, together with DNA-PKcs, proper cell proliferation and resistance to RS in human triple-negative breast cancer [14].

When active replication forks encounter a DNA nick, it results in the formation of a broken fork from which one sister chromatid is teared off. This replicative DNA lesion, called a ‘single-ended DSB’ (seDSB), can be further converted into a deDSB when the converging fork reaches the seDSB site (Figure 1B) [15]. The topoisomerase I inhibitor camptothecin (CPT), whose derivatives are used in chemotherapy, considerably increased the occurrence of seDSBs, and KU is an early responder to CPT-induced broken forks [16,17]. Even if NHEJ at seDSBs is a dead end in terms of ligation of DNA extremities, numerous studies in yeast have revealed that KU binds seDSBs and restricts HR by blocking long-range end resection, unless it is evicted by the coordinated action of endonucleases such as MRN (Mre11–Rad50–Nbs1) [18–21]. Mammalian KU also engages at CPT-induced stalled forks and is evicted by the coordinated action of MRN and CtIP (Figure 1B). Surprisingly, the persistence of KU at seDSBs rather limits RAD51 loading instead of the long-range resection, suggesting that KU binding to seDSBs could be a first step of the HR process to repair broken forks [22].

In a process named ‘replication fork protection’, nascent DNA is protected from nuclease attacks, a step necessary to stabilize halted forks and likely to favor the merging with a converging fork [23]. Upon various types of RS, active forks are converted into reversed forks, four-way DNA structures in which the newly replicated strands are annealed together, exposing a double-stranded DNA (dsDNA) end, distinct from an seDSB (Figure 1C) [24]. Although the controlled degradation of nascent strands is necessary to expose ssDNA to recruit HR factors [2,23], an excessive degradation, occurring when the RAD51 filament is not formed appropriately, is toxic to cell survival and contributes to breast cancer sensitivity to chemotherapies [24]. In both yeast and mammals, some NHEJ components, such as KU, XLF, RIF1, and 53BP1, act at reversed forks as antiresection barriers, independently of their canonical function in NHEJ, to stabilize halted forks and facilitate replication restart (Figure 1C) [9,19,25–28]. For instance, fission yeast KU binds arrested forks to orchestrate the resection of newly replicated strands, independently of ligase IV, and to allow timely replication restart, albeit the molecular mechanism of this last function remains unclear [19]. Besides, in mouse embryonic fibroblasts, RIF1-mediated protection of stalled forks requires its interaction with the protein phosphatase 1 but is independent of its interacting partner 53BP1 [9,27]. However, in cancer cells, 53BP1 was found necessary for protecting stalled forks from degradation [26]. NHEJ components therefore constitute essential factors for replication fork protection and stabilization, contributing to maintenance of genome stability upon RS, likely in a cell type-dependent manner.

Although NHEJ factors promote replication restart and fork integrity, their activity should be regulated to avoid toxic repair events. When replication termination occurs at a broken fork, the seDSB is converted to a deDSB in one sister chromatid, which after ligation by NHEJ may be beneficial to complete DNA replication (Figure 1B). However, ligation of distant seDSBs would generate chromosomal rearrangements [15]. ATM, a maestro kinase of the **DNA damage**

DNA and transposons, a type of mobile DNA element.

Replication stress (RS): corresponds to any event that distorts the DNA replication program. A main feature of RS is the alteration of replication fork progression, by either a slowdown or an acceleration, resulting in stalled, collapsed, or broken forks.

R-loop: a cotranscriptional three-stranded nucleic acid structure in which the nascent RNA anneals with its template DNA strand to form an RNA:DNA hybrid and a displaced single-stranded DNA.

RNA binding protein (RBP): a class of protein that directly binds RNA.

RNA:DNA hybrid: a nucleic acid structure in which an RNA is annealed to its DNA template. Depending on its origin, the RNA moiety can be fully embedded in DNA or exhibits unligated 3' and/or 5' ends.

response (DDR), counteracts toxic ligase IV-mediated repair of ssDSBs, events that underlie the high sensitivity of ATM-deficient cells to CPT derivatives [29]. It is proposed that ATM activity at ssDSBs allows KU and DNA-PKcs removal to prevent aberrant ligation events, promoting instead HR-mediated repair (Figure 1B) [30]. In addition, in the absence of **BRCA1**, NHEJ has been involved in the formation of microhomology-mediated tandem duplications occurring at a site-specific replication fork barrier, a type of rearrangement akin to a mutational signature observed in ovarian cancers lacking BRCA1 [31]. Although NHEJ is cell cycle regulated with CYREN (cell cycle regulator of NHEJ), preventing KU binding to break sites with overhangs in S and G₂ phase [32], little is known about the regulation of NHEJ activity once core components are engaged at ssDSBs or reversed forks. Such knowledge is necessary to improve cancer treatment and overcome chemoresistance. The emerging role of noncoding RNAs (ncRNAs) in fostering the DDR and the fact that several NHEJ components are identified in large-scale proteomic studies as putative **RNA binding proteins (RBPs)** point toward a role for RNA in regulating NHEJ activity.

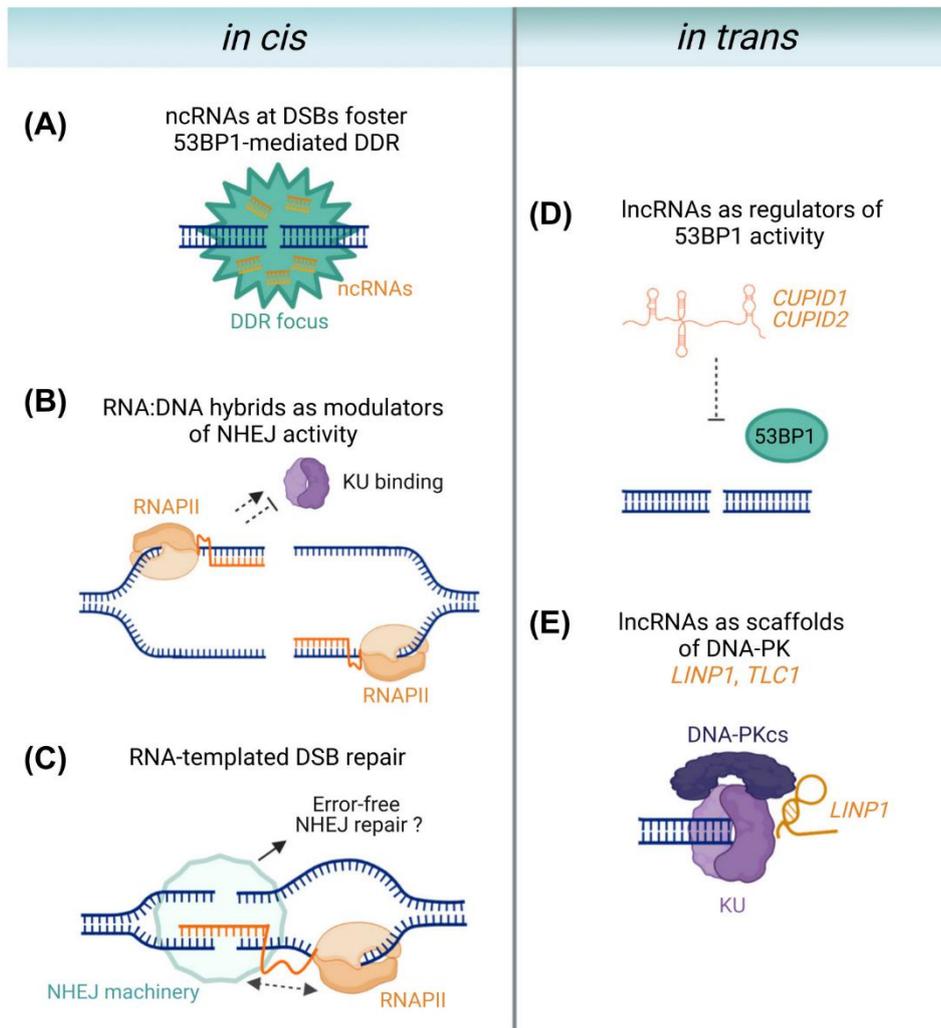
RNAs as regulators of genome stability at DNA damage sites

RNAs have emerged as having opposite roles in genome maintenance and in promoting genome instability [33]. RNAs act through several means (Figure 2): (i) *de novo* transcribed RNAs at DNA damage sites foster DDR, (ii) RNAs acting as scaffolds for the association of DDR factors to modulate repair activities, and (iii) RNAs associated to the DNA template interfering with DNA repair processes but also leading to DNA injuries. We discuss how those three RNA facets could contribute to modulation of NHEJ activities at RS sites.

RNAs at DSB sites

Recent work has revealed that deDSBs in mammalian cells can behave as RNAPII promoters to generate **damage-induced long ncRNAs** (referred to as '**dilncRNAs**') from both sides of deDSBs (Box 1) [34–37]. The MRN complex triggers RNAPII recruitment and activity at deDSBs before engagement toward the step of end resection [34,38]. dilncRNAs can then contribute to **RNA:DNA hybrids** and double-stranded RNA (dsRNA) formation, the latest being processed into shorter DNA damage response RNAs (DDRNs). DDRNs, together with dilncRNAs, contribute to the focal assembly of deDSB signaling and repair factors such as the NHEJ factor 53BP1 (Figure 2A), a topic that has recently been reviewed in depth [33,35,38]. Interestingly, RNA:DNA hybrids have been detected at deDSBs in both yeast and human cells, and several mechanisms underly their formation (Figure 2B and C) [36,39–45]. First, nascent dilncRNAs may anneal to the resected DNA ends (Figure 2B). Second, following RNAPII stalling favored by deDSB induction, pre-existing nascent RNAs may be liable to anneal with the DNA template, akin to cotranscriptional R-loop formation (Figure 2C). One unanswered question in the field is to determine whether the RNA moiety of RNA:DNA hybrids corresponds to pre-existing nascent RNA or to *de novo* transcription at deDSB sites, though a recent study in humans supports the last hypothesis [44].

Moreover, it is currently unclear the extent to which RNA:DNA hybrids are obligatory intermediates during deDSB repair or are rather opportunistic by-products of RNAPII activity, a point discussed in depth elsewhere [46]. In human cells, RNA:DNA hybrids have been proposed to help recruiting HR factors such as BRCA1 and **BRCA2** (Box 1) [43]. Akin to findings in fission yeast, RNA:DNA hybrids were proposed to limit ssDNA exposure and to protect ssDNA 3'-overhang from degradation in human cells [39,44]. Despite acting positively on DNA repair, there is a need for RNA:DNA hybrid clearance at deDSBs. Indeed, long RNA:DNA hybrids inhibit the long-range resection mediated by Exo1 *in vitro* [47]. Consistent with this, several studies reported that RNA:DNA hybrid dismantling activities are at work at deDSB sites, including human senataxin, RNaseH2, the exosome, and the DDX1 and DDX5 RNA helicase [40,43,48–50]. An emerging view



Trends in Genetics

Figure 2. Regulation of non-homologous end-joining (NHEJ) by RNAs *in cis* and *in trans*. (A) The synthesis of noncoding RNAs (ncRNAs) at double-ended double-strand breaks (deDSBs) fosters DNA damage response (DDR) signaling, allowing 53BP1-dependent DDR focus formation by phase separation. (B) RNA:DNA hybrids at deDSBs can positively or negatively modulate the recruitment of NHEJ factors. (C) At deDSBs in transcribed regions, pre-existing transcripts may form RNA:DNA hybrids to stabilize the DNA extremities, thereby potentially promoting an error-free and RNA-templated NHEJ repair pathway. Interactions between the NHEJ and RNA polymerase II (RNAPII) machineries may help such RNA-templated NHEJ repair (*double dashed arrow*). (D) Long noncoding RNAs (lncRNAs) such as *CUPID1* and *CUPID2* limit the antiresection function of 53BP1 at deDSBs. (E) lncRNAs such as *LINP1* and *TLC1* act as scaffolds to stimulate DNA-PK kinase activity toward ligation events (see main text for details).

from the literature is that persistent RNA:DNA hybrids at deDSBs constitute an impediment to DSB repair, making deDSBs more prone to engage in translocation events [40]. However, recent work has challenged this view, suggesting that, depending on the context, RNA:DNA hybrids, broadly RNA species, at deDSBs influence repair pathway choice, as further discussed.

RNAs during DNA replication

Many ribonucleotides are present in the DNA template during replication (Figure 3A, Key Figure). The three main eukaryotic replicative polymerases (Pol α , Pol δ , and Pol ϵ) trigger the misincorporation

Box 1. Focal RNAs at deDSBs: synthesis and functions

At deDSBs, MRN allows RNAPII recruitment for *de novo* synthesis of RNAs called diIncRNAs at both DNA ends [34,36,37,44] (Figure I). At transcribed regions, diIncRNAs are complementary to pre-existing transcripts to form double-stranded RNAs that are further processed by RNase III enzymes such as human DICER to generate DDRNAs of ~21 ribonucleotides in size [35,37,42]. Also, when targeting DSBs within repeated sequences, multiple DSB-induced transcription events would generate complementary diIncRNAs to form dsRNAs. At a nontranscribed and unique region, bidirectional transcription from both sides of DSBs would generate complementary diIncRNAs to form dsRNAs. DDRNAs are involved in multiple ways within the repair, from constituting sequence-specific targets for DDR factor recruitment to fine-tuning the repair process itself. For instance, DDRNAs, together with diIncRNAs, are reported to foster DDR signaling by promoting phase separation [38]. Focal RNAs at deDSBs may form RNA:DNA hybrids acting positively by favoring repair factor recruitment or when persisting, creating a need for the recruitment of RNA:DNA hybrid dismantling activities [39–41,43,49,50].

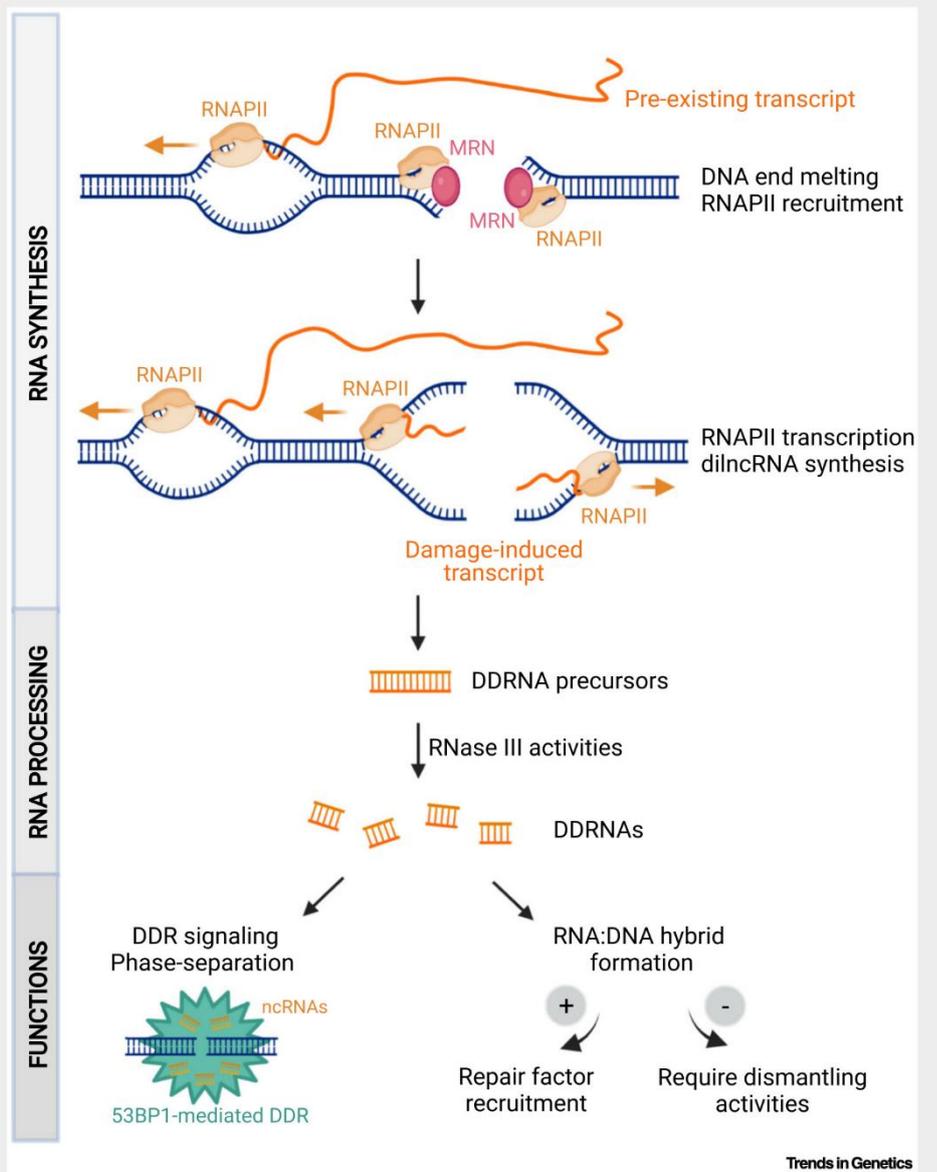


Figure I. Synthesis, processing, and functions of RNAs at double-strand break. RNAPII, orange; MRN, pink circles. See text box for details.

Key Figure

RNAs and non-homologous end-joining (NHEJ) at replication forks

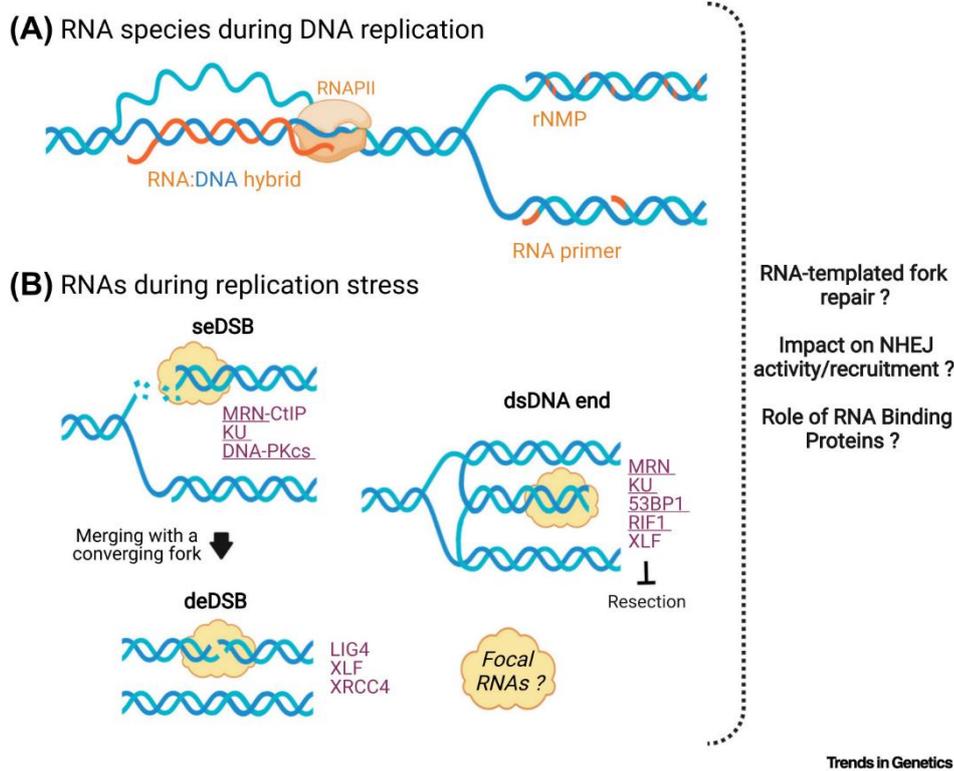


Figure 3. (A) RNA species coexisting with the DNA replication process: cotranscriptional R-loops, ribonucleomonophosphates (rNMPs) incorporated by DNA polymerases, and RNA primers of Okazaki fragments forming RNA:DNA hybrids. As proposed at double-ended double-strand breaks (deDSBs), those RNA species may play a role in modulating NHEJ activity as well as promoting RNA-templated fork repair. (B) Replication stress induces single-ended DSBs (seDSBs) that can be further converted to deDSBs (left panel), or it induces fork reversal, providing a double-ended DNA end. As shown at deDSBs, RNA polymerase II (RNAPII) may engage at those DNA ends to generate focal RNAs at replication stress sites (represented as a yellow cloud) with a potential role in fostering DDR signaling, in promoting RNA-templated fork repair, and in modulating NHEJ activity during replication. NHEJ factors identified in large-scale proteomic studies as putative RNA binding proteins (RBPs) are underscored. *Blue and orange lines* indicate DNA and RNA, respectively.

of ribonucleomonophosphates into newly synthesized DNA at an average of one ribonucleotide per 1.5–2 kb in human cells [33]. DNA-embedded ribonucleotides provide a signal of strand specificity to guide mismatch repair [51]. When not removed by RNase H activities, stretches of ribonucleotides impair fork progression and the resolution of topological constraint by topoisomerase I [33]. Besides, on the lagging strand template, the Pol α -primase synthesizes short RNA-DNA primers that are subsequently extended by Pol δ to form **Okazaki fragments** [52]. Though quickly matured after fork passage, primase-mediated RNA primers occur every 100–300 bp and thus constitute an unavoidable source of RNA:DNA hybrids during DNA replication. Their potential influence on fork repair, as described for deDSB repair, is unknown (Figure 3A).

Whether a focal RNA-mediated DDR occurs at RS sites remains poorly documented (Figure 3B). Both dsDNA ends formed at a reversed fork, and seDSBs engage classical DDR factors such as KU, MRN, and 53BP1 to foster ATM signaling [53], which raises the possibility that a focal DDRNA response may take place at RS sites, as described for deDSBs. In support of this, replication-blocking agents and difficult-to-replicate genomic elements lead to the production of a particular class of ncRNAs, called 'qiRNA' in *Neurospora crassa* [54,55]. The biogenesis of qiRNA requires **the quelling pathway**, an RNAi-related mechanism, as well as active DNA replication, the ssDNA binding protein replication protein A (RPA), and HR factors. Interestingly, qiRNA helps to avoid EJ events within repeated sequences, leading to genome instability, but the precise underlying mechanism remains unknown.

Physiological R-loops form dynamically at transcription promoters, terminators, and in gene bodies to regulate gene expression [56,57]. Unresolved R-loops worsen transcription–replication conflicts, leading to fork stalling and, when enzymatically cleaved, to DSBs. In human cells, nascent chromatin is transcriptionally silent and inaccessible to RNA polymerases. Transcription restart, which contributes to the maturation of postreplicative chromatin, is timely separated from the DNA replication process [58]. However, several RNA helicases, such as the yeast Sen1, and human RNA helicases, such as DDX1, DDX5, DDX21, and DHX9, associate with replication forks to unwind potential R-loops and, upon RS, to avoid their formation *de novo* behind stalled forks, especially when the replication factor PCNA is not timely unloaded from nascent DNA [59–61]. It indicates that in some circumstances, RNAPII can engage shortly after fork passage. A better understanding of the coordination of the transcription activity with fork progression and processing is necessary to appreciate how RNAs present at RS sites contribute to genome maintenance and maybe to fork repair pathway choice (Figure 3).

RNAs regulate NHEJ activities

Recently, large-scale proteomic studies identified numerous DDR and NHEJ proteins as putative RBPs, albeit most of them do not carry classically characterized RNA binding domains (Table 1) [62–68]. We detail below how the potential association of these proteins with RNAs could modulate NHEJ activity, especially in an RS context.

Recent studies showed that 53BP1 foci form in a transcription- and RNA-dependent manner at deDSB sites (Figure 2A) [35,38,69]. RNA immunoprecipitation assays have shown that 53BP1 associates with RNAs and DDRNAs [36,70]. Large-scale proteomic studies also identified 53BP1 as a candidate protein directly interacting with RNA [66,67]. Of note, 53BP1 and MRE11 contain a GAR domain, known to be responsible for direct RNA binding in other proteins [71–73]. It is possible that RNAs transcribed at deDSBs help to recruit 53BP1 and other NHEJ proteins while fostering its intrinsic ability to promote phase separation, a step necessary to recruit downstream DNA repair factors [38]. However, direct evidence that the ability of 53BP1 to bind RNAs is a key property to ensure 53BP1-dependent DDR signaling is still missing. In addition, a characterized RBP (called 'TIRR') interacts with 53BP1 and masks its Tudor domain, which itself binds methylated histones and the dimethylated form of the cell cycle regulator p53 [74,75]. It cannot be excluded that DSB-induced RNA production at deDSBs acts in *trans* to displace TIRR–53BP1 interaction, making 53BP1 available for recruitment to deDSBs in a histone-dependent manner. Additional knowledge is needed to establish how the potential RBP feature of 53BP1, as well as other DDR factors, contribute to DNA damage signaling and repair. Interestingly, the recruitment of 53BP1 to deDSBs is increased following the silencing of the two estrogen-regulated *CUPID1* and *CUPID2* long ncRNAs concomitant with a reduced deDSB end resection in human breast cancer cell lines (Figure 2D) [76]. Although the underlying mechanism is still unknown, this illustrates the possibility that ncRNAs may modulate the

Table 1. RNA-associated end-joining factors and double-strand break sensors identified in large-scale proteomic studies

	Complex	Protein	Gene	Refs	
cNHEJ	–	ARTEMIS	<i>DCLRE1C</i>	[62]	
	DNA-PK	DNA-PKcs	<i>PRKDC</i>	[62–67]	
		KU80	<i>XRCC5</i>	[62–68]	
		KU70	<i>XRCC6</i>	[62–68]	
DSB sensor	MRN	MRE11	<i>MRE11-A</i>	[66]	
		RAD50	<i>RAD50</i>	[66]	
	–	PARP-1	<i>PARP-1</i>	[63,65–67]	
cNHEJ substitutes	SFPQ-NONO	SFPQ	<i>SFPQ</i>	[62–68]	
		NONO	<i>NONO</i>	[62–68]	
NHEJ modulators	–	RBM14	<i>RBM14</i>	[62–68]	
	–	53BP1	<i>53BP1</i>	[66,67]	
	–	RIF1	<i>RIF1</i>	[62,66,67]	
	–	RAP1	<i>RAP1</i>	[65,67]	
	–	SUMO1	<i>SUMO1</i>	[66,67]	
	–	MDC1	<i>MDC1</i>	[62,66,67]	
	–	Cohesin	SMC1-A	<i>SMC1-A</i>	[66,67]
	–	–	SMC3	<i>SMC3</i>	[66,67]
		SA-2	<i>SA-2</i>	[67]	

cNHEJ, Canonical non-homologous end-joining; DSB, double-strand break; NHEJ, non-homologous end-joining.

antiresection function of 53BP1, a potentially appealing mechanism of fork protection by 53BP1. Altogether, this raises the question of modulation of 53BP1 functions, both at deDSBs and at RS sites, by its association with RNAs.

Direct RNA binding is a conserved function of KU that tends to bind to structured RNA stem loops with bulged-out nucleotides and RNA **G-quadruplexes** [77–79]. KU interacts with a number of different RNAs, including the telomerase RNA *TLC1* for telomere end maintenance, mRNAs, and ncRNAs such as *LINP1* (lncRNA in NHEJ pathway 1) [80–83]. KU binds to several structured RNA motifs in *LINP1*, which itself is capable of forming phase-separated condensates through RNA–RNA interaction, to promote KU multimerization and stabilization of the initial synaptic event for NHEJ (Figure 2E) [79]. *LINP1* also acts as a scaffold that stabilizes the interaction between KU80 and DNA-PKcs, thereby promoting NHEJ and radiation resistance in human triple-negative breast cancer cells, where *LINP1* is overexpressed [82]. Whether *LINP1* is involved in modulating NHEJ activity during S phase is currently unknown. Importantly, KU binding to the telomerase RNA can stimulate the kinase activity of DNA-PKcs that therefore mediates protein phosphorylation in an RNA-dependent manner [84]. Although less molecularly documented, the lncRNA *LRIK*, the expression of which increases upon induction of DSBs, associates with KU to enhance the recruitment of cNHEJ factors to damaged chromatin and repair activity [85]. Such discoveries highlight the potential of scaffolding RNAs in the regulation of NHEJ activity.

RNA-templated DNA repair is an emerging mode of repair in the field of DSB repair; yet, the underlying mechanisms are only beginning to be elucidated [33]. Pioneering work in yeast has revealed how the HR process used an RNA template for homology-based repair, a potentially

useful mechanism when the intact sister chromatid is not available for repair [86]. Thus, it is worth considering that RNA biogenesis at deDSBs occurs when all DNA templates are cut by engineered nucleases employed to target DSBs at specific loci, making DNA-templated DSB repair unavailable. In humans, deDSBs at actively transcribed chromatin are preferentially repaired by HR, but recent work showed that RNA transcripts can also guide deDSB repair by NHEJ (Figure 2C) [33,87]. Mammalian NHEJ factors (such as ligase IV, 53BP1, KU, DNA-PKcs, PNKP, XRCC4) interact with the elongating RNAPII and/or proteins involved in RNA processing, such as SETX and XRN2 [88–90]. In human embryonic cells, the nascent RNA, pre-existent to deDSB induction, may anneal to the broken DNA matrix to form an RNA:DNA hybrid, acting as an anchor to stabilize DNA ends and facilitate NHEJ repair and/or potentially serving as a template for an RNA-dependent DNA polymerase [90]. Additionally, KU and the intrinsically disordered RNA-binding protein RBM14 were proposed to trigger RNAPII-dependent RNA:DNA hybrid formation at deDSBs, underscoring the profound and complex relationship between NHEJ and RNAs [90]. Interestingly, human KU binds to RNA:DNA hybrids, though with twice less affinity than to dsDNA [91]. In yeast, the persistence of RNA:DNA hybrid structures at deDSBs favors KU binding and may engage deDSB repair toward NHEJ instead of HR [45]. Nonetheless, opposite conclusions were drawn in human cells in which unresolved RNA:DNA hybrids would act as a barrier against cNHEJ [88]. Further investigations are needed to clarify the role of RNA:DNA hybrids in DSB repair pathway choice, likely modulated by the way they form, their associated epigenetic modifications, and the chromatin environment [92,93].

RNA-templated DSB repair by NHEJ raises questions about its fidelity. EJ-related polymerases can accommodate ribonucleotide incorporation at repair junctions to favor the ligation step during NHEJ [94]. Plasmid-based assays showed that association of cNHEJ factors with mRNAs favors error-free repair, but investigating the fidelity of NHEJ repair at chromosomal breaks *in vivo* remains challenging [90]. Indeed, at nuclease-induced deDSBs, error-free repair by NHEJ would restore the intact DNA sequence liable to successive rounds of cleavage repair, as shown in yeast [95]. Thus, if RNA-templated NHEJ repair favors an error-free repair mode, this could mask the potential action of NHEJ at transcribed genes.

Whether RNA:DNA hybrids at RS sites modulate the recruitment of NHEJ factors and their activities is an open question (Figure 3). Interestingly, two pathways of replication fork protection were recently revealed in human cells, which may reflect the presence of distinct nucleic acid substrates at reversed forks [26]. RNA-templated fork repair is so far poorly documented, but *in vitro* studies indicate that nascent RNAs at stalled RNAPII can be used to initiate DNA synthesis [96]. Recently, the human and yeast RPA, a well-characterized ssDNA binding protein, was found to bind RNA and to drive RNA:DNA hybrid formation *in vitro* from which DNA synthesis can be primed [97].

Concluding remarks

NHEJ acts in several ways at halted forks to sustain replication dynamics, contributing to the survival of cancer cells in the presence of replication-blocking agents. However, the use of NHEJ during replication is at risk of increased chromosomal rearrangements. Largely speaking, the proximity of NHEJ factors to nascent RNAs or RNA:DNA hybrids and their potential to associate with RNA-containing molecules are likely to represent a level of regulation that is underappreciated yet crucial in fine-tuning the NHEJ pathway. Little is known about the atlas of RS-induced ncRNAs, and defining the role of RNAs at RS sites will be of major importance. Recently, ncRNAs were found enriched at unperturbed replication forks. Many RNAs associate *in trans*, meaning that their synthesis is uncoupled from DNA replication, but repeat-containing ncRNAs associate *in cis*, suggesting that they are transcribed shortly after fork passage [98]. Those RNAs remain

Outstanding questions

Are RNAs transcribed at replication stress sites, as described at deDSBs, and what are the molecular mechanisms involved in such focal RNA synthesis? How is transcription coordinated with the processing of halted replication forks? To what extent is such cross-talk instrumental in maintaining replication fork stability and in sustaining replication dynamics upon replication stress? Understanding these mechanisms could open exciting opportunities to improve anticancer therapy.

What is the repertoire of replication stress-induced ncRNAs? How is their biogenesis related to replication fork passage and fork stalling? Are there ncRNAs acting *in cis* or *in trans* to modulate NHEJ activity and guide replication fork repair pathway choice?

Are DNA-embedded ribonucleotides associated with the process of DNA replication instrumental to replication fork repair? How do such ribonucleotides influence the binding of NHEJ factors to various fork substrates, including seDSBs, deDSBs, and dsDNA ends from reversed forks? How are DNA-embedded ribonucleotides at halted forks used to modulate NHEJ?

Are NHEJ and DDR factors directly interacting with RNAs? Is direct RNA binding important for their DNA repair function and DNA damage signaling functions? Do they contain noncanonical RNA binding domains? Do they contain multiple RNA binding domains, each involved in specific functions for deDSB repair versus replication fork repair?

The role of NHEJ in resolving replication stress is exacerbated in cancer cells, contributing to their survival to replication-blocking agents. ncRNAs play critical roles during tumorigenesis by functioning as scaffolds to regulate protein–protein or protein–nucleic acid interactions. Can NHEJ-modulatory ncRNAs be targeted to synergize with actual DNA-damaging strategies used for cancer therapy?

associated with chromatin across the cell cycle, suggesting a role in chromatin maturation. Identifying the repertoire of RNAs associated in *cis* or in *trans* with halted replication forks and elucidating their functions will provide key knowledge to appreciate how RNAs modulate replication fork repair and NHEJ activity to maintain genome stability (Outstanding questions). RNA-templated fork repair and the contribution of DNA-embedded RNA species on fork repair pathway choice need to be investigated. RNAs at RS sites may help to create a signaling hub to integrate a 'decision point' toward NHEJ activity. More generally speaking, there is a need to investigate whether NHEJ and DDR factors directly interact with RNAs and if such binding is important for their repair and DNA damage signaling functions. Such research paths could pave the way for the identification of novel anticancer targets.

Acknowledgments

This work was supported by funding from Institut Curie, CNRS, and INSERM to S.L. and S.V., as well as by the ANR grant REDEFINE (ANR-19-CE12-0016-03) to S.L. and Ligue contre le cancer Equipe Labellisée 2020 (EL2020LNCC/Sal) to S.L. and S.V. C.A. was funded by a French governmental fellowship and a fourth-year PhD grant from Fondation ARC.

Declaration of interests

We confirm the declaration of interests statement.

References

- Ciccia, A. and Elledge, S.J. (2010) The DNA damage response: making it safe to play with knives. *Mol. Cell* 40, 179–204
- Ait Saada, A. *et al.* (2018) Preserving replication fork integrity and competence via the homologous recombination pathway. *DNA Repair (Amst)* 71, 135–147
- Zhao, B. *et al.* (2020) The molecular basis and disease relevance of non-homologous DNA end joining. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 21, 765–781
- Marini, F. *et al.* (2019) Regulation of DNA double strand breaks processing: focus on barriers. *Front. Mol. Biosci.* 6, 55
- Zeman, M.K. and Cimprich, K.A. (2014) Causes and consequences of replication stress. *Nat. Cell Biol.* 16, 2–9
- Saintigny, Y. *et al.* (2001) Characterization of homologous recombination induced by replication inhibition in mammalian cells. *EMBO J.* 20, 3861–3870
- Miyoshi, T. *et al.* (2009) Fission yeast Ku protein is required for recovery from DNA replication stress. *Genes Cells* 14, 1091–1103
- Ribeyre, C. *et al.* (2016) Nascent DNA proteomics reveals a chromatin remodeler required for topoisomerase I loading at replication forks. *Cell Rep.* 15, 300–309
- Mukherjee, C. *et al.* (2019) RIF1 promotes replication fork protection and efficient restart to maintain genome stability. *Nat. Commun.* 10, 3287
- Dungrawala, H. *et al.* (2015) The replication checkpoint prevents two types of fork collapse without regulating replisome stability. *Mol. Cell* 59, 998–1010
- Kais, Z. *et al.* (2016) FANCD2 maintains fork stability in BRCA1/2-deficient tumors and promotes alternative end-joining DNA repair. *Cell Rep.* 15, 2488–2499
- Wang, Z. *et al.* (2019) DNA polymerase (POLQ) is important for repair of DNA double-strand breaks caused by fork collapse. *J. Biol. Chem.* 294, 3909–3919
- Chappidi, N. *et al.* (2020) Fork cleavage-religation cycle and active transcription mediate replication restart after fork stalling at co-transcriptional R-loops. *Mol. Cell* 77, 528–541
- Joshi, R.R. *et al.* (2019) DNA ligase IV prevents replication fork stalling and promotes cellular proliferation in triple negative breast cancer. *J. Nucleic Acids* 2019, 9170341
- Ensminger, M. and Löbrich, M. (2020) One end to rule them all: non-homologous end-joining and homologous recombination at DNA double-strand breaks. *Br. J. Radiol.* 93, 20191054
- Whelan, D.R. *et al.* (2020) Super-resolution visualization of distinct stalled and broken replication fork structures. *PLoS Genet.* 16, e1009256
- Jones, C.E. and Forsburg, S.L. (2021) Monitoring *Schizosaccharomyces pombe* genome stress by visualizing end-binding protein Ku. *Biol. Open* 10, bio054346
- Foster, S.S. *et al.* (2011) Functional interplay of the Mre11 nuclease and Ku in the response to replication-associated DNA damage. *Mol. Cell Biol.* 31, 4379–4389
- Teixeira-Silva, A. *et al.* (2017) The end-joining factor Ku acts in the end-resection of double strand break-free arrested replication forks. *Nat. Commun.* 8, 1982
- Mimitou, E.P. and Symington, L.S. (2010) Ku prevents Exo1 and Sgs1-dependent resection of DNA ends in the absence of a functional MRX complex or Sae2. *EMBO J.* 29, 3358–3369
- Balestrini, A. *et al.* (2013) The Ku heterodimer and the metabolism of single-ended DNA double-strand breaks. *Cell Rep.* 3, 2033–2045
- Chanut, P. *et al.* (2016) Coordinated nuclease activities counteract Ku at single-ended DNA double-strand breaks. *Nat. Commun.* 7, 12889
- Pasero, P. and Vindigni, A. (2017) Nucleases acting at stalled forks: how to reboot the replication program with a few shortcuts. *Annu. Rev. Genet.* 51, 477–499
- Berti, M. *et al.* (2020) The plasticity of DNA replication forks in response to clinically relevant genotoxic stress. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 21, 633–651
- Sánchez, A. and Russell, P. (2015) Ku stabilizes replication forks in the absence of Brc1. *PLoS One* 10, e0126598
- Liu, W. *et al.* (2020) Two replication fork remodeling pathways generate nuclease substrates for distinct fork protection factors. *Sci. Adv.* 6, eabc3598
- Garzón, J. *et al.* (2019) Human RIF1-protein phosphatase 1 prevents degradation and breakage of nascent DNA on replication stalling. *Cell Rep.* 27, 2558–2566
- Chen, B.R. *et al.* (2019) XLF and H2AX function in series to promote replication fork stability. *J. Cell Biol.* 218, 2113–2123
- Balmus, G. *et al.* (2019) ATM orchestrates the DNA-damage response to counter toxic non-homologous end-joining at broken replication forks. *Nat. Commun.* 10, 87
- Britton, S. *et al.* (2020) ATM antagonizes NHEJ proteins assembly and DNA-ends synapsis at single-ended DNA double strand breaks. *Nucleic Acids Res.* 48, 9710–9723
- Willis, N.A. *et al.* (2017) Mechanism of tandem duplication formation in BRCA1-mutant cells. *Nature* 551, 590–595
- Arnoult, N. *et al.* (2017) Regulation of DNA repair pathway choice in S and G₂ phases by the NHEJ inhibitor CYREN. *Nature* 549, 548–552

33. Zong, D. *et al.* (2020) RNA: a double-edged sword in genome maintenance. *Nat. Rev. Genet.* 21, 651–670
34. Sharma, S. *et al.* (2021) MRE11-RAD50-NBS1 complex is sufficient to promote transcription by RNA polymerase II at double-strand breaks by melting DNA ends. *Cell Rep.* 34, 108565
35. Francia, S. *et al.* (2012) Site-specific DICER and DROSHA RNA products control the DNA-damage response. *Nature* 488, 231–235
36. Michelini, F. *et al.* (2017) Damage-induced lncRNAs control the DNA damage response through interaction with DDRNAs at individual double-strand breaks. *Nat. Cell Biol.* 19, 1400–1411
37. Bonath, F. *et al.* (2018) Next-generation sequencing reveals two populations of damage-induced small RNAs at endogenous DNA double-strand breaks. *Nucleic Acids Res.* 46, 11869–11882
38. Pessina, F. *et al.* (2019) Functional transcription promoters at DNA double-strand breaks mediate RNA-driven phase separation of damage-response factors. *Nat. Cell Biol.* 21, 1286–1299
39. Ohle, C. *et al.* (2016) Transient RNA-DNA hybrids are required for efficient double-strand break repair. *Cell* 167, 1001–1013
40. Cohen, S. *et al.* (2018) Senataxin resolves RNA:DNA hybrids forming at DNA double-strand breaks to prevent translocations. *Nat. Commun.* 9, 533
41. Yasuhara, T. *et al.* (2018) Human Rad52 promotes XPG-mediated R-loop processing to initiate transcription-associated homologous recombination repair. *Cell* 175, 558–570
42. Lu, W.T. *et al.* (2018) Drosha drives the formation of DNA:RNA hybrids around DNA break sites to facilitate DNA repair. *Nat. Commun.* 9, 532
43. D'Alessandro, G. *et al.* (2018) BRCA2 controls DNA:RNA hybrid level at DSBs by mediating RNase H2 recruitment. *Nat. Commun.* 9, 5376
44. Liu, S. *et al.* (2021) RNA polymerase III is required for the repair of DNA double-strand breaks by homologous recombination. *Cell* 184, 1314–1329
45. Rawal, C.C. *et al.* (2020) Senataxin ortholog Sen1 limits DNA:RNA hybrid accumulation at DNA double-strand breaks to control end resection and repair fidelity. *Cell Rep.* 31, 107603
46. Domingo-Prim, J. *et al.* (2020) RNA at DNA double-strand breaks: the challenge of dealing with DNA:RNA hybrids. *BioEssays* 42, 1900225
47. Daley, J.M. *et al.* (2020) Specificity of end resection pathways for double-strand break regions containing ribonucleotides and base lesions. *Nat. Commun.* 11, 3088
48. Domingo-Prim, J. *et al.* (2019) EXOSC10 is required for RPA assembly and controlled DNA end resection at DNA double-strand breaks. *Nat. Commun.* 10, 2135
49. Sessa, G. *et al.* (2021) BRCA2 promotes DNA-RNA hybrid resolution by DDX5 helicase at DNA breaks to facilitate their repair. *EMBO J.* 40, e106018
50. Li, L. *et al.* (2016) DEAD box 1 facilitates removal of RNA and homologous recombination at DNA double-strand breaks. *Mol. Cell Biol.* 36, 2794–2810
51. Ghodgaonkar, M.M. *et al.* (2013) Ribonucleotides misincorporated into DNA act as strand-discrimination signals in eukaryotic mismatch repair. *Mol. Cell* 50, 323–332
52. Burgers, P.M.J. and Kunkel, T.A. (2017) Eukaryotic DNA replication fork. *Annu. Rev. Biochem.* 86, 417–438
53. Schmid, J.A. *et al.* (2018) Histone ubiquitination by the DNA damage response is required for efficient DNA replication in unperturbed S phase. *Mol. Cell* 71, 897–910
54. Yang, Q. *et al.* (2015) Mechanism of siRNA production from repetitive DNA. *Genes Dev.* 29, 526–537
55. Zhang, Z. *et al.* (2013) Homologous recombination as a mechanism to recognize repetitive DNA sequences in an RNAi pathway. *Genes Dev.* 27, 145–150
56. Crossley, M.P. *et al.* (2019) R-loops as cellular regulators and genomic threats. *Mol. Cell* 73, 398–411
57. Garcia-Muse, T. and Aguilera, A. (2019) R loops: from physiological to pathological roles. *Cell* 179, 604–618
58. Stewart-Morgan, K.R. *et al.* (2019) Transcription restart establishes chromatin accessibility after DNA replication. *Mol. Cell* 75, 284–297
59. Appanah, R. *et al.* (2020) Sen1 is recruited to replication forks via Ctf4 and Mrc1 and promotes genome stability. *Cell Rep.* 30, 2094–2105 e9
60. Kim, S. *et al.* (2020) ATAD5 restricts R-loop formation through PCNA unloading and RNA helicase maintenance at the replication fork. *Nucleic Acids Res.* 48, 7218–7238
61. Alzu, A. *et al.* (2012) Senataxin associates with replication forks to protect fork integrity across RNA-polymerase-II-transcribed genes. *Cell* 151, 835–846
62. Conrad, T. *et al.* (2016) Serial interactome capture of the human cell nucleus. *Nat. Commun.* 7, 11212
63. Baltz, A.G. *et al.* (2012) The mRNA-bound proteome and its global occupancy profile on protein-coding transcripts. *Mol. Cell* 46, 674–690
64. Beckmann, B.M. *et al.* (2015) The RNA-binding proteomes from yeast to man harbour conserved enigmRBPs. *Nat. Commun.* 6, 10127
65. Huang, R. *et al.* (2018) Transcriptome-wide discovery of coding and noncoding RNA-binding proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 115, 3879–3887
66. Queiroz, R.M.L. *et al.* (2019) Comprehensive identification of RNA-protein interactions in any organism using orthogonal organic phase separation (COPS). *Nat. Biotechnol.* 37, 169–178
67. Trendel, J. *et al.* (2019) The human RNA-binding proteome and its dynamics during translational arrest. *Cell* 176, 391–403
68. Castello, A. *et al.* (2016) Comprehensive identification of RNA-binding domains in human cells. *Mol. Cell* 63, 696–710
69. Bhatia, V. *et al.* (2018) Formation of 53BP1 foci and ATM activation under oxidative stress is facilitated by RNA:DNA hybrids and loss of ATM-53BP1 expression promotes photoreceptor cell survival in mice. *F1000 Res.* 7, 1233
70. Pryde, F. *et al.* (2005) 53BP1 exchanges slowly at the sites of DNA damage and appears to require RNA for its association with chromatin. *J. Cell Sci.* 118, 2043–2055
71. Boisvert, F.M. *et al.* (2005) The GAR motif of 53BP1 is arginine methylated by PRMT1 and is necessary for 53BP1 DNA binding activity. *Cell Cycle* 4, 1834–1841
72. Yu, Z. *et al.* (2012) The MRE11 GAR motif regulates DNA double-strand break processing and ATR activation. *Cell Res.* 22, 305–320
73. Thandapani, P. *et al.* (2013) Defining the RGG/RG motif. *Mol. Cell* 50, 613–623
74. Drané, P. *et al.* (2017) TIRR regulates 53BP1 by masking its histone methyl-lysine binding function. *Nature* 543, 211–216
75. Parnandi, N. *et al.* (2021) TIRR inhibits the 53BP1-p53 complex to alter cell-fate programs. *Mol. Cell* 10, 2583–2595
76. Betts, J.A. *et al.* (2017) Long noncoding RNAs CUPID1 and CUPID2 mediate breast cancer risk at 11q13 by modulating the response to DNA damage. *Am. J. Hum. Genet.* 101, 255–266
77. Dalby, A.B. *et al.* (2013) RNA recognition by the DNA end-binding Ku heterodimer. *RNA* 19, 841–851
78. Ting, N.S.Y. *et al.* (2005) Human Ku70/80 interacts directly with hTR, the RNA component of human telomerase. *Nucleic Acids Res.* 33, 2090–2098
79. Thapar, R. *et al.* (2020) Mechanism of efficient double-strand break repair by a long non-coding RNA. *Nucleic Acids Res.* 48, 10953–10972
80. Lamaa, A. *et al.* (2016) A novel cytoprotective function for the DNA repair protein Ku in regulating p53 mRNA translation and function. *EMBO Rep.* 17, 508–518
81. Adelmant, G. *et al.* (2012) DNA ends alter the molecular composition and localization of Ku multicomponent complexes. *Mol. Cell. Proteomics* 11, 411–421
82. Zhang, Y. *et al.* (2016) Long noncoding RNA LINP1 regulates repair of DNA double-strand breaks in triple-negative breast cancer. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 23, 522–530
83. Shao, Z. *et al.* (2020) DNA-PKcs has KU-dependent function in rRNA processing and haematopoiesis. *Nature* 579, 291–296
84. Ting, N.S.Y. *et al.* (2009) The human telomerase RNA component, hTR, activates the DNA-dependent protein kinase to phosphorylate heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1. *Nucleic Acids Res.* 37, 6105–6115
85. Wang, D. *et al.* (2020) LRIK interacts with the Ku70–Ku80 heterodimer enhancing the efficiency of NHEJ repair. *Cell Death Differ.* 27, 3337–3353
86. Meers, C. *et al.* (2016) DNA repair by RNA: templated, or not templated, that is the question. *DNA Repair* 44, 17–21

87. Aymard, F. *et al.* (2014) Transcriptionally active chromatin recruits homologous recombination at DNA double-strand breaks. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 21, 366–374
88. Dang, T.T. and Morales, J.C. (2020) Xrn2 links RNA: DNA hybrid resolution to double strand break repair pathway choice. *Cancers (Basel)* 12, 1821
89. Morales, J.C. *et al.* (2016) XRN2 links transcription termination to DNA damage and replication stress. *PLoS Genet.* 12, e1006107
90. Chakraborty, A. *et al.* (2016) Classical non-homologous end-joining pathway utilizes nascent RNA for error-free double-strand break repair of transcribed genes. *Nat. Commun.* 7, 13049
91. Wang, I.X. *et al.* (2018) Human proteins that interact with RNA: DNA hybrids. *Genome Res.* 28, 1405–1414
92. Puget, N. *et al.* (2019) Non-canonical DNA/RNA structures during transcription-coupled double-strand break repair: roadblocks or bona fide repair intermediates? *DNA Repair* 81, 102661
93. Abakir, A. *et al.* (2020) *N*⁶-methyladenosine regulates the stability of RNA:DNA hybrids in human cells. *Nat. Genet.* 52, 48–55
94. Pryor, J.M. *et al.* (2018) Ribonucleotide incorporation enables repair of chromosome breaks by nonhomologous end joining. *Science* 361, 1126–1129
95. Frank-Vaillant, M. and Marcand, S. (2002) Transient stability of DNA ends allows nonhomologous end joining to precede homologous recombination. *Mol. Cell* 10, 1189–1199
96. Sun, B. *et al.* (2018) Helicase promotes replication re-initiation from an RNA transcript. *Nat. Commun.* 9, 2306
97. Mazina, O.M. *et al.* (2020) Replication protein A binds RNA and promotes R-loop formation. *J. Biol. Chem.* 295, 14203–14213
98. Gylling, H.M. *et al.* (2020) Repeat RNAs associate with replication forks and post-replicative DNA. *RNA* 26, 1104–1117

Résultats supplémentaires

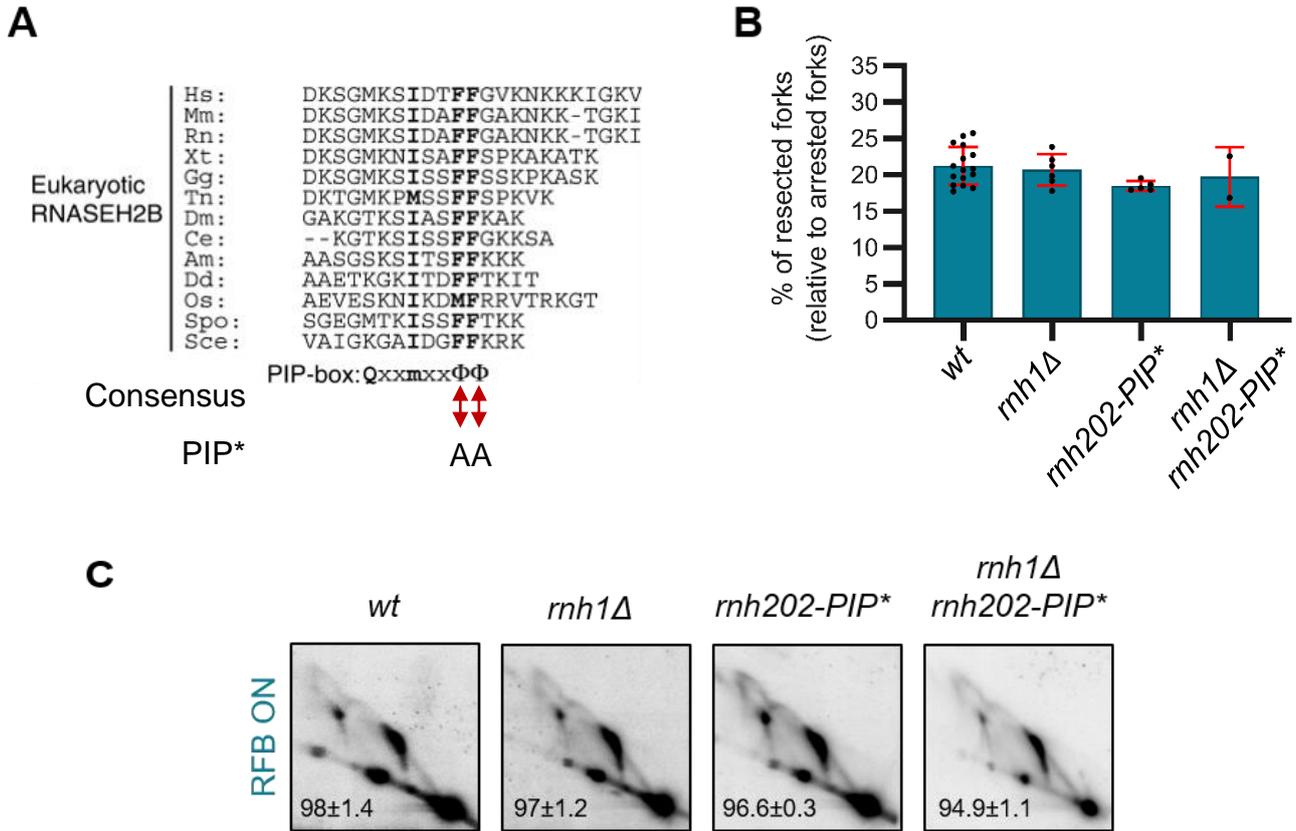


Figure 52 : La capacité de RNase H2 à promouvoir la résection ne dépend pas de son interaction avec PCNA. (A) Modifiée de (Chon *et al.*, 2009). Un motif PIP-box, *i.e.* le motif de liaison à PCNA, est présent dans la sous-unité Rnh202 de *S. pombe*. Ce motif est très conservé chez les eucaryotes. Chez le mutant PIP* de *S. pombe*, les phénylalanines (F) 289 et 290 ont été remplacé par des alanines (A). (B) Quantification des fourches bloquées résectées dans les différents fonds génétiques indiqués. Les points représentent les valeurs obtenues à partir de répliquas biologiques indépendants. Chaque barre représente la moyenne de ces valeurs ± l'écart-type. (C) Images représentatives de l'analyse par 2DGE des intermédiaires de réplication lorsque le blocage de fourches est induit (RFB ON), dans les différentes souches indiquées. L'efficacité du blocage dans chaque fond génétique est indiqué ± l'écart-type.

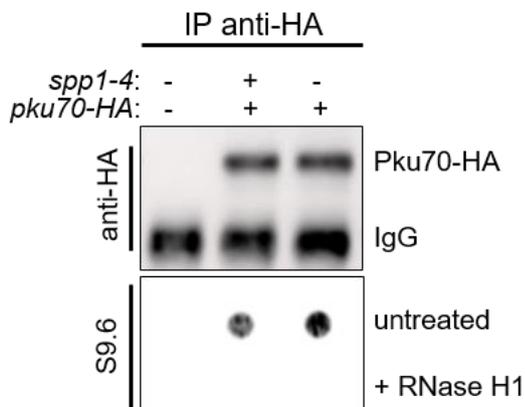


Figure 53 : La fixation de Ku aux hybrides ARN:ADN en réponse au stress répliatif semble être en partie dépendante de l'activité de la primase. (Voir Figure 6, publication #1). L'immunoprécipitation de Pku70-HA avec un anticorps anti-HA est réalisée après 24h d'induction de l'expression du mutant thermosensible de la primase (*spp1-4*, à 32°C), suivi de 4h de traitement avec 20μM de CPT. Panel du haut : La position de Pku70-HA et des IgG est indiquée sur les immunoblots. Panel du bas : détection des hybrides ARN:ADN par dotblot, en utilisant l'anticorps S9.6. Le traitement *in vitro* avec RNase H1 permet d'apprécier la spécificité du signal.

Les résultats présentés en [publication #1](#) mettent en lumière un rôle de RNase H2 aux fourches de réplication bloquées pour l'initiation de la dégradation des brins naissants. RNase H2 possède un domaine de fixation à PCNA, très bien conservé, situé dans la sous-unité Rnh202 chez *S. pombe* (Chon *et al.*, 2009). Il est proposé que cette interaction serve à guider l'action de RNase H2 aux fourches de réplication, même si à ce jour, aucun phénotype distinct n'a été associé à la perte de cette interaction. Je me suis demandée si la fonction de RNase H2 pour la résection des fourches bloquées pouvait dépendre de sa capacité à s'associer à PCNA.

Pour cela j'ai construit un mutant du domaine PIP-box (la région d'interaction avec PCNA, dont la séquence est consensuelle) de Rnh202 (*rnh202-PIP**; où F289 et F290 sont convertis en alanines) et étudié l'impact de la perte d'interaction sur la résection des fourches bloquées par gel d'ADN bidimensionnel (2DGE). Afin de révéler un éventuel phénotype faible, j'ai également observé le profil de résection d'un double mutant *rnh1Δ rnh202-PIP**. Je rappelle que chez le double mutant *rnh1Δ rnh201Δ*, présentés en [Figure 1 publication #1](#), les défauts de résection sont plus importants que ceux observés chez le simple mutant *rnh201Δ*. Les niveaux de résection chez les double mutants *rnh1Δ rnh201Δ*, *rnh1Δ rnh202Δ* et *rnh1Δ rnh203Δ* sont similaires ([Figure S2 publication #1](#)). Les résultats sont présentés en [Figure 52](#). Je n'ai pas observé de défauts de résection ni chez le mutant *rnh202-PIP** ni chez le double mutant *rnh1Δ rnh202-PIP**. Ces résultats suggèrent que la fonction de RNase H2 dans la résection des fourches de réplication bloquées est indépendante de sa capacité à se lier à PCNA. A défaut d'être nécessaire, on pourrait envisager que l'interaction de PCNA et RNase H2 ait plutôt un rôle support pour ancrer RNase H2 aux fourches.

Aussi, j'ai observé qu'en réponse au stress répliatif généré par un traitement au CPT, Ku fixe des hybrides ARN:ADN ([Figure 6 publication #1](#)). En accord avec le modèle proposé, je me suis donc questionnée sur le fait que ces hybrides ARN:ADN puissent correspondre à des hybrides formés par les amorces ARN des fragments d'Okazaki. Pour ce faire, j'ai regardé si la quantité d'ARN:ADN immunoprécipités avec Ku était réduite dans des cellules exprimant une forme mutée de la sous-catalytique de la primase (*spp1-4*), déficiente pour synthétiser efficacement ces amorces ARN. Pour cela, j'ai appliqué la même méthode expérimentale que celle décrite en [Figure 6](#) de la [publication #1](#): immunoprécipiter Ku et analyser par dotblot la nature des acides nucléiques associés. Le résultat de cette expérience est présenté ci-contre en [Figure 53](#). Il semblerait que le signal S9.6 observé chez le mutant *spp1-4* soit légèrement plus faible comparé à la souche sauvage. Ces résultats seront discutés plus en détails dans la discussion de ce manuscrit.

DISCUSSION

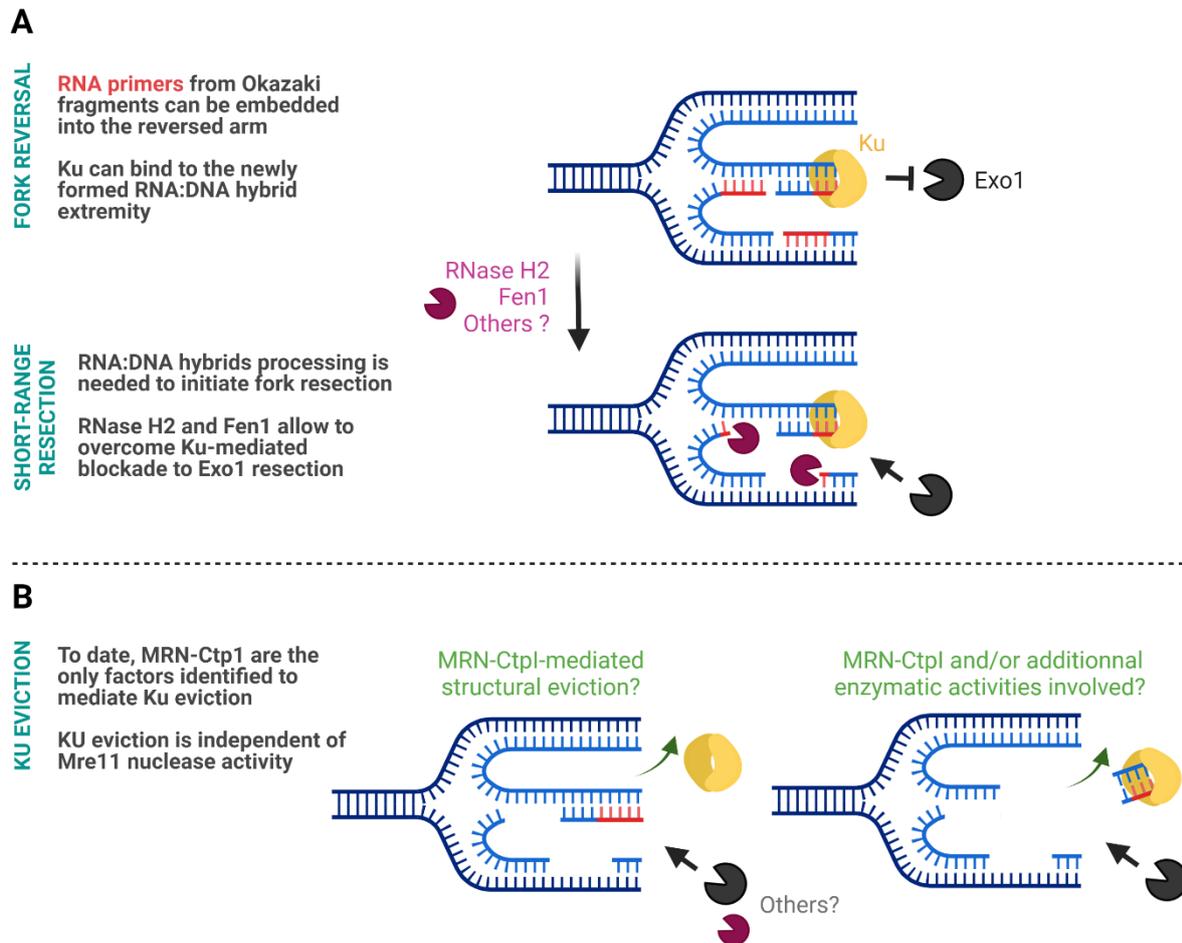


Figure 54 : Modèle proposé de l'impact de la présence d'hybrides ARN:ADN, formés en réponse au stress réplcatif, sur la dégradation des brins naissants. (A) En réponse à un stress réplcatif, les fourches de réplication peuvent réverser. La présence des amorces ARN des derniers fragments d'Okazaki lors de cet évènement a deux conséquences : l'inclusion dans le bras réversé de ces amorces, et la formation d'une extrémité hybride ARN:ADN. Ku reconnaît les extrémités double-brin de type ARN:ADN. La fixation de Ku sur le bras réversé permettrait de contrôler la dégradation des brins naissants en bloquant l'accès à Exo1. Des activités catalytiques spécifiques, comme celles de RNase H2 et Fen1, sont requises pour médier le retrait des hybrides ARN:ADN et contrecarrer le blocage de Ku. Cela crée probablement des points d'entrées à Exo1, bien que Ku soit toujours fixé à l'extrémité du bras réversé. La présence d'hybrides ARN:ADN spécifierait donc le besoin en nucléases nécessaires à la dégradation des brins naissants. (B) Le complexe MRN-Ctp1 reste à ce jour le seul facteur identifié pour l'éviction de Ku des fourches réversées. L'activité catalytique de Mre11 serait dispensable pour cela. Le mode d'éviction de Ku reste encore obscur et plusieurs scénarios sont envisageables, comme il l'est proposé ici. L'extrémité ARN:ADN fixée par Ku pourrait être activement dégradée ou clivée suite au retrait de Ku (partie gauche). Aussi, on pourrait envisager qu'elle soit retirée avec Ku (partie droite).

I. En résumé

Les travaux présentés en [publication #1](#) porte sur l'étude des conséquences de la stabilisation des hybrides ARN:ADN sur l'intégrité et le devenir de fourches de réplication bloquées au locus *RTS1*-RFB. Dans ce cadre, il a été identifié que la dégradation d'hybrides ARN:ADN permet d'initier la résection des brins naissants, étape contrôlée par la présence du facteur de NHEJ Ku. L'activité des enzymes RNase H promeut la résection et le redémarrage des fourches bloquées. C'est notamment RNase H2 qui a un rôle clé pour initier la dégradation, physiologique comme pathologique, des brins naissants. La capacité de RNase H2 à fixer PCNA n'est pas requise pour cette fonction ([Résultats supplémentaires, Figure 52](#)). RNase H2 agit dans une voie parallèle à celle de MRN-Ctp1, dépendamment de la présence de Ku. Plus précisément, RNase H2 permet d'éliminer les amorces ARN des derniers fragments d'Okazaki, contenues dans le bras des fourches réversées. En effet, l'absence des activités RNase H n'induit pas de défaut de réversion de fourche, suggérant que leurs substrats hybride ARN:ADN se forment après l'évènement de réversion. La dégradation des hybrides par RNase H2 permet de contrecarrer le rôle protecteur de Ku contre la résection par Exo1, offrant probablement un point d'entrée à l'exonucléase. Enfin, il a été observé que l'induction d'un stress de réplication favorise la fixation de Ku sur des hybrides ARN:ADN. Ces résultats amènent à la formulation d'un modèle selon lequel, lorsque les fourches réversent, si l'amorce ARN du dernier fragment d'Okazaki n'est pas maturée, cette dernière se retrouve capturée dans le bras réversé, formant alors une extrémité hybride ARN:ADN à laquelle Ku peut se fixer ([Figure 54](#)). La présence d'autres amorces ARN dans le bras réversé spécifierait le besoin en nucléases nécessaires à la dégradation des brins naissants.

Dans leur ensemble, ces observations mettent en avant une nouvelle fonction pour la maturation des fragments d'Okazaki dans le contrôle de l'intégrité des fourches bloquées. Aussi, ces travaux contribuent à mieux définir le rôle de RNase H2 aux fourches bloquées, et mettent en lumière le rôle d'hybrides ARN:ADN formés de manière post-réplivative dans la mise en place de la réponse cellulaire au stress réplificatif.

II. Influence de l'ARN sur le redémarrage des fourches bloquées

1. Ku se fixe aux extrémités double-brin de type ARN:ADN

Une des découvertes majeures présentées en [publication #1](#) est la capacité du facteur de NHEJ Ku à fixer des hybrides ARN:ADN, formés en réponse au stress réplicatif, chez *S. pombe*. Ces résultats s'accordent avec un ensemble d'études soulignant que la présence, en *cis* comme en *trans*, d'ARN non-codants et d'hybrides ARN:ADN constituent un niveau de régulation non négligeable des activités des facteurs du NHEJ ([publication #2](#)).

La fixation de Ku sur des structures ARN de type tige-boucle ou G-quadruplex est une caractéristique conservée de l'hétérodimère (Dalby *et al.*, 2013; Ting *et al.*, 2005). Ku a donc été trouvé associé à diverses molécules d'ARN allant de l'ARN *TLC1* de la télomérase, en passant par l'ARNm de p53 jusqu'à des ARN non-codants comme *LINP1* ou *LRIK* (Lamaa *et al.*, 2016; Ting *et al.*, 2005; D. Wang *et al.*, 2020; Y. Zhang *et al.*, 2016). Ces interactions permettraient la formation d'une synapse propice aux événements de NHEJ, en soutenant la multimérisation de KU, le recrutement de facteurs du NHEJ et la stimulation de leurs activités. Est-ce que de telles interactions régissent le recrutement et l'activité des facteurs de NHEJ aux sites de blocage de fourche de réplication reste à ce jour encore très peu étudié. Très récemment, il a été proposé que le facteur XAB2 agisse dans une voie parallèle à ATM-CtIP-MRE11 pour promouvoir l'éviction de KU et l'engagement de la RH aux CDB-se (cassure double-brin à extrémité unique) formées aux fourches de réplication (A. B. Sharma *et al.*, 2021). XAB2 (*XPA-interacting factor 2*) est connu pour ses fonctions dans les processus de TC-NER, de transcription et d'épissage des pré-ARNm. Bien que les mécanismes moléculaires sous-jacents restent à caractériser, ces observations soutiennent la possibilité que la présence d'ARN aux fourches bloquées puisse participer de diverses manières au contrôle de la fixation de Ku, et de manière plus générale à l'activité du NHEJ.

Chez l'homme, KU a été identifié dans un crible pour la détection de facteur de liaison aux hybrides ARN:ADN (I. X. Wang *et al.*, 2018). Néanmoins, l'impact de la prise en charge d'extrémités hybrides sur la fixation de Ku et la réaction de ligature intrinsèque au NHEJ est controversée. Il a été proposé chez *S. cerevisiae* que la persistance d'hybride ARN:ADN aux CDBs, dû à la perte de Sen1, se traduise par une plus longue rétention de Ku aux extrémités, ce qui pourrait favoriser la réparation par NHEJ (Rawal *et al.*, 2020). A l'inverse chez l'homme, en absence de XRN2, l'accumulation d'hybrides ARN:ADN inhiberait la fixation de Ku aux extrémités des CDBs (Dang & Morales, 2020, p. 2). Les résultats présentés en [Figure 6](#) de la [publication #1](#) supportent les données des études de (Rawal *et al.*, 2020; I. X. Wang *et al.*, 2018) et montrent que Ku peut se fixer aux hybrides ARN:ADN formés en réponse au stress réplicatif. Dans quelle mesure la présence d'extrémités hybrides ARN:ADN impacte la réaction de NHEJ, dans le cadre de la réparation d'une CDB-de (cassure double-brin à double extrémités), reste à

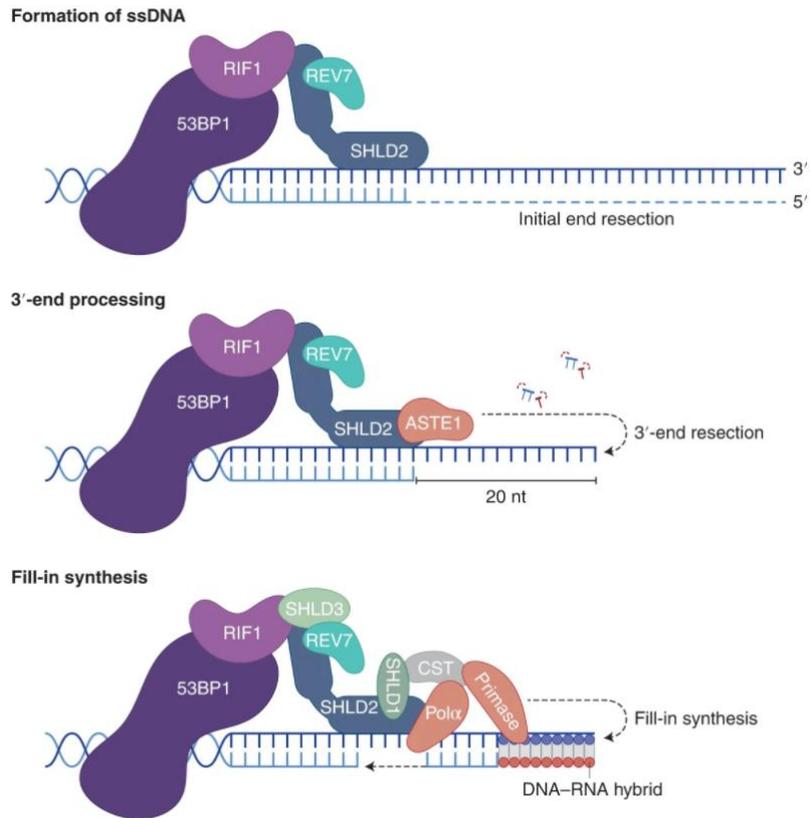


Figure 55 : ASTE1 promeut le contrôle de la réparation des CDBs médiée par l'ensemble 53BP1-RIF1-shieldin. La sous-unité SHLD2 recrute ASTE1 qui clive la longue extrémité d'ADNs 3' sortante générée lors de la résection de l'extrémité. L'extrémité simple-brin, alors raccourcie à environ 20 nucléotides de long, offre la possibilité à la primase de synthétiser une courte amorce ARN, étendue par Pol α pour combler la brèche de simple-brin restante. D'après (He & Chowdhury, 2021).

étudier en détails. Récemment, un modèle de protection des extrémités des CDB-de, facilitant le NHEJ, reposant sur l'action coordonnée du complexe 53BP1-RIF1-shieldin avec celle de l'endonucléase ASTE1 a été proposé (F. Zhao *et al.*, 2021). Le recrutement de shieldin ne peut se faire que sur des extrémités préalablement résectées, offrant des extrémités 3' sortantes d'au minimum 50 nucléotides de long. Une fois shieldin recruté, il médie le recrutement du complexe primase-Pol α , en charge de resynthétiser le brin dégradé. Ce complexe a une processivité très faible, et ne pourra assurer la synthèse que sur une vingtaine de nucléotides. Dans cette étude, les auteurs montrent que ASTE1 est alors recrutée aux CDBs, dont elle clive une partie des extrémités 3' sortantes. Ainsi raccourcies, ces extrémités peuvent être efficacement converties en extrémités double-brin *via* l'activité du complexe primase-Pol α . Selon ce modèle, il est tentant de spéculer que l'extrémité serait alors formée d'un hybride ARN:ADN, formé *via* l'amorce faite par la primase ([Figure 55](#)). Les auteurs observent qu'en l'absence d'ASTE1, la réaction de NHEJ est altérée et les extrémités subissent une hyper-résection. Il est donc possible que la présence de l'hybride ARN:ADN puisse permettre à la fois de protéger l'extrémité contre une autre étape de résection par des exonucléases, et faciliterait la prise en charge par le NHEJ, et potentiellement par Ku.

Dans le cadre de mon projet de thèse, j'ai cherché à déterminer si une partie des hybrides ARN:ADN fixés par Ku, en réponse au stress réplicatif, correspondrait à des hybrides formés par les amorces ARN des fragments d'Okazaki. Pour ce faire, j'ai regardé si la quantité d'ARN:ADN immunoprécipités avec Ku était réduite dans des cellules exprimant un mutant de la sous-unité catalytique de la primase ([Résultats supplémentaires, Figure 53](#)). Pour rappel, ce mutant a la particularité de former un complexe primase-Pol α instable, et perd ainsi sa capacité à synthétiser des amorces ARN de taille optimale ([voir publication #1](#)). Le résultat de cette expérience est présenté [Figure 53](#). Il semblerait que la quantité d'hybrides ARN:ADN immunoprécipités dans le mutant de la primase soit légèrement diminuée en comparaison à la souche exprimant un complexe primase-Pol α fonctionnel. Ces résultats préliminaires sont encourageants, mais l'expérience mérite d'être répétée, et les conditions expérimentales doivent être améliorées. J'envisage de répéter cette expérience dans un fond génétique *rnh201Δ*, un contexte certainement plus approprié pour observer un effet éventuel chez le mutant de la primase.

2. La présence d'ARN module l'étape de résection des brins naissants

Aux CDBs, la coordination des étapes de résection initiale et extensive repose sur les interactions entre Ku et MRN-Ctp1. Souvent présentés comme senseurs compétiteurs pour la reconnaissance des extrémités des cassures, un modèle d'actions séquentielles des deux complexes est désormais de plus en plus mis en avant (Paull, 2021). Les extrémités seraient reconnues par Ku, prônant un engagement initial vers une réparation médiée par le NHEJ. Dans certains cas, comme par exemple en l'absence d'extrémités compatibles ou encore lors d'un échec dans la formation d'une synapse

propice à la ligature, des facteurs de résection sont recrutés aux extrémités. La présence de Ku conditionne une résection en deux étapes, et son éviction est nécessaire à l'accomplissement du processus. On assiste alors à un transfert de la prise en charge des extrémités double-brin du NHEJ à la RH.

Le modèle communément admis d'initiation de la résection aux CDBs repose sur l'activité catalytique de MRN. Il a été montré qu'*in vitro*, l'activité nucléase de MRN est inefficace sur des hybrides ARN:ADN (Chang *et al.*, 2019). La présence d'hybride ARN:ADN pourrait donc moduler l'étape de résection *via* son effet antagoniste sur la fonction catalytique de MRN. Aux CDBs, il a été proposé chez *S. cerevisiae* que la persistance des hybrides induisait la mise en place d'un mécanisme d'initiation de la résection non-canonique reposant sur l'activité endonucléase de Mre11 et Dna2 (Rawal *et al.*, 2020). La résection plus extensive des extrémités *via* Exo1 ou Sgs1-Dna2 nécessiterait alors le retrait de l'hybride *via* la mise en place d'activités spécifiques, dont principalement celle de Sen1 et d'autres non identifiées dans l'étude.

Chez *S. pombe* les RNase H ont été montrés comme limitant l'accumulation d'hybrides ARN:ADN aux CDBs, mais la nécessité de leur action pour la réparation est débattue (Ohle *et al.*, 2016; H. Zhao *et al.*, 2018). Il a été montré chez *S. cerevisiae* que c'est Sen1, plutôt que les RNase H, qui aurait un rôle critique dans l'initiation du retrait des hybrides ARN:ADN (Rawal *et al.*, 2020). Pour la résection d'une extrémité double-brin formée lors de l'évènement de réversion de fourche, les résultats présentés en [publication #1](#) montrent que l'action de RNase H2, et dans une moindre mesure celle de RNase H1 mais pas celle de Sen1, est requise pour promouvoir la résection par Exo1.

Des différences dans les activités impliquées pour le retrait des ARN:ADN et la mise en place de la résection, aux CDBs et aux sites de collision entre machineries de transcription et de réplication (TRCs), ont été reportées dans la littérature. Par exemple, le complexe MRN a des fonctions opposées dans la réparation des CDBs et aux sites de TRCs. Aux CDBs, il promeut la résection, le recrutement de l'ARNPII et la formation d'hybrides ARN:ADN. Aux sites de TRCs il coordonne la résolution des R-loops par la voie FA, un rôle indépendant de son activité catalytique (Chang *et al.*, 2019). Au site *RTS1*-RFB et aux fourches bloquées, il a été montré chez les levures que MRN promeut la dégradation des brins naissants indépendamment de son activité nucléase (Delamarre *et al.*, 2020; Teixeira-Silva *et al.*, 2017). La présence potentielle d'ARN dans le brin 5' des fourches de réplication, dû à la présence des amorces de fragments d'Okazaki, pourrait expliquer en partie ces observations. Dans ce contexte, une hypothèse est que MRN ne peut pas cliver le brin 5' au niveau d'un hybride ARN:ADN. L'initiation de la résection requiert alors l'implication de nucléases additionnelles spécialisées dans leur retrait. Ici, j'ai observé que RNase H2, de par sa capacité à dégrader la moitié ARN des hybrides ARN:ADN, et Rad2 (Fen1) permettent de créer un point d'entrée à Exo1 lorsque l'extrémité du bras réversé est bloquée par

Ku ([publication #1](#)). Néanmoins dans ce scénario, j'ai observé que l'éviction de Ku reste dépendante de MRN, bien qu'indépendante de l'activité nucléase de Mre11.

Le mécanisme d'éviction de Ku des différents types d'extrémités est aussi sujet à débat. Chez *S. pombe* et chez les mammifères, l'éviction de Ku des CDB-de et CDB-se serait principalement médiée par l'activité nucléase de Mre11 (Chanut *et al.*, 2016; Langerak *et al.*, 2011). Il est proposé que la présence de Ku stimule l'activité endonucléase de MRE11 (Reginato *et al.*, 2017). La fixation de Ku promeut une résection en deux temps, initiée par le clivage du brin 5' par MRN, offrant un point d'entrée aux machineries de résection extensive (W. Wang *et al.*, 2018). Aux fourches bloquées / réversées, cette activité nucléase serait dispensable ([Figure 54](#)). Dans tous les cas, le mode d'éviction *per se* de Ku par MRN reste encore mal caractérisé et ces divergences reflètent certainement la multiplicité de rôles de MRN dans la prise en charge de sites de dommages à l'ADN de natures diverses.

Enfin, les résultats présentés en [publication #1](#) questionnent sur l'impact de la présence d'hybrides ARN:ADN sur la résection par Exo1. En l'absence de Ku et RNase H2, j'ai observé que la résection des fourches bloquées dépendait de Exo1. Deux hypothèses non exclusives sont donc envisageables : d'autres enzymes participent au retrait des hybrides ARN:ADN formés aux fourches bloquées, libérant la voie à Exo1. Aussi, Exo1 pourrait lui-même être capable de dégrader ces hybrides. Il a été montré *in vivo* qu'Exo1 dégrade avec la même efficacité une séquence de 10 ribonucléotides contenue dans un hybride ARN:ADN et un ADNdb de même taille (Daley *et al.*, 2020). Les amorces ARN des fragments d'Okazaki ont une taille entre 8 et 12 ribonucléotides, et sont donc un substrat potentiel d'Exo1.

III. Origine des hybrides ARN:ADN en réponse au stress répliatif : plusieurs types d'hybrides ?

Les travaux présentés dans la [publication #1](#) montrent qu'une source d'hybrides ARN:ADN, formés de manière post-répliatif suite à un blocage de fourche, sont les amorces ARN des fragments d'Okazaki. Les amorces des derniers fragments, si elles ne sont pas maturées avant l'évènement de réversion de fourche, se retrouvent associées au bras réversé. Il en résulte la formation d'une extrémité double-brin de type ARN:ADN. La formation des amorces ARN des fragments d'Okazaki est inhérente au processus de répliatif et leur présence module les activités de dégradation des brins naissants. Cependant, on ne peut exclure une seconde possibilité expliquant la présence d'hybrides ARN:ADN aux fourches bloquées (Naiman *et al.*, 2021). Comme il l'a été proposé aux CDBs, il est envisageable que des hybrides ARN:ADN puissent se former co-transcriptionnellement suite à l'étape de résection sur l'ADNsb

nouvellement exposé . Ces deux types de formation d'hybrides ARN:ADN en réponse à un stress réplicatif ne sont pas mutuellement exclusifs.

L'hypothèse que les hybrides ARN:ADN formés dans le cadre de TRC sont une cause et/ou une conséquence du blocage de la fourche de réplication est de plus en plus évoquée dans la littérature. C'est notamment le cas dans une récente étude soutenant que l'absence des orthologues de Rad6-Rad18 chez l'homme favorise la formation d'hybrides ARN:ADN (Barroso *et al.*, 2019) (voir Introduction III.3.I, sur la gestion du stress réplicatif *via* les mécanismes de contournement de dommages). Les défauts d'utilisation de polymérases trans-lésionnelles résulteraient en une incapacité à combler les brèches simple-brin formées derrière la fourche de manière post-réplicative, ce qui faciliterait la formation d'hybrides ARN:ADN. Un scénario similaire pourrait être envisagé lors de la croisée des machineries de transcription et réplication selon le mécanisme décrit par (Chappidi *et al.*, 2020) présenté en [Figure 20](#). Suite au clivage de la fourche par MUS81-EME1, la machinerie transcriptionnelle passe au travers du site de blocage du réplisome. L'ARNPII se retrouverait donc derrière la fourche, et transcrirait le brin retard.

Néanmoins à ce jour, il n'a pas été démontré que des ARN polymérases puissent être recrutées *de novo* sur l'ADNsb exposé aux fourches bloquées. Je tiens à rappeler ici que le système *RTS1*-RFB, utilisé dans le cadre de cette thèse pour induire le blocage de fourche, est un système de blocage indépendant de la transcription, médié par la fixation d'un complexe protéique à la séquence *RTS1*. Les travaux présentés n'impliquent donc pas la proximité d'une ARN polymérase pour induire le blocage. Comme il l'est débattu aux CDBs, il est possible qu'en dehors d'un contexte de TRC, la formation co-transcriptionnelle d'hybrides ne soit pas observable aux fourches bloquées.

Cependant un crible génétique a été réalisé dans le laboratoire pour identifier les facteurs nécessaires au redémarrage des fourches bloquées par la RH (voir la méthode expérimentale Figure 1A, publication #1). Il s'avère que 20% des gènes identifiés sont associés à la biologie de l'ARN et au processus de transcription. On pourra citer, entre autres, des gènes codants pour des facteurs d'épissage comme *Saf5*, des facteurs de régulation de la traduction comme *Tam20* (MCT-1 chez l'homme), ou encore des membres du complexe *Paf1*, complexe associé aux ARNPII actives. De plus, 13% des gènes identifiés restent codants pour des facteurs de la machinerie de biogénèse des miARNs : on y trouve les gènes codants pour *Dicer* et *Argonaute* notamment. Je rappelle qu'il est proposé que ces protéines contribuent à la formation des petits DDRNAs lors de la réparation des CDBs. Ces résultats appuient l'hypothèse qu'il puisse y avoir une production d'ARN aux fourches bloquées, même indépendamment d'une TRC, et que la prise en charge de ces ARNs est nécessaire pour assurer le redémarrage par la RH.

Afin de déterminer si l'activation du blocage pouvait induire *in vivo* le recrutement *de novo* d'une ARNPII active au site *RTS1*-RFB, j'ai pu réaliser une expérience de CRAC

(Granneman *et al.*, 2009) en partenariat avec l'équipe de Domenico Libri à l'Institut Jacques Monod. Brièvement, cette technique repose sur un pontage aux UVs (254nm) de l'ARNPII taguée à son ARN en court de transcription. Les complexes ARN-ARNPII sont alors purifiés en condition dénaturante. Les ARNs ainsi capturés sont récupérés après un traitement à la Protéinase K, et amplifiés par RT-PCR. Les produits de PCR obtenus sont alors séquencés et alignés sur le génome de référence pour déterminer les sites d'activité transcriptionnelle de l'ARNPII. Suite à divers problèmes expérimentaux et de séquençage, la quantité de *reads* à aligner sur le génome s'est malheureusement avérée trop limitante pour que cette expérience puisse être conclusive. Cette technique est essentiellement utilisée chez *S. cerevisiae* et mérite d'être optimisée chez *S. pombe*. Combinée au système *RTS1*-RFB elle permettra certainement de caractériser si, indépendamment d'une TRC, de la transcription peut être initiée sur l'ADNs aux fourches bloquées. Ce sera d'ailleurs le projet d'une post-doctorante qui va bientôt rejoindre le laboratoire.

Si la formation de ce second type d'hybrides ARN:ADN est confirmée, cela ouvrira de nombreuses perspectives sur la régulation des mécanismes de prise en charge des fourches bloquées. La présence d'hybrides formés co-transcriptionnellement constituerait, peut être comme aux CDBs, une plateforme pour le recrutement et la modulation des activités des facteurs de protection et de redémarrage des fourches bloquées. Les CDBs survenant dans les zones de transcription actives arborent un profil de modifications d'histones singulier, dictant le choix du mode de réparation (Clouaire & Legube, 2015). De plus, il a récemment été mis en avant que les molécules d'ARN en cours de transcription pouvaient subir des modifications épigénétiques de type N6-methyladenosine (m⁶A), conservées lors de la formation d'un hybride ARN:ADN (Abakir *et al.*, 2020; Marnef & Legube, 2020). Ces modifications influeraient sur la formation et la résolution des R-loops à l'échelle du génome. On pourrait envisager que de tels évènements, au niveau de fourches bloquées, participent à réguler très finement la prise en charge des intermédiaires de réplication.

IV. AGS : vers une meilleure compréhension des origines de la pathologie

Des mutations associées à l'ensemble du complexe RNase H2 sont caractéristiques de plus de la moitié des cas du syndrome d'Aicardi-Goutières (AGS). Les autres cas résultent de mutations dans quatre autres enzymes, associées au métabolisme et à la détection d'acides nucléiques : SAMHD1, TREX1, ADAR1 et MDA5.

Toutes ces mutations sont associées à l'accumulation d'acides nucléiques d'origine endogène dans le cytoplasme (Crow *et al.*, 2015). MDA5 est un senseur cytoplasmique de molécules d'ARNdb de grande taille (>1kb), dont la fonction première est de

prévenir contre une infection virale et activer la production d'interféron de type I. Chez les patients AGS, les mutations de MDA5 lui confèrent un gain de fonction aboutissant la production excessive d'interféron de type I (Rice *et al.*, 2014). A l'inverse, les mutations associées à RNase H2, TREX1, SAMHD1 et ADAR1 sont considérées comme induisant majoritairement des pertes de fonctions des protéines, indiquant que l'accumulation aberrante d'acides nucléiques cytoplasmiques prendrait source dans la dérégulation de leurs activités. Dans ces cas-là, la surexpression d'interféron de type I résulterait de l'activation de la voie cGAS-STING. Bien qu'initialement présenté comme un senseur de molécules d'ADN, il a été montré que cGAS pouvait également détecter des molécules hybrides ARN:ADN (Mankan *et al.*, 2014). A ce jour, dans ces différents contextes de mutations, les origines et la nature des acides nucléiques cytoplasmiques ne sont pas claires.

SAMHD1 (*SAM domain and HD domain-containing protein 1*) possède une activité dNTPase induisant la réduction des niveaux de dNTPs cellulaires. Cette fonction est cruciale en cas d'infection virale, car elle participe à limiter la conversion en ADN complémentaire du contenu ARN du virus et en restreint donc la réplication. Un second rôle de SAMHD1 dans la régulation de la réponse immunitaire a été proposé, indépendamment de son activité dNTPase. Il a été montré qu'aux fourches de réplication bloquées, SAMHD1 promeut la dégradation des brins naissants *via* la stimulation de l'activité exonucléase de MRE11 (Coquel *et al.*, 2018). Dans les cellules où SAMHD1 est déplété, les défauts de résection ont été directement associés à l'accumulation de fragments d'ADNsb cytoplasmiques, et l'activation de la voie cGAS-STING. D'après les travaux présentés en [publication #1](#), j'ai observé que l'incapacité de RNase H2 à médier la dégradation d'hybrides ARN:ADN entraîne des défauts d'initiation de la résection des brins naissants. Est-ce que des défauts d'activité de RNase H2 entraînent l'activation de mécanisme(s) alternatif(s) pour le retrait des hybrides, dont la mise en place aboutirait à l'accumulation cytoplasmique de fragments nucléiques, est une question à considérer. De plus, il n'est pas exclu que ces fragments soient des hybrides ARN:ADN.

L'exonucléase TREX1 (*Three Prime Repair Exonuclease 1*) est une exonucléase 3'→5' dégradant des fragments d'ADNsb et d'ADNdb cytoplasmiques chez les mammifères. TREX1 est donc principalement localisé dans le cytoplasme. En présence d'un stress répliatif et notamment de traitement à l'hydroxyurée, TREX1 est recruté dans le noyau des cellules en phase S, aux fourches de réplication bloquées (Y.-G. Yang *et al.*, 2007). La protéine y prendrait en charge des fragments d'ADNsb d'une soixantaine de nucléotides en taille, émanant du traitement des intermédiaires de réplication. (Y.-G. Yang *et al.*, 2007) émettent l'hypothèse que TREX1 participerait, de concert avec RNase H2, à la prise en charge des longs flaps excisés par DNA2 lors de la maturation des fragments d'Okazaki. Bien que TREX1 ne soit pas conservé chez les levures, ces observations soutiennent l'hypothèse que des défauts de maturation des fragments

d'Okazaki en condition de stress répliatif pourraient conduire à l'accumulation de fragments d'acides nucléiques dans le cytoplasme.

Les cellules AGS mutées dans TREX1, SAMHD1 et RNASE H2 sont caractérisées par une hausse des niveaux d'hybrides ARN:ADN détectables à l'échelle du génome (Lim *et al.*, 2015). Aussi, des défauts de fonction de chacune de ces enzymes ont été associés au stress répliatif. Ces observations amènent à penser que la prise en charge d'hybrides ARN:ADN en condition de stress répliatif est d'une importance majeure pour lutter contre la mise en place d'une auto-immunité. Plusieurs scénarios pourraient expliquer l'origine de la surexpression d'interféron de type I dans les cellules AGS. Comme évoqué précédemment, l'accumulation cytoplasmique d'hybrides ARN:ADN pourraient résulter de défauts de prise en charge d'intermédiaires de réplication. De plus, la persistance d'hybrides ARN:ADN aux fourches de réplication bloquées pourraient aboutir à la formation de ponts chromatiniens en mitose, des structures connues pour induire l'activation de cGAS. En effet, les cellules déficientes pour RNase H2 sont connues pour accumuler des micronoyaux, résultant de défauts de ségrégation mitotique (Bartsch *et al.*, 2017; MacKenzie *et al.*, 2017). La rupture de l'intégrité de la membrane des micronoyaux entraîne l'exposition d'acides nucléiques dans le cytoplasme et leur détection par cGAS (MacKenzie *et al.*, 2017). Ces observations ont été confirmées dans un modèle cellulaire de mutation de RNase H2 retrouvée chez des patients AGS (MacKenzie *et al.*, 2017).

Enfin, la diminution de la capacité de RNase H2 à dégrader des hybrides ARN:ADN pourrait être une cause additionnelle de l'apparition de la pathologie dans les cellules AGS mutées pour ADAR1. ADAR1 (*Adenosine Deaminase Acting on RNA 1*) a deux isoformes : un isoforme cytoplasmique et un isoforme nucléaire. L'isoforme cytoplasmique participe à la régulation négative de la voie de signalisation activée par la reconnaissance d'ARNdb par MDA5. L'isoforme nucléaire est globalement moins bien caractérisé, bien qu'il ait été montré très récemment qu'il aurait un rôle support dans la résolution des R-loops télomériques par RNase H2 dans les cellules cancéreuses ré-exprimant la télomérase (Shiromoto *et al.*, 2021). Brièvement, ADAR1-nucléaire corrige les erreurs d'appariement de type A-C dans les hybrides ARN:ADN, permettant ainsi leur reconnaissance et leur dégradation par RNase H2. Dans quelle mesure la perte d'activité de chacun des isoformes d'ADAR1 chez les patients AGS contribue à l'activation de la réponse inflammatoire n'est pas connu. Je rappelle également que la stabilisation d'hybrides ARN:ADN aux télomères augmente les risques de TRC et que le recrutement contrôlé de RNase H2 y est requis pour leur dégradation (Graf *et al.*, 2017). Les défauts d'activité de RNase H2 pourraient donc être responsables de l'accumulation d'hybrides ARN:ADN, à la fois cause et conséquence du stress répliatif observé dans les cellules AGS.

V. Syndromes inflammatoires et DDR

De manière plus générale, depuis une dizaine d'années des études mettent en avant le rôle de facteurs du DDR dans la détection d'acides nucléiques cytoplasmiques (Nakad & Schumacher, 2016). Ces observations révèlent un lien étroit entre ces facteurs et l'activation d'une réponse immunitaire, un lien probablement à ce jour encore mal compris et sous-estimé.

1. Senseurs de dommage à l'ADN... et d'acides nucléiques cytoplasmiques

Les senseurs Ku et MRN s'avèrent tout deux participer, en plus de leur rôle nucléaire dans la détection des dommages à l'ADN, à la reconnaissance d'acides nucléiques dans le cytoplasme (Kondo *et al.*, 2013; Roth *et al.*, 2014; X. Zhang *et al.*, 2011). Mre11-Rad50 est un senseur de l'accumulation d'ADNdb cytoplasmique, spécifiquement lorsque cet ADN est d'origine endogène, et participe à la production d'interféron de type I *via* l'activation de STING (Kondo *et al.*, 2013). De plus, MRN, *via* la sous-unité Rad50, peut interagir avec l'adaptateur CARD9. Ce complexe peut en cas d'infection virale, et potentiellement en cas d'auto-immunité, contribuer à la production d'interféron, indépendamment de l'activation de STING (Roth *et al.*, 2014).

Pour Ku, différents scénarios ont été avancés. D'une part, il a été proposé que Ku70 seul soit un senseur d'ADNsb et d'ADNdb cytoplasmiques, ce qui induirait la production d'interféron de type III (X. Zhang *et al.*, 2011). Curieusement, ces observations ne seraient pas partagées pour Ku80. Bien qu'ils soient de nature différente, les interférons de type III utilisent la même voie de transduction de signal que ceux de type I, à l'exception qu'ils sont reconnus par un récepteur membranaire différent. D'autre part, différentes études ont mis en avant un rôle du complexe DNA-PK dans la reconnaissance d'ADN cytoplasmique (Burleigh *et al.*, 2020; Ferguson *et al.*, 2012). Les résultats de ces études sont néanmoins quelque peu divergents. Tantôt DNA-PK agirait en amont de STING, tantôt il agirait dans une voie indépendante de STING. Aussi, l'implication de l'activité catalytique du complexe est débattue. Ces différences pourraient néanmoins s'expliquer par des différences de modèles cellulaires (cellules humaines vs cellules murines) et expérimentaux utilisés (type d'infection virale étudié, car certaines protéines virales sont connues pour inhiber l'activité de DNA-PK). En résumé, il semblerait que dans les cellules humaines, DNA-PK puisse agir dans une voie indépendante de STING pour stimuler la production d'interféron. Cette voie alternative requiert le fait que DNA-PKs soit fonctionnel (Burleigh *et al.*, 2020). Chez les souris, cette seconde voie serait absente, et l'essentiel de la production d'interféron serait médiée par l'activation de STING (Ferguson *et al.*, 2012). Même si de nombreuses zones d'ombre persistent sur le mécanisme sous-jacent, les résultats s'accordent sur le fait que la détection par Ku d'acide nucléiques cytoplasmiques participerait au déclenchement d'une réponse immunitaire. Ces observations s'accordent à ceux d'une très récente étude démontrant que

l'accumulation d'ADN cytoplasmique d'origine endogène, dans les cellules immunitaires T-CD4⁺ vieillissantes, est détecté par Ku (Y. Wang *et al.*, 2021). DNA-PKcs est alors activé : la phosphorylation de ses protéines cibles stimule la prolifération des cellules immunitaires T, ce qui promeut à terme l'apparition d'une auto-immunité.

Les travaux présentés en [publication #1](#) montrent que Ku reconnaît *in vivo* des hybrides ARN:ADN, formés dans le noyau en réponse à un stress réplicatif. Une hypothèse attrayante serait qu'il en soit de même dans le cytoplasme. Ces structures étant désormais considérées comme des activateurs de la production d'interféron médiée par STING (Mankan *et al.*, 2014; Rigby *et al.*, 2014), il est possible que leur détection par Ku contribue à l'activation de la réponse immunitaire. L'étude de l'implication de Ku dans les pathologies auto-immunes semble donc prometteuse. Aucun lien direct avec l'AGS n'a cependant été reporté à ce jour. Néanmoins, la pathologie de l'AGS partage de nombreuses similarités avec celle du lupus érythémateux systémique (*Systemic Lupus Erythematosus* ou SLE), et sont notamment toutes deux caractérisées par une surexpression d'interféron de type I. Les patients SLE présentent des taux élevés d'anticorps contre Ku. Cela pourrait indiquer qu'une signalisation persistante de dommage à l'ADN et/ou d'acides nucléiques cytoplasmiques par Ku contribuent à entraîner une inflammation chronique et une auto-immunité.

2. Stress réplicatif et réponse immunitaire

Des défauts de prise en charge des intermédiaires de réplication en condition de stress réplicatif sont une source de la surexpression d'interféron. La perte de facteurs de réparation et de protection des fourches bloquées contribue à l'accumulation d'acides nucléiques cytoplasmiques, ce qui peut conduire à une inflammation chronique, parfois associée au développement de cancers. Par exemple, en l'absence de RAD51, la dégradation des brins naissants, médiée en partie *via* l'activité exonucléase de MRE11, a été reliée à la production de fragments nucléiques, directement exportés dans le cytoplasme (Bhattacharya *et al.*, 2017). Aussi, il a été proposé que RPA et RAD51 aient un rôle de senseurs d'acides nucléiques dans le noyau, et empêcheraient leur transfert vers le cytoplasme (Wolf *et al.*, 2016). En condition de stress réplicatif, une exhaustion des réserves de RPA et RAD51, couplée à une diminution de la protection des fourches bloquées, pourrait participer à l'accumulation cytoplasmique de fragments nucléiques d'ADN d'origine endogène. A cela s'ajoute probablement les échecs de fusion de fourches convergente observés en l'absence de Rad51, conduisant à l'apparition de défauts mitotiques qui peuvent représenter une cause additionnelle à la présence d'ADN cytoplasmique (Ait Saada *et al.*, 2017).

De plus, un risque additionnel peut venir de la résolution de fourches réversées. Il a été proposé que, entre autres, leur prise en charge par MUS81 génère des fragments d'ADNdb cytoplasmiques, induisant la production d'interféron de type I *via* l'activation de STING. Ce mécanisme observé dans des cellules de cancer de la prostate permettrait

de contribuer à la reconnaissance immune de ces cellules cancéreuses et à leur rejet par l'organisme (Ho *et al.*, 2016). Comme il l'a été décrit précédemment, la dégradation des brins naissants des fourches réversées peut être médiée par SAMHD1, qui promeut l'activation d'ATR et l'activité exonucléase de MRE11 (Coquel *et al.*, 2018). En son absence, la mise en place d'un mécanisme alternatif, reposant sur l'hélicase RECQ1 et l'activité endonucléase de MRE11, aboutirait à la formation de fragments d'ADNsb alors exportés dans le cytoplasme. Enfin, il a été montré que la déplétion de BLM, EXO1 et DNA2 réduit l'accumulation d'ADNsb cytoplasmique observé après irradiation (Erdal *et al.*, 2017). Ces observations ont été réalisées dans des cellules cancéreuses déficientes pour TREX1, permettant d'apprécier la présence d'ADN cytoplasmique. Les auteurs de l'étude concluent que les activités respectives de ces facteurs impliqués dans la résection extensive des CDBs génèrent des fragments nucléiques pouvant accumuler dans le cytoplasme des cellules, ce qui active la production d'interféron. Ces facteurs étant également impliqués dans la prise en charge des fourches bloquées, réversées ou non, cela renforce l'hypothèse que la prise en charge de ces intermédiaires puissent participer à la production de fragments nucléiques et au déclenchement d'une inflammation.

Au vu de ces observations, les résultats présentés en [publication #1](#) interpellent. Ils questionnent également sur la possibilité que le processus de maturation des fragments d'Okazaki puisse être à l'origine de la production de fragments d'acides nucléiques retrouvés dans le cytoplasme. En effet, de manière générale, les différents mécanismes par lesquels des défauts de prises en charge de fourches de réplication bloquées aboutissent à l'accumulation de fragments nucléiques cytoplasmiques sont encore mal caractérisés. Un lien direct entre des défauts de maturation des fragments d'Okazaki et la mise en place d'une inflammation chronique est encore spéculatif. Par exemple, bien qu'il ait été observé que des mutations de FEN1, retrouvées dans certains cancers, soient associées à une inflammation chronique et au développement d'une auto-immunité, il semblerait que ces phénotypes ne résultent pas de la perte de son activité flap (Zheng *et al.*, 2007). Tout cela interroge sur les mécanismes sous-jacents, et ouvre des perspectives d'études sur les liens entre les activités impliquées aux fourches de réplication, en condition de stress réplicatif ou non, et l'accumulation d'acides nucléiques cytoplasmiques.

VI. Conclusion

En résumé, les travaux présentés dans cette thèse ([publication #1](#)) ont mis en avant un mécanisme inédit de contournement de la fonction de Ku dans la protection des brins naissants contre la résection par Exo1. La présence d'hybrides ARN:ADN, formés de manière post-réplicative lors de la réversion des fourches, conditionne cette régulation. Ces hybrides sont formés lorsque les amorces ARN des fragments d'Okazaki ne sont

pas maturées avant l'évènement de réversion. L'activité coordonnée de nucléases, telle que RNase H2, s'avère alors requise pour créer un point d'entrée à Exo1.

Ce travail s'inscrit dans la lignée d'études soutenant la modulation des activités, canoniques ou non, des facteurs du NHEJ par une composante ARN ([publication #2](#)). Aussi, il met en lumière l'influence de la prise en charge de structures hybride ARN:ADN, formées en réponse au stress réplicatif, dans la prise en charge des fourches de réplication bloquées, influence jusqu'à ce jour principalement décrite dans un contexte de réparation de CDBs.

De par les liens connus entre la dérégulation des activités de la plupart des facteurs étudiés ici et la mise en place d'une inflammation chronique et d'auto-immunité, ces travaux de thèse permettront sans doute de contribuer à une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires associés à ces pathologies. Evidemment, la levure *S. pombe* a ses limites pour l'étude du processus inflammatoire, mais elle représente malgré tout un modèle de choix pour décortiquer les mécanismes moléculaires fondamentaux impliqués.

BIBLIOGRAPHIE

- Abakir, A., Giles, T. C., Cristini, A., Foster, J. M., Dai, N., Starczak, M., Rubio-Roldan, A., Li, M., Eleftheriou, M., Crutchley, J., Flatt, L., Young, L., Gaffney, D. J., Denning, C., Dalhus, B., Emes, R. D., Gackowski, D., Corrêa, I. R., Garcia-Perez, J. L., ... Ruzov, A. (2020). N6-methyladenosine regulates the stability of RNA:DNA hybrids in human cells. *Nature Genetics*, *52*(1), 48-55. <https://doi.org/10.1038/s41588-019-0549-x>
- Adkins, N. L., Niu, H., Sung, P., & Peterson, C. L. (2013). Nucleosome dynamics regulates DNA processing. *Nature Structural & Molecular Biology*, *20*(7), 836-842. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2585>
- Ait Saada, A., Lambert, S. A. E., & Carr, A. M. (2018). Preserving replication fork integrity and competence via the homologous recombination pathway. *DNA Repair*, *71*, 135-147. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2018.08.017>
- Ait Saada, A., Teixeira-Silva, A., Iraqui, I., Costes, A., Hardy, J., Paoletti, G., Fréon, K., & Lambert, S. A. E. (2017). Unprotected Replication Forks Are Converted into Mitotic Sister Chromatid Bridges. *Molecular Cell*, *66*(3), 398-410.e4. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.04.002>
- Akman, G., Desai, R., Bailey, L. J., Yasukawa, T., Dalla Rosa, I., Durigon, R., Holmes, J. B., Moss, C. F., Mennuni, M., Houlden, H., Crouch, R. J., Hanna, M. G., Pitceathly, R. D. S., Spinazzola, A., & Holt, I. J. (2016). Pathological ribonuclease H1 causes R-loop depletion and aberrant DNA segregation in mitochondria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *113*(30), E4276-4285. <https://doi.org/10.1073/pnas.1600537113>
- Alzu, A., Bermejo, R., Begnis, M., Lucca, C., Piccini, D., Carotenuto, W., Saponaro, M., Brambati, A., Cocito, A., Foiani, M., & Liberi, G. (2012). Senataxin associates with replication forks to protect fork integrity across RNA-polymerase-II-transcribed genes. *Cell*, *151*(4), 835-846. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.09.041>
- Anand, R., Jasrotia, A., Bundschuh, D., Howard, S. M., Ranjha, L., Stucki, M., & Cejka, P. (2019). NBS1 promotes the endonuclease activity of the MRE11-RAD50 complex by sensing CtIP phosphorylation. *The EMBO Journal*, *38*(7), e101005. <https://doi.org/10.15252/embj.2018101005>
- Anand, R., Ranjha, L., Cannavo, E., & Cejka, P. (2016). Phosphorylated CtIP Functions as a Co-factor of the MRE11-RAD50-NBS1 Endonuclease in DNA End Resection. *Molecular Cell*, *64*(5), 940-950. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.10.017>
- Andersen, P. L., Xu, F., & Xiao, W. (2008). Eukaryotic DNA damage tolerance and translesion synthesis through covalent modifications of PCNA. *Cell Research*, *18*(1), 162-173. <https://doi.org/10.1038/cr.2007.114>
- Andres, S. N., Appel, C. D., Westmoreland, J. W., Williams, J. S., Nguyen, Y., Robertson, P. D., Resnick, M. A., & Williams, R. S. (2015). Tetrameric Ctp1 coordinates DNA binding and DNA bridging in DNA double-strand-break repair. *Nature Structural & Molecular Biology*, *22*(2), 158-166. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2945>

- Andres, S. N., & Williams, R. S. (2017). CtIP/Ctp1/Sae2, molecular form fit for function. *DNA Repair*, *56*, 109-117. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2017.06.013>
- Arnoult, N., Correia, A., Ma, J., Merlo, A., Garcia-Gomez, S., Maric, M., Tognetti, M., Benner, C. W., Boulton, S. J., Saghatelian, A., & Karlseder, J. (2017). Regulation of DNA repair pathway choice in S and G2 phases by the NHEJ inhibitor CYREN. *Nature*, *549*(7673), 548-552. <https://doi.org/10.1038/nature24023>
- Arora, S., Deshpande, R. A., Budd, M., Campbell, J., Revere, A., Zhang, X., Schmidt, K. H., & Paull, T. T. (2017). Genetic Separation of Sae2 Nuclease Activity from Mre11 Nuclease Functions in Budding Yeast. *Molecular and Cellular Biology*, *37*(24), e00156-17. <https://doi.org/10.1128/MCB.00156-17>
- Arudchandran, A., Cerritelli, S., Narimatsu, S., Itaya, M., Shin, D.-Y., Shimada, Y., & Crouch, R. (2000). The absence of ribonuclease H1 or H2 alters the sensitivity of *Saccharomyces cerevisiae* to hydroxyurea, caffeine and ethyl methanesulphonate : Implications for roles of RNases H in DNA replication and repair. *Genes to Cells*, *5*(10), 789-802. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2443.2000.00373.x>
- Audebert, M., Salles, B., & Calsou, P. (2004). Involvement of poly(ADP-ribose) polymerase-1 and XRCC1/DNA ligase III in an alternative route for DNA double-strand breaks rejoining. *The Journal of Biological Chemistry*, *279*(53), 55117-55126. <https://doi.org/10.1074/jbc.M404524200>
- Audoynaud, C., Vagner, S., & Lambert, S. (2021). Non-homologous end-joining at challenged replication forks: An RNA connection? *Trends in Genetics*, *0*(0). <https://doi.org/10.1016/j.tig.2021.06.010>
- Aylon, Y., Liefshitz, B., & Kupiec, M. (2004). The CDK regulates repair of double-strand breaks by homologous recombination during the cell cycle. *The EMBO Journal*, *23*(24), 4868-4875. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600469>
- Azvolinsky, A., Dunaway, S., Torres, J. Z., Bessler, J. B., & Zakian, V. A. (2006). The *S. cerevisiae* Rrm3p DNA helicase moves with the replication fork and affects replication of all yeast chromosomes. *Genes & Development*, *20*(22), 3104-3116. <https://doi.org/10.1101/gad.1478906>
- Balakrishnan, L., & Bambara, R. A. (2013). Okazaki fragment metabolism. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *5*(2), a010173. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a010173>
- Balestrini, A., Ristic, D., Dionne, I., Liu, X. Z., Wyman, C., Wellinger, R. J., & Petrini, J. H. J. (2013). The Ku Heterodimer and the Metabolism of Single-Ended DNA Double-Strand Breaks. *Cell Reports*, *3*(6), 2033-2045. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2013.05.026>
- Balk, B., Dees, M., Bender, K., & Luke, B. (2014). The differential processing of telomeres in response to increased telomeric transcription and RNA-DNA hybrid accumulation. *RNA Biology*, *11*(2), 95-100. <https://doi.org/10.4161/rna.27798>
- Balk, B., Maicher, A., Dees, M., Klermund, J., Luke-Glaser, S., Bender, K., & Luke, B. (2013). Telomeric RNA-DNA hybrids affect telomere-length dynamics and senescence. *Nature Structural & Molecular Biology*, *20*(10), 1199-1205. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2662>

- Balmus, G., Pilger, D., Coates, J., Demir, M., Sczaniecka-Clift, M., Barros, A. C., Woods, M., Fu, B., Yang, F., Chen, E., Ostermaier, M., Stankovic, T., Ponstingl, H., Herzog, M., Yusa, K., Martinez, F. M., Durant, S. T., Galanty, Y., Beli, P., ... Jackson, S. P. (2019). ATM orchestrates the DNA-damage response to counter toxic non-homologous end-joining at broken replication forks. *Nature Communications*, *10*(1), 87. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-07729-2>
- Baranovskiy, A. G., Babayeva, N. D., Zhang, Y., Gu, J., Suwa, Y., Pavlov, Y. I., & Tahirov, T. H. (2016). Mechanism of Concerted RNA-DNA Primer Synthesis by the Human Primosome *. *Journal of Biological Chemistry*, *291*(19), 10006-10020. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.717405>
- Barroso, S., Herrera-Moyano, E., Muñoz, S., García-Rubio, M., Gómez-González, B., & Aguilera, A. (2019). The DNA damage response acts as a safeguard against harmful DNA-RNA hybrids of different origins. *EMBO Reports*, *20*(9), e47250. <https://doi.org/10.15252/embr.201847250>
- Bartek, J., & Lukas, J. (2003). Chk1 and Chk2 kinases in checkpoint control and cancer. *Cancer Cell*, *3*(5), 421-429. [https://doi.org/10.1016/S1535-6108\(03\)00110-7](https://doi.org/10.1016/S1535-6108(03)00110-7)
- Bartsch, K., Knittler, K., Borowski, C., Rudnik, S., Damme, M., Aden, K., Spehlmann, M. E., Frey, N., Saftig, P., Chalaris, A., & Rabe, B. (2017). Absence of RNase H2 triggers generation of immunogenic micronuclei removed by autophagy. *Human Molecular Genetics*, *26*(20), 3960-3972. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddx283>
- Baumann, P., & Cech, T. R. (2000). Protection of Telomeres by the Ku Protein in Fission Yeast. *Molecular Biology of the Cell*, *11*(10), 3265-3275. <https://doi.org/10.1091/mbc.11.10.3265>
- Bell, S. P., & Stillman, B. (1992). ATP-dependent recognition of eukaryotic origins of DNA replication by a multiprotein complex. *Nature*, *357*(6374), 128-134. <https://doi.org/10.1038/357128a0>
- Benson, F. E., Baumann, P., & West, S. C. (1998). Synergistic actions of Rad51 and Rad52 in recombination and DNA repair. *Nature*, *391*(6665), 401-404. <https://doi.org/10.1038/34937>
- Berti, M., Cortez, D., & Lopes, M. (2020). The plasticity of DNA replication forks in response to clinically relevant genotoxic stress. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *21*(10), 633-651. <https://doi.org/10.1038/s41580-020-0257-5>
- Berti, M., Ray Chaudhuri, A., Thangavel, S., Gomathinayagam, S., Kenig, S., Vujanovic, M., Odreman, F., Glatter, T., Graziano, S., Mendoza-Maldonado, R., Marino, F., Lucic, B., Biasin, V., Gstaiger, M., Aebersold, R., Sidorova, J. M., Monnat, R. J., Lopes, M., & Vindigni, A. (2013). Human RECQ1 promotes restart of replication forks reversed by DNA topoisomerase I inhibition. *Nature Structural & Molecular Biology*, *20*(3), 347-354. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2501>

- Bhat, K. P., & Cortez, D. (2018). RPA and RAD51 : Fork reversal, fork protection, and genome stability. *Nature Structural & Molecular Biology*, 25(6), 446-453. <https://doi.org/10.1038/s41594-018-0075-z>
- Bhatia, V., Barroso, S. I., García-Rubio, M. L., Tumini, E., Herrera-Moyano, E., & Aguilera, A. (2014). BRCA2 prevents R-loop accumulation and associates with TREX-2 mRNA export factor PCID2. *Nature*, 511(7509), 362-365. <https://doi.org/10.1038/nature13374>
- Bhatia, V., Valdés-Sánchez, L., Rodríguez-Martínez, D., & Bhattacharya, S. S. (2018). Formation of 53BP1 foci and ATM activation under oxidative stress is facilitated by RNA:DNA hybrids and loss of ATM-53BP1 expression promotes photoreceptor cell survival in mice. *F1000Research*, 7, 1233. <https://doi.org/10.12688/f1000research.15579.1>
- Bhattacharya, S., Srinivasan, K., Abdisalaam, S., Su, F., Raj, P., Dozmorov, I., Mishra, R., Wakeland, E. K., Ghose, S., Mukherjee, S., & Asaithamby, A. (2017). RAD51 interconnects between DNA replication, DNA repair and immunity. *Nucleic Acids Research*, 45(8), 4590-4605. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx126>
- Bi, X. (2015). Mechanism of DNA damage tolerance. *World Journal of Biological Chemistry*, 6(3), 48. <https://doi.org/10.4331/wjbc.v6.i3.48>
- Biehs, R., Steinlage, M., Barton, O., Juhász, S., Künzel, J., Spies, J., Shibata, A., Jeggo, P. A., & Löbrich, M. (2017). DNA Double-Strand Break Resection Occurs during Non-homologous End Joining in G1 but Is Distinct from Resection during Homologous Recombination. *Molecular Cell*, 65(4), 671-684.e5. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.12.016>
- Black, S. J., Kashkina, E., Kent, T., & Pomerantz, R. T. (2016). DNA Polymerase θ : A Unique Multifunctional End-Joining Machine. *Genes*, 7(9), 67. <https://doi.org/10.3390/genes7090067>
- Bochman, M. L., & Schwacha, A. (2008). The Mcm2-7 Complex Has In Vitro Helicase Activity. *Molecular Cell*, 31(2), 287-293. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2008.05.020>
- Bonath, F., Domingo-Prim, J., Tarbier, M., Friedländer, M. R., & Visa, N. (2018). Next-generation sequencing reveals two populations of damage-induced small RNAs at endogenous DNA double-strand breaks. *Nucleic Acids Research*, 46(22), 11869-11882. <https://doi.org/10.1093/nar/gky1107>
- Bonetti, D., Martina, M., Falcettoni, M., & Longhese, M. P. (2013). Telomere-end processing : Mechanisms and regulation. *Chromosoma*. <https://doi.org/10.1007/s00412-013-0440-y>
- Boulé, J.-B., & Zakian, V. A. (2007). The yeast Pif1p DNA helicase preferentially unwinds RNA–DNA substrates. *Nucleic Acids Research*, 35(17), 5809-5818. <https://doi.org/10.1093/nar/gkm613>
- Brambati, A., Colosio, A., Zardoni, L., Galanti, L., & Liberi, G. (2015). Replication and transcription on a collision course : Eukaryotic regulation mechanisms and implications for DNA stability. *Frontiers in Genetics*, 6, 166. <https://doi.org/10.3389/fgene.2015.00166>

- Brambati, A., Zardoni, L., Achar, Y. J., Piccini, D., Galanti, L., Colosio, A., Foiani, M., & Liberi, G. (2018). Dormant origins and fork protection mechanisms rescue sister forks arrested by transcription. *Nucleic Acids Research*, *46*(3), 1227-1239. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx945>
- Branzei, D., & Foiani, M. (2010). Maintaining genome stability at the replication fork. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *11*(3), 208-219. <https://doi.org/10.1038/nrm2852>
- Branzei, D., & Szakal, B. (2016). DNA damage tolerance by recombination : Molecular pathways and DNA structures. *DNA Repair*, *44*, 68-75. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2016.05.008>
- Britton, S., Chanut, P., Delteil, C., Barboule, N., Frit, P., & Calsou, P. (2020). ATM antagonizes NHEJ proteins assembly and DNA-ends synapsis at single-ended DNA double strand breaks. *Nucleic Acids Research*, *48*(17), 9710-9723. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa723>
- Bugreev, D. V., Yu, X., Egelman, E. H., & Mazin, A. V. (2007). Novel pro- and anti-recombination activities of the Bloom's syndrome helicase. *Genes & Development*, *21*(23), 3085-3094. <https://doi.org/10.1101/gad.1609007>
- Burger, K., Schlackow, M., & Gullerova, M. (2019). Tyrosine kinase c-Abl couples RNA polymerase II transcription to DNA double-strand breaks. *Nucleic Acids Research*, *47*(7), 3467-3484. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz024>
- Burgers, P. M. J. (2009). Polymerase Dynamics at the Eukaryotic DNA Replication Fork *. *Journal of Biological Chemistry*, *284*(7), 4041-4045. <https://doi.org/10.1074/jbc.R800062200>
- Burgers, P. M. J., & Kunkel, T. A. (2017). Eukaryotic DNA Replication Fork. *Annual Review of Biochemistry*, *86*, 417-438. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-061516-044709>
- Burgess, R. C., Misteli, T., & Oberdoerffer, P. (2012). DNA damage, chromatin, and transcription : The trinity of aging. *Current opinion in cell biology*, *24*(6), 724-730. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2012.07.005>
- Burleigh, K., Maltbaek, J. H., Cambier, S., Green, R., Gale, M., James, R. C., & Stetson, D. B. (2020). Human DNA-PK activates a STING-independent DNA sensing pathway. *Science immunology*, *5*(43), eaba4219. <https://doi.org/10.1126/sciimmunol.aba4219>
- Burma, S., Chen, B. P., Murphy, M., Kurimasa, A., & Chen, D. J. (2001). ATM Phosphorylates Histone H2AX in Response to DNA Double-strand Breaks *. *Journal of Biological Chemistry*, *276*(45), 42462-42467. <https://doi.org/10.1074/jbc.C100466200>
- Cadoret, J.-C., Meisch, F., Hassan-Zadeh, V., Luyten, I., Guillet, C., Duret, L., Quesneville, H., & Prioleau, M.-N. (2008). Genome-wide studies highlight indirect links between human replication origins and gene regulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *105*(41), 15837-15842. <https://doi.org/10.1073/pnas.0805208105>
- Callen, E., Zong, D., Wu, W., Wong, N., Stanlie, A., Ishikawa, M., Pavani, R., Dumitrache, L. C., Byrum, A. K., Mendez-Dorantes, C., Martinez, P., Canela, A., Maman, Y., Day, A., Kruhlak, M. J., Blasco, M. A., Stark, J. M., Mosammamaparast, N., McKinnon, P. J., & Nussenzweig, A. (2020). 53BP1 Enforces Distinct Pre- and Post-resection Blocks on Homologous

- Recombination. *Molecular Cell*, 77(1), 26-38.e7. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2019.09.024>
- Cannavo, E., & Cejka, P. (2014). Sae2 promotes dsDNA endonuclease activity within Mre11-Rad50-Xrs2 to resect DNA breaks. *Nature*, 514(7520), 122-125. <https://doi.org/10.1038/nature13771>
- Cannavo, E., Cejka, P., & Kowalczykowski, S. C. (2013). Relationship of DNA degradation by *Saccharomyces cerevisiae* exonuclease 1 and its stimulation by RPA and Mre11-Rad50-Xrs2 to DNA end resection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(18), E1661-1668. <https://doi.org/10.1073/pnas.1305166110>
- Casari, E., Rinaldi, C., Marsella, A., Gnugnoli, M., Colombo, C. V., Bonetti, D., & Longhese, M. P. (2019). Processing of DNA Double-Strand Breaks by the MRX Complex in a Chromatin Context. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 0. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2019.00043>
- Caspari, T., & Carr, A. M. (1999). DNA structure checkpoint pathways in *Schizosaccharomyces pombe*. *Biochimie*, 81(1-2), 173-181. [https://doi.org/10.1016/S0300-9084\(99\)80050-9](https://doi.org/10.1016/S0300-9084(99)80050-9)
- Castel, S. E., Ren, J., Bhattacharjee, S., Chang, A.-Y., Sánchez, M., Valbuena, A., Antequera, F., & Martienssen, R. A. (2014). Dicer Promotes Transcription Termination at Sites of Replication Stress to Maintain Genome Stability. *Cell*, 159(3), 572-583. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.09.031>
- Ceballos, S. J., & Heyer, W.-D. (2011). Functions of the Snf2/Swi2 family Rad54 motor protein in homologous recombination. *Biochimica et biophysica acta*, 1809(9), 509-523. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2011.06.006>
- Cejka, P., Cannavo, E., Polaczek, P., Masuda-Sasa, T., Pokharel, S., Campbell, J. L., & Kowalczykowski, S. C. (2010). DNA end resection by Dna2-Sgs1-RPA and its stimulation by Top3-Rmi1 and Mre11-Rad50-Xrs2. *Nature*, 467(7311), 112-116. <https://doi.org/10.1038/nature09355>
- Celli, G. B., Denchi, E. L., & de Lange, T. (2006). Ku70 stimulates fusion of dysfunctional telomeres yet protects chromosome ends from homologous recombination. *Nature Cell Biology*, 8(8), 885-890. <https://doi.org/10.1038/ncb1444>
- Cerritelli, S. M., & Crouch, R. J. (2009). Ribonuclease H: The enzymes in eukaryotes. *The FEBS Journal*, 276(6), 1494-1505. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2009.06908.x>
- Cerritelli, S. M., & Crouch, R. J. (2019). *RNase H2-RED carpets the path to eukaryotic RNase H2 functions*. Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2019.102736>
- Cerritelli, S. M., & El Hage, A. (2020). RNases H1 and H2: Guardians of the stability of the nuclear genome when supply of dNTPs is limiting for DNA synthesis. *Current Genetics*, 66(6), 1073-1084. <https://doi.org/10.1007/s00294-020-01086-8>
- Cerritelli, S. M., Frolova, E. G., Feng, C., Grinberg, A., Love, P. E., & Crouch, R. J. (2003). Failure to Produce Mitochondrial DNA Results in Embryonic Lethality in Rnaseh1 Null Mice. *Molecular Cell*, 11(3), 807-815. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(03\)00088-1](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(03)00088-1)

- Chakraborty, A., Tapryal, N., Venkova, T., Horikoshi, N., Pandita, R. K., Sarker, A. H., Sarker, P. S., Pandita, T. K., & Hazra, T. K. (2016). Classical non-homologous end-joining pathway utilizes nascent RNA for error-free double-strand break repair of transcribed genes. *Nature Communications*, *7*, 13049. <https://doi.org/10.1038/ncomms13049>
- Chakraborty, P., & Grosse, F. (2011). Human DHX9 helicase preferentially unwinds RNA-containing displacement loops (R-loops) and G-quadruplexes. *DNA Repair*, *10*(6), 654-665. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2011.04.013>
- Chang, E. Y.-C., Tsai, S., Aristizabal, M. J., Wells, J. P., Coulombe, Y., Busatto, F. F., Chan, Y. A., Kumar, A., Dan Zhu, Y., Wang, A. Y.-H., Fournier, L.-A., Hieter, P., Kobor, M. S., Masson, J.-Y., & Stirling, P. C. (2019). MRE11-RAD50-NBS1 promotes Fanconi Anemia R-loop suppression at transcription-replication conflicts. *Nature Communications*, *10*(1), 4265. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-12271-w>
- Chanut, P., Britton, S., Coates, J., Jackson, S. P., & Calsou, P. (2016). Coordinated nuclease activities counteract Ku at single-ended DNA double-strand breaks. *Nature Communications*, *7*(1), 12889. <https://doi.org/10.1038/ncomms12889>
- Chappidi, N., Nascakova, Z., Boleslavskaya, B., Zellweger, R., Isik, E., Andrs, M., Menon, S., Dobrovolna, J., Balbo Pogliano, C., Matos, J., Porro, A., Lopes, M., & Janscak, P. (2020). Fork Cleavage-Religation Cycle and Active Transcription Mediate Replication Restart after Fork Stalling at Co-transcriptional R-Loops. *Molecular Cell*, *77*(3), 528-541.e8. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2019.10.026>
- Chédin, F., Hartono, S. R., Sanz, L. A., & Vanoosthuyse, V. (2021). Best practices for the visualization, mapping, and manipulation of R-loops. *The EMBO Journal*, *40*(4), e106394. <https://doi.org/10.15252/embj.2020106394>
- Chen, B.-R., Quinet, A., Byrum, A. K., Jackson, J., Berti, M., Thangavel, S., Bredemeyer, A. L., Hindi, I., Mosammamaparast, N., Tyler, J. K., Vindigni, A., & Sleckman, B. P. (2019). XLF and H2AX function in series to promote replication fork stability. *The Journal of Cell Biology*, *218*(7), 2113-2123. <https://doi.org/10.1083/jcb.201808134>
- Chen, H., Lisby, M., & Symington, L. S. (2013). RPA coordinates DNA end resection and prevents formation of DNA hairpins. *Molecular Cell*, *50*(4), 589-600. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2013.04.032>
- Chen, L., Chen, J. Y., Zhang, X., Gu, Y., Xiao, R., Shao, C., Tang, P., Qian, H., Luo, D., Li, H., Zhou, Y., Zhang, D. E., & Fu, X. D. (2017). R-ChIP Using Inactive RNase H Reveals Dynamic Coupling of R-loops with Transcriptional Pausing at Gene Promoters. *Molecular Cell*, *68*(4), 745-757.e5. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.10.008>
- Chen, X., Cui, D., Papusha, A., Zhang, X., Chu, C.-D., Tang, J., Chen, K., Pan, X., & Ira, G. (2012). The Fun30 nucleosome remodeller promotes resection of DNA double-strand break ends. *Nature*, *489*(7417), 576-580. <https://doi.org/10.1038/nature11355>
- Chon, H., Sparks, J. L., Rychlik, M., Nowotny, M., Burgers, P. M., Crouch, R. J., & Cerritelli, S. M. (2013). RNase H2 roles in genome integrity revealed by unlinking its activities. *Nucleic Acids Research*, *41*(5), 3130-3143. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt027>

- Chon, H., Vassilev, A., DePamphilis, M. L., Zhao, Y., Zhang, J., Burgers, P. M., Crouch, R. J., & Cerritelli, S. M. (2009). Contributions of the two accessory subunits, RNASEH2B and RNASEH2C, to the activity and properties of the human RNase H2 complex. *Nucleic Acids Research*, *37*(1), 96-110. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn913>
- Chuang, R.-Y., Chretien, L., Dai, J., & Kelly, T. J. (2002). Purification and characterization of the *Schizosaccharomyces pombe* origin recognition complex : Interaction with origin DNA and Cdc18 protein. *The Journal of Biological Chemistry*, *277*(19), 16920-16927. <https://doi.org/10.1074/jbc.M107710200>
- Clouaire, T., & Legube, G. (2015). DNA double strand break repair pathway choice : A chromatin based decision? *Nucleus (Austin, Tex.)*, *6*(2), 107-113. <https://doi.org/10.1080/19491034.2015.1010946>
- Codlin, S., & Dalgaard, J. Z. (2003). Complex mechanism of site-specific DNA replication termination in fission yeast. *The EMBO Journal*, *22*(13), 3431-3440. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdg330>
- Cohen, S., Puget, N., Lin, Y.-L., Clouaire, T., Aguirrebengoa, M., Rocher, V., Pasero, P., Canitrot, Y., & Legube, G. (2018). Senataxin resolves RNA:DNA hybrids forming at DNA double-strand breaks to prevent translocations. *Nature Communications*, *9*(1), 533. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-02894-w>
- Coquel, F., Silva, M.-J., Técher, H., Zadorozhny, K., Sharma, S., Nieminuszczy, J., Mettling, C., Dardillac, E., Barthe, A., Schmitz, A.-L., Promonet, A., Cribier, A., Sarrazin, A., Niedzwiedz, W., Lopez, B., Costanzo, V., Krejci, L., Chabes, A., Benkirane, M., ... Pasero, P. (2018). SAMHD1 acts at stalled replication forks to prevent interferon induction. *Nature*, *557*(7703), 57-61. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0050-1>
- Cosgrove, A. J., Nieduszynski, C. A., & Donaldson, A. D. (2002). Ku complex controls the replication time of DNA in telomere regions. *Genes & Development*, *16*(19), 2485-2490. <https://doi.org/10.1101/gad.231602>
- Costantino, L., & Koshland, D. (2018). Genome-wide Map of R-Loop-Induced Damage Reveals How a Subset of R-Loops Contributes to Genomic Instability. *Molecular Cell*, *71*(4), 487-497.e3. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2018.06.037>
- Costelloe, T., Louge, R., Tomimatsu, N., Mukherjee, B., Martini, E., Khadaroo, B., Dubois, K., Wiegant, W. W., Thierry, A., Burma, S., van Attikum, H., & Llorente, B. (2012). The yeast Fun30 and human SMARCAD1 chromatin remodellers promote DNA end resection. *Nature*, *489*(7417), 581-584. <https://doi.org/10.1038/nature11353>
- Costes, A., & Lambert, S. A. E. (2012). Homologous recombination as a replication fork escort : Fork-protection and recovery. *Biomolecules*, *3*(1), 39-71. <https://doi.org/10.3390/biom3010039>
- Cramer, P., Armache, K.-J., Baumli, S., Benkert, S., Brueckner, F., Buchen, C., Damsma, G. E., Dengl, S., Geiger, S. R., Jasiak, A. J., Jawhari, A., Jennebach, S., Kamenski, T., Kettenberger, H., Kuhn, C.-D., Lehmann, E., Leike, K., Sydow, J. F., & Vannini, A. (2008). Structure of

- eukaryotic RNA polymerases. *Annual Review of Biophysics*, 37, 337-352. <https://doi.org/10.1146/annurev.biophys.37.032807.130008>
- Cristini, A., Groh, M., Kristiansen, M. S., & Gromak, N. (2018). RNA/DNA Hybrid Interactome Identifies DXH9 as a Molecular Player in Transcriptional Termination and R-Loop-Associated DNA Damage. *Cell Reports*, 23(6), 1891-1905. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.04.025>
- Crossley, M. P., Bocek, M., & Cimprich, K. A. (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>
- Crow, Y. J., Chase, D. S., Schmidt, J. L., Szykiewicz, M., Forte, G. M. A., Gornall, H. L., Oojageer, A., Anderson, B., Pizzino, A., Helman, G., Abdel-Hamid, M. S., Abdel-Salam, G. M., Ackroyd, S., Aeby, A., Agosta, G., Albin, C., Allon-Shalev, S., Arellano, M., Ariaudo, G., ... Rice, G. I. (2015). Characterization of Human Disease Phenotypes Associated with Mutations in TREX1, RNASEH2A, RNASEH2B, RNASEH2C, SAMHD1, ADAR, and IFIH1. *American journal of medical genetics. Part A*, 0(2), 296-312. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.36887>
- Crow, Y. J., Leitch, A., Hayward, B. E., Garner, A., Parmar, R., Griffith, E., Ali, M., Semple, C., Aicardi, J., Babul-Hirji, R., Baumann, C., Baxter, P., Bertini, E., Chandler, K. E., Chitayat, D., Cau, D., Déry, C., Fazzi, E., Goizet, C., ... Jackson, A. P. (2006). Mutations in genes encoding ribonuclease H2 subunits cause Aicardi-Goutières syndrome and mimic congenital viral brain infection. *Nature Genetics*, 38(8), 910-916. <https://doi.org/10.1038/ng1842>
- Cusanelli, E., Romero, C. A. P., & Chartrand, P. (2013). Telomeric Noncoding RNA TERRA Is Induced by Telomere Shortening to Nucleate Telomerase Molecules at Short Telomeres. *Molecular Cell*, 51(6), 780-791. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2013.08.029>
- Daboussi, F., Courbet, S., Benhamou, S., Kannouche, P., Zdzienicka, M. Z., Debatisse, M., & Lopez, B. S. (2008). A homologous recombination defect affects replication-fork progression in mammalian cells. *Journal of Cell Science*, 121(2), 162-166. <https://doi.org/10.1242/jcs.010330>
- D'Adda Di Fagagna, F. (2008). Living on a break: Cellular senescence as a DNA-damage response. *Nature Reviews Cancer*, 8(7), 512-522. <https://doi.org/10.1038/nrc2440>
- Dalby, A. B., Goodrich, K. J., Pflingsten, J. S., & Cech, T. R. (2013). RNA recognition by the DNA end-binding Ku heterodimer. *RNA (New York, N.Y.)*, 19(6), 841-851. <https://doi.org/10.1261/rna.038703.113>
- D'Alessandro, G., Whelan, D. R., Howard, S. M., Vitelli, V., Renaudin, X., Adamowicz, M., Iannelli, F., Jones-Weinert, C. W., Lee, M., Matti, V., Lee, W. T. C., Morten, M. J., Venkitaraman, A. R., Cejka, P., Rothenberg, E., & d'Adda di Fagagna, F. (2018). BRCA2 controls DNA:RNA hybrid level at DSBs by mediating RNase H2 recruitment. *Nature Communications*, 9(1), 5376. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-07799-2>
- Daley, J. M., Tomimatsu, N., Hooks, G., Wang, W., Miller, A. S., Xue, X., Nguyen, K. A., Kaur, H., Williamson, E., Mukherjee, B., Hromas, R., Burma, S., & Sung, P. (2020). Specificity of end resection pathways for double-strand break regions containing ribonucleotides and

- base lesions. *Nature Communications*, 11(1), 3088. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-16903-4>
- Dalgaard, J. Z., & Klar, A. J. (2001). A DNA replication-arrest site RTS1 regulates imprinting by determining the direction of replication at mat1 in *S. pombe*. *Genes & Development*, 15(16), 2060-2068. <https://doi.org/10.1101/gad.200801>
- Dang, T. T., & Morales, J. C. (2020). XRN2 Links RNA:DNA Hybrid Resolution to Double Strand Break Repair Pathway Choice. *Cancers*, 12(7), E1821. <https://doi.org/10.3390/cancers12071821>
- Delamarre, A., Barthe, A., de la Roche Saint-André, C., Luciano, P., Forey, R., Padioleau, I., Skrzypczak, M., Ginalski, K., Géli, V., Pasero, P., & Lengronne, A. (2020). MRX Increases Chromatin Accessibility at Stalled Replication Forks to Promote Nascent DNA Resection and Cohesin Loading. *Molecular Cell*, 77(2), 395-410.e3. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2019.10.029>
- Dev, H., Chiang, T.-W. W., Lescale, C., de Krijger, I., Martin, A. G., Pilger, D., Coates, J., Sczaniecka-Clift, M., Wei, W., Ostermaier, M., Herzog, M., Lam, J., Shea, A., Demir, M., Wu, Q., Yang, F., Fu, B., Lai, Z., Balmus, G., ... Jackson, S. P. (2018). Shieldin complex promotes DNA end-joining and counters homologous recombination in BRCA1-null cells. *Nature Cell Biology*, 20(8), 954-965. <https://doi.org/10.1038/s41556-018-0140-1>
- Dewar, J. M., Low, E., Mann, M., Räschle, M., & Walter, J. C. (2017). CRL2Lrr1 promotes unloading of the vertebrate replisome from chromatin during replication termination. *Genes & Development*, 31(3), 275-290. <https://doi.org/10.1101/gad.291799.116>
- Dewar, J. M., & Walter, J. C. (2017). Mechanisms of DNA replication termination. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 18(8), 507-516. <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.42>
- Diffley, J. F. X., Cocker, J. H., Dowell, S. J., & Rowley, A. (1994). Two steps in the assembly of complexes at yeast replication origins in vivo. *Cell*, 78(2), 303-316. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(94\)90299-2](https://doi.org/10.1016/0092-8674(94)90299-2)
- Dion, V., Kalck, V., Horigome, C., Towbin, B. D., & Gasser, S. M. (2012). Increased mobility of double-strand breaks requires Mec1, Rad9 and the homologous recombination machinery. *Nature Cell Biology*, 14(5), 502-509. <https://doi.org/10.1038/ncb2465>
- Domingo-Prim, J., Bonath, F., & Visa, N. (2020). RNA at DNA Double-Strand Breaks: The Challenge of Dealing with DNA:RNA Hybrids. *BioEssays*, 42(5), 1900225. <https://doi.org/10.1002/bies.201900225>
- Domingo-Prim, J., Endara-Coll, M., Bonath, F., Jimeno, S., Prados-Carvajal, R., Friedländer, M. R., Huertas, P., & Visa, N. (2019). EXOSC10 is required for RPA assembly and controlled DNA end resection at DNA double-strand breaks. *Nature communications*, 10(1), 2135. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-10153-9>
- Donovan, S., Harwood, J., Drury, L. S., & Diffley, J. F. X. (1997). Cdc6p-dependent loading of Mcm proteins onto pre-replicative chromatin in budding yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94(11), 5611-5616. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.11.5611>

- Downs, J. A., & Jackson, S. P. (2004). A means to a DNA end : The many roles of Ku. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *5*(5), 367-378. <https://doi.org/10.1038/nrm1367>
- Drané, P., Brault, M.-E., Cui, G., Meghani, K., Chaubey, S., Detappe, A., Parnandi, N., He, Y., Zheng, X.-F., Botuyan, M. V., Kalousi, A., Yewdell, W. T., Münch, C., Harper, J. W., Chaudhuri, J., Soutoglou, E., Mer, G., & Chowdhury, D. (2017). TIRR regulates 53BP1 by masking its histone methyl-lysine binding function. *Nature*, *543*(7644), 211-216. <https://doi.org/10.1038/nature21358>
- Dudášová, Z., Dudáš, A., & Chovanec, M. (2004). Non-homologous end-joining factors of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiology Reviews*, *28*(5), 581-601. <https://doi.org/10.1016/j.femsre.2004.06.001>
- Dueva, R., & Iliakis, G. (2020). Replication protein A : A multifunctional protein with roles in DNA replication, repair and beyond. *NAR Cancer*, *2*(3), zcaa022. <https://doi.org/10.1093/narcan/zcaa022>
- Dynan, W. S., & Yoo, S. (1998). Interaction of Ku protein and DNA-dependent protein kinase catalytic subunit with nucleic acids. *Nucleic Acids Research*, *26*(7), 1551-1559. <https://doi.org/10.1093/nar/26.7.1551>
- Eapen, V. V., Sugawara, N., Tsabar, M., Wu, W.-H., & Haber, J. E. (2012). The *Saccharomyces cerevisiae* chromatin remodeler Fun30 regulates DNA end resection and checkpoint deactivation. *Molecular and Cellular Biology*, *32*(22), 4727-4740. <https://doi.org/10.1128/MCB.00566-12>
- Eid, W., Steger, M., El-Shemerly, M., Ferretti, L. P., Peña-Díaz, J., König, C., Valtorta, E., Sartori, A. A., & Ferrari, S. (2010). DNA end resection by CtIP and exonuclease 1 prevents genomic instability. *EMBO Reports*, *11*(12), 962-968. <https://doi.org/10.1038/embor.2010.157>
- Ensminger, M., & Löbrich, M. (2020). One end to rule them all : Non-homologous end-joining and homologous recombination at DNA double-strand breaks. *The British Journal of Radiology*, *93*(1115), 20191054. <https://doi.org/10.1259/bjr.20191054>
- Erdal, E., Haider, S., Rehwinkel, J., Harris, A. L., & McHugh, P. J. (2017). A prosurvival DNA damage-induced cytoplasmic interferon response is mediated by end resection factors and is limited by Trex1. *Genes & Development*, *31*(4), 353-369. <https://doi.org/10.1101/gad.289769.116>
- Fabre, F. (1978). Induced intragenic recombination in yeast can occur during the G1 mitotic phase. *Nature*, *272*(5656), 795-798. <https://doi.org/10.1038/272795a0>
- Falck, J., Mailand, N., Syljuåsen, R. G., Bartek, J., & Lukas, J. (2001). The ATM-Chk2-Cdc25A checkpoint pathway guards against radioresistant DNA synthesis. *Nature*, *410*(6830), 842-847. <https://doi.org/10.1038/35071124>
- Falkenberg, M., & Gustafsson, C. M. (2020). Mammalian mitochondrial DNA replication and mechanisms of deletion formation. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, *55*(6), 509-524. <https://doi.org/10.1080/10409238.2020.1818684>
- Feng, L., & Chen, J. (2012). The E3 ligase RNF8 regulates KU80 removal and NHEJ repair. *Nature Structural & Molecular Biology*, *19*(2), 201-206. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2211>

- Feng, S., & Cao, Z. (2016). Is the role of human RNase H2 restricted to its enzyme activity? *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, *121*(1), 66-73. <https://doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2015.11.001>
- Feretzaki, M., Pospíšilová, M., Fernandes, R. V., Lunardi, T., Krejci, L., & Lingner, J. (2020). RAD51-dependent recruitment of TERRA lncRNA to telomeres through R-loops. *Nature*, *587*(7833), 303-308. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2815-6>
- Ferguson, B. J., Mansur, D. S., Peters, N. E., Ren, H., & Smith, G. L. (2012). DNA-PK is a DNA sensor for IRF-3-dependent innate immunity. *eLife*, *1*, e00047. <https://doi.org/10.7554/eLife.00047>
- Ferrari, M., Dibitetto, D., De Gregorio, G., Eapen, V. V., Rawal, C. C., Lazzaro, F., Tsabar, M., Marini, F., Haber, J. E., & Pellicoli, A. (2015). Functional Interplay between the 53BP1-Ortholog Rad9 and the Mre11 Complex Regulates Resection, End-Tethering and Repair of a Double-Strand Break. *PLoS Genetics*, *11*(1), e1004928. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004928>
- Ferreira, M. G., & Cooper, J. P. (2004). Two modes of DNA double-strand break repair are reciprocally regulated through the fission yeast cell cycle. *Genes & Development*, *18*(18), 2249-2254. <https://doi.org/10.1101/gad.315804>
- Forget, A. L., & Kowalczykowski, S. C. (2012). Single-molecule imaging of DNA pairing by RecA reveals a three-dimensional homology search. *Nature*, *482*(7385), 423-427. <https://doi.org/10.1038/nature10782>
- Fortini, P., & Dogliotti, E. (2007). Base damage and single-strand break repair : Mechanisms and functional significance of short- and long-patch repair subpathways. *DNA Repair*, *6*(4), 398-409. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2006.10.008>
- Fragkos, M., Ganier, O., Coulombe, P., & Méchali, M. (2015). DNA replication origin activation in space and time. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *16*(6), 360-374. <https://doi.org/10.1038/nrm4002>
- Francia, S., Cabrini, M., Matti, V., Oldani, A., & d'Adda di Fagagna, F. (2016). DICER, DROSHA and DNA damage response RNAs are necessary for the secondary recruitment of DNA damage response factors. *Journal of Cell Science*, *129*(7), 1468-1476. <https://doi.org/10.1242/jcs.182188>
- Francia, S., Michelini, F., Saxena, A., Tang, D., de Hoon, M., Anelli, V., Mione, M., Carninci, P., & d'Adda di Fagagna, F. (2012). Site-specific DICER and DROSHA RNA products control the DNA damage response. *Nature*, *488*(7410), 231-235. <https://doi.org/10.1038/nature11179>
- Gaillard, H., García-Muse, T., & Aguilera, A. (2015). Replication stress and cancer. *Nature Reviews Cancer*, *15*(5), 276-289. <https://doi.org/10.1038/nrc3916>
- Gambus, A., Jones, R. C., Sanchez-Diaz, A., Kanemaki, M., van Deursen, F., Edmondson, R. D., & Labib, K. (2006). GINS maintains association of Cdc45 with MCM in replisome progression complexes at eukaryotic DNA replication forks. *Nature Cell Biology*, *8*(4), 358-366. <https://doi.org/10.1038/ncb1382>

- Gao, M., Wei, W., Li, M.-M., Wu, Y.-S., Ba, Z., Jin, K.-X., Li, M.-M., Liao, Y.-Q., Adhikari, S., Chong, Z., Zhang, T., Guo, C.-X., Tang, T.-S., Zhu, B.-T., Xu, X.-Z., Mailand, N., Yang, Y.-G., Qi, Y., & Rendtlew Danielsen, J. M. (2014). Ago2 facilitates Rad51 recruitment and DNA double-strand break repair by homologous recombination. *Cell Research*, *24*(5), 532-541. <https://doi.org/10.1038/cr.2014.36>
- Garcia, V., Phelps, S. E. L., Gray, S., & Neale, M. J. (2011). Bidirectional resection of DNA double-strand breaks by Mre11 and Exo1. *Nature*, *479*(7372), 241-244. <https://doi.org/10.1038/nature10515>
- García-Muse, T., & Aguilera, A. (2019). R Loops : From Physiological to Pathological Roles. *Cell*, *179*(3), 604-618. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.08.055>
- García-Rubio, M., Aguilera, P., Lafuente-Barquero, J., Ruiz, J. F., Simon, M.-N., Geli, V., Rondón, A. G., & Aguilera, A. (2018). Yra1-bound RNA-DNA hybrids cause orientation-independent transcription-replication collisions and telomere instability. *Genes & Development*, *32*(13-14), 965-977. <https://doi.org/10.1101/gad.311274.117>
- García-Rubio, M. L., Pérez-Calero, C., Barroso, S. I., Tumini, E., Herrera-Moyano, E., Rosado, I. V., & Aguilera, A. (2015). The Fanconi Anemia Pathway Protects Genome Integrity from R-loops. *PLoS Genetics*, *11*(11), e1005674. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005674>
- Garzón, J., Ursich, S., Lopes, M., Hiraga, S.-I., & Donaldson, A. D. (2019). Human RIF1-Protein Phosphatase 1 Prevents Degradation and Breakage of Nascent DNA on Replication Stalling. *Cell Reports*, *27*(9), 2558-2566.e4. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.05.002>
- Ge, X. Q., Jackson, D. A., & Blow, J. J. (2007). Dormant origins licensed by excess Mcm2-7 are required for human cells to survive replicative stress. *Genes & Development*, *21*(24), 3331-3341. <https://doi.org/10.1101/gad.457807>
- Georgescu, R. E., Schauer, G. D., Yao, N. Y., Langston, L. D., Yurieva, O., Zhang, D., Finkelstein, J., & O'Donnell, M. E. (2015). Reconstitution of a eukaryotic replisome reveals suppression mechanisms that define leading/lagging strand operation. *eLife*, *4*, e04988. <https://doi.org/10.7554/eLife.04988>
- Ghodgaonkar, M. M., Lazzaro, F., Olivera-Pimentel, M., Artola-Borán, M., Cejka, P., Reijns, M. A., Jackson, A. P., Plevani, P., Muzi-Falconi, M., & Jiricny, J. (2013). Ribonucleotides Misincorporated into DNA Act as Strand-Discrimination Signals in Eukaryotic Mismatch Repair. *Molecular Cell*, *50*(3), 323-332. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2013.03.019>
- González-Prieto, R., Muñoz-Cabello, A. M., Cabello-Lobato, M. J., & Prado, F. (2013). Rad51 replication fork recruitment is required for DNA damage tolerance. *The EMBO Journal*, *32*(9), 1307-1321. <https://doi.org/10.1038/emboj.2013.73>
- Grabarz, A., Guirouilh-Barbat, J., Barascu, A., Pennarun, G., Genet, D., Rass, E., Germann, S. M., Bertrand, P., Hickson, I. D., & Lopez, B. S. (2013). A role for BLM in double-strand break repair pathway choice: Prevention of CtIP/Mre11-mediated alternative nonhomologous end-joining. *Cell Reports*, *5*(1), 21-28. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2013.08.034>

- Graf, M., Bonetti, D., Lockhart, A., Serhal, K., Kellner, V., Maicher, A., Jolivet, P., Teixeira, M. T., & Luke, B. (2017). Telomere Length Determines TERRA and R-Loop Regulation through the Cell Cycle. *Cell*, *170*(1), 72-85.e14. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.06.006>
- Graham, T. G. W., Walter, J. C., & Loparo, J. J. (2016). Two-Stage Synapsis of DNA Ends during Non-Homologous End Joining. *Molecular cell*, *61*(6), 850-858. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.02.010>
- Granneman, S., Kudla, G., Petfalski, E., & Tollervey, D. (2009). Identification of protein binding sites on U3 snoRNA and pre-rRNA by UV cross-linking and high-throughput analysis of cDNAs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *106*(24), 9613-9618. <https://doi.org/10.1073/pnas.0901997106>
- Gravel, S., Chapman, J. R., Magill, C., & Jackson, S. P. (2008). DNA helicases Sgs1 and BLM promote DNA double-strand break resection. *Genes & Development*, *22*(20), 2767-2772. <https://doi.org/10.1101/gad.503108>
- Greenberg, R. A. (2018). Assembling a protective shield. *Nature Cell Biology*, *20*(8), 862-863. <https://doi.org/10.1038/s41556-018-0152-x>
- Griffiths, D. J., Liu, V. F., Nurse, P., & Wang, T. S. (2001). Role of fission yeast primase catalytic subunit in the replication checkpoint. *Molecular Biology of the Cell*, *12*(1), 115-128. <https://doi.org/10.1091/mbc.12.1.115>
- Gu, J., Lu, H., Tsai, A. G., Schwarz, K., & Lieber, M. R. (2007). Single-stranded DNA ligation and XLF-stimulated incompatible DNA end ligation by the XRCC4-DNA ligase IV complex: Influence of terminal DNA sequence. *Nucleic Acids Research*, *35*(17), 5755-5762. <https://doi.org/10.1093/nar/gkm579>
- Hamperl, S., Bocek, M. J., Saldivar, J. C., Swigut, T., & Cimprich, K. A. (2017). Transcription-Replication Conflict Orientation Modulates R-Loop Levels and Activates Distinct DNA Damage Responses. *Cell*, *170*(4), 774-786.e19. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.07.043>
- Hamperl, S., & Cimprich, K. A. (2016). Conflict Resolution in the Genome: How Transcription and Replication Make It Work. *Cell*, *167*(6), 1455-1467. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.09.053>
- Han, J., Lee, Y., Yeom, K.-H., Nam, J.-W., Heo, I., Rhee, J.-K., Sohn, S. Y., Cho, Y., Zhang, B.-T., & Kim, V. N. (2006). Molecular Basis for the Recognition of Primary microRNAs by the Drosha-DGCR8 Complex. *Cell*, *125*(5), 887-901. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.03.043>
- Hardy, J., Dai, D., Ait Saada, A., Teixeira-Silva, A., Dupoirion, L., Mojallali, F., Fréon, K., Ochsenbein, F., Hartmann, B., & Lambert, S. (2019). Histone deposition promotes recombination-dependent replication at arrested forks. *PLoS Genetics*, *15*(10), e1008441. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1008441>
- Hartono, S. R., Malapert, A., Legros, P., Bernard, P., Chédin, F., & Vanoosthuyse, V. (2018). The Affinity of the S9.6 Antibody for Double-Stranded RNAs Impacts the Accurate Mapping

- of R-Loops in Fission Yeast. *Journal of Molecular Biology*, 430(3), 272-284. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2017.12.016>
- Hashimoto, Y., Puddu, F., & Costanzo, V. (2012). RAD51- and MRE11-dependent reassembly of uncoupled CMG helicase complex at collapsed replication forks. *Nature Structural & Molecular Biology*, 19(1), 17-24. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2177>
- Hashimoto, Y., Ray Chaudhuri, A., Lopes, M., & Costanzo, V. (2010). Rad51 protects nascent DNA from Mre11-dependent degradation and promotes continuous DNA synthesis. *Nature Structural & Molecular Biology*, 17(11), 1305-1311. <https://doi.org/10.1038/nsmb.1927>
- He, Y. J., & Chowdhury, D. (2021). ASTE1 cutting to block DNA end resection. *Nature Cell Biology*, 23(8), 818-819. <https://doi.org/10.1038/s41556-021-00731-9>
- Helleday, T., Eshtad, S., & Nik-Zainal, S. (2014). Mechanisms underlying mutational signatures in human cancers. *Nature Reviews Genetics*, 15(9), 585-598. <https://doi.org/10.1038/nrg3729>
- Heller, R. C., Kang, S., Lam, W. M., Chen, S., Chan, C. S., & Bell, S. P. (2011). Eukaryotic Origin-Dependent DNA Replication In Vitro Reveals Sequential Action of DDK and S-CDK Kinases. *Cell*, 146(1), 80-91. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.06.012>
- Higgins, N. P., Kato, K., & Strauss, B. (1976). A model for replication repair in mammalian cells. *Journal of Molecular Biology*, 101(3), 417-425. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(76\)90156-x](https://doi.org/10.1016/0022-2836(76)90156-x)
- Higgs, M. R., Reynolds, J. J., Winczura, A., Blackford, A. N., Borel, V., Miller, E. S., Zlatanou, A., Nieminuszczy, J., Ryan, E. L., Davies, N. J., Stankovic, T., Boulton, S. J., Niedzwiedz, W., & Stewart, G. S. (2015). BOD1L Is Required to Suppress Deleterious Resection of Stressed Replication Forks. *Molecular Cell*, 59(3), 462-477. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.06.007>
- Ho, S. S. W., Zhang, W. Y. L., Tan, N. Y. J., Khatoor, M., Suter, M. A., Tripathi, S., Cheung, F. S. G., Lim, W. K., Tan, P. H., Ngeow, J., & Gasser, S. (2016). The DNA Structure-Specific Endonuclease MUS81 Mediates DNA Sensor STING-Dependent Host Rejection of Prostate Cancer Cells. *Immunity*, 44(5), 1177-1189. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2016.04.010>
- Hodroj, D., Recolin, B., Serhal, K., Martinez, S., Tsanov, N., Abou Merhi, R., & Maiorano, D. (2017). An ATR-dependent function for the Ddx19 RNA helicase in nuclear R-loop metabolism. *The EMBO Journal*, 36(9), 1182-1198. <https://doi.org/10.15252/embj.201695131>
- Hoeijmakers, J. H. J. (2001). Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature*, 411(6835), 366-374. <https://doi.org/10.1038/35077232>
- Hoffman, C. S., Wood, V., & Fantes, P. A. (2015). An Ancient Yeast for Young Geneticists: A Primer on the *Schizosaccharomyces pombe* Model System. *Genetics*, 201(2), 403-423. <https://doi.org/10.1534/genetics.115.181503>
- Holmes, J. B., Akman, G., Wood, S. R., Sakhuja, K., Cerritelli, S. M., Moss, C., Bowmaker, M. R., Jacobs, H. T., Crouch, R. J., & Holt, I. J. (2015). Primer retention owing to the absence of

- RNase H1 is catastrophic for mitochondrial DNA replication. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *112*(30), 9334-9339. <https://doi.org/10.1073/pnas.1503653112>
- Holt, I. J. (2019a). The mitochondrial R-loop. *Nucleic Acids Research*, *47*(11), 5480-5489. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz277>
- Holt, I. J. (2019b). The Jekyll and Hyde character of RNase H1 and its multiple roles in mitochondrial DNA metabolism. *DNA Repair*, *84*, 102630. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2019.06.001>
- Holt, I. J., & Reyes, A. (2012). Human mitochondrial DNA replication. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *4*(12), a012971. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a012971>
- Hu, J., Sun, L., Shen, F., Chen, Y., Hua, Y., Liu, Y., Zhang, M., Hu, Y., Wang, Q., Xu, W., Sun, F., Ji, J., Murray, J. M., Carr, A. M., & Kong, D. (2012). The intra-S phase checkpoint targets Dna2 to prevent stalled replication forks from reversing. *Cell*, *149*(6), 1221-1232. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.04.030>
- Hu, Y., Raynard, S., Sehorn, M. G., Lu, X., Bussen, W., Zheng, L., Stark, J. M., Barnes, E. L., Chi, P., Janscak, P., Jasin, M., Vogel, H., Sung, P., & Luo, G. (2007). RECQL5/Recql5 helicase regulates homologous recombination and suppresses tumor formation via disruption of Rad51 presynaptic filaments. *Genes & Development*, *21*(23), 3073-3084. <https://doi.org/10.1101/gad.1609107>
- Ingram, S. P., Warmenhoven, J. W., Henthorn, N. T., Smith, E. a. K., Chadwick, A. L., Burnet, N. G., Mackay, R. I., Kirkby, N. F., Kirkby, K. J., & Merchant, M. J. (2019). Mechanistic modelling supports entwined rather than exclusively competitive DNA double-strand break repair pathway. *Scientific Reports*, *9*(1), 6359. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-42901-8>
- Ira, G., Satory, D., & Haber, J. E. (2006). Conservative inheritance of newly synthesized DNA in double-strand break-induced gene conversion. *Molecular and Cellular Biology*, *26*(24), 9424-9429. <https://doi.org/10.1128/MCB.01654-06>
- Iraqi, I., Chekkal, Y., Jmari, N., Pietrobon, V., Fréon, K., Costes, A., & Lambert, S. A. E. (2012). Recovery of Arrested Replication Forks by Homologous Recombination Is Error-Prone. *PLoS Genetics*, *8*(10). <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002976>
- Ismail, I. H., Gagné, J.-P., Genois, M.-M., Strickfaden, H., McDonald, D., Xu, Z., Poirier, G. G., Masson, J.-Y., & Hendzel, M. J. (2015). The RNF138 E3 ligase displaces Ku to promote DNA end resection and regulate DNA repair pathway choice. *Nature Cell Biology*, *17*(11), 1446-1457. <https://doi.org/10.1038/ncb3259>
- Ivanov, E. L., Sugawara, N., Fishman-Lobell, J., & Haber, J. E. (1996). Genetic requirements for the single-strand annealing pathway of double-strand break repair in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, *142*(3), 693-704.
- Jain, S., Sugawara, N., Lydeard, J., Vaze, M., Tanguy Le Gac, N., & Haber, J. E. (2009). A recombination execution checkpoint regulates the choice of homologous recombination pathway during DNA double-strand break repair. *Genes & Development*, *23*(3), 291-303. <https://doi.org/10.1101/gad.1751209>

- Jalan, M., Oehler, J., Morrow, C. A., Osman, F., & Whitby, M. C. (2019). Factors affecting template switch recombination associated with restarted DNA replication. *ELife*, *8*, e41697. <https://doi.org/10.7554/eLife.41697>
- Jensen, K. L., & Russell, P. (2016). Ctp1-dependent clipping and resection of DNA double-strand breaks by Mre11 endonuclease complex are not genetically separable. *Nucleic Acids Research*, *44*(17), 8241-8249. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw557>
- Jeong, H.-S., Backlund, P. S., Chen, H.-C., Karavanov, A. A., & Crouch, R. J. (2004). RNase H2 of *Saccharomyces cerevisiae* is a complex of three proteins. *Nucleic Acids Research*, *32*(2), 407-414. <https://doi.org/10.1093/nar/gkh209>
- Jones, C. E., & Forsburg, S. L. (2021). Monitoring *Schizosaccharomyces pombe* genome stress by visualizing end-binding protein Ku. *Biology Open*, *10*(2), bio054346. <https://doi.org/10.1242/bio.054346>
- Joshi, R. R., Ali, S. I., & Ashley, A. K. (2019). DNA Ligase IV Prevents Replication Fork Stalling and Promotes Cellular Proliferation in Triple Negative Breast Cancer. *Journal of Nucleic Acids*, *2019*, 9170341. <https://doi.org/10.1155/2019/9170341>
- Kakarougkas, A., Ismail, A., Chambers, A. L., Riballo, E., Herbert, A. D., Künzel, J., Löbrich, M., Jeggo, P. A., & Downs, J. A. (2014). Requirement for PBAF in Transcriptional Repression and Repair at DNA Breaks in Actively Transcribed Regions of Chromatin. *Molecular Cell*, *55*(5), 723-732. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.06.028>
- Kang, M.-S., Ryu, E., Lee, S.-W., Park, J., Ha, N. Y., Ra, J. S., Kim, Y. J., Kim, J., Abdel-Rahman, M., Park, S. H., Lee, K., Kim, H., Kang, S., & Myung, K. (2019). Regulation of PCNA cycling on replicating DNA by RFC and RFC-like complexes. *Nature Communications*, *10*(1), 2420. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-10376-w>
- Kantake, N., Sugiyama, T., Kolodner, R. D., & Kowalczykowski, S. C. (2003). The recombination-deficient mutant RPA (rfa1-t11) is displaced slowly from single-stranded DNA by Rad51 protein. *The Journal of Biological Chemistry*, *278*(26), 23410-23417. <https://doi.org/10.1074/jbc.M302995200>
- Kao, H.-I., & Bambara, R. A. (2003). The protein components and mechanism of eukaryotic Okazaki fragment maturation. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, *38*(5), 433-452. <https://doi.org/10.1080/10409230390259382>
- Kearsey, S. E., & Cotterill, S. (2003). Enigmatic Variations: Divergent Modes of Regulating Eukaryotic DNA Replication. *Molecular Cell*, *12*(5), 1067-1075. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(03\)00441-6](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(03)00441-6)
- Kellner, V., & Luke, B. (2020). Molecular and physiological consequences of faulty eukaryotic ribonucleotide excision repair. *The EMBO Journal*, *39*(3), 1-16. <https://doi.org/10.15252/embj.2019102309>
- Kemiha, S., Poli, J., Lin, Y.-L., Lengronne, A., & Pasero, P. (2021). Toxic R-loops: Cause or consequence of replication stress? *DNA Repair*, *107*, 103199. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2021.103199>

- Keskin, H., Shen, Y., Huang, F., Patel, M., Yang, T., Ashley, K., Mazin, A. V., & Storici, F. (2014). Transcript-RNA-templated DNA recombination and repair. *Nature*, *515*(7527), 436-439. <https://doi.org/10.1038/nature13682>
- Keskin, H., & Storici, F. (2015). Defects in RNase H2 Stimulate DNA Break Repair by RNA Reverse Transcribed into cDNA. *MicroRNA (Sharjah, United Arab Emirates)*, *4*(2), 109-116. <https://doi.org/10.2174/2211536604666150820120129>
- Keszthelyi, A., Minchell, N. E., & Baxter, J. (2016). The Causes and Consequences of Topological Stress during DNA Replication. *Genes*, *7*(12), E134. <https://doi.org/10.3390/genes7120134>
- Kim, H. D., Choe, J., & Seo, Y. S. (1999). The sen1(+) gene of *Schizosaccharomyces pombe*, a homologue of budding yeast SEN1, encodes an RNA and DNA helicase. *Biochemistry*, *38*(44), 14697-14710. <https://doi.org/10.1021/bi991470c>
- Kim, S., Kang, N., Park, S. H., Wells, J., Hwang, T., Ryu, E., Kim, B., Hwang, S., Kim, S., Kang, S., Lee, S., Stirling, P., Myung, K., & Lee, K. (2020). ATAD5 restricts R-loop formation through PCNA unloading and RNA helicase maintenance at the replication fork. *Nucleic Acids Research*, *48*(13), 7218-7238. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa501>
- Kim, S. M., & Huberman, J. A. (2001). Regulation of replication timing in fission yeast. *The EMBO Journal*, *20*(21), 6115-6126. <https://doi.org/10.1093/emboj/20.21.6115>
- Klein, B., & Günther, C. (2021). Type I Interferon Induction in Cutaneous DNA Damage Syndromes. *Frontiers in Immunology*, *12*, 2917. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.715723>
- Knutsen, J. H. J., Rein, I. D., Rothe, C., Stokke, T., Grallert, B., & Boye, E. (2011). Cell-cycle analysis of fission yeast cells by flow cytometry. *PloS One*, *6*(2), e17175. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0017175>
- Kondo, T., Kobayashi, J., Saitoh, T., Maruyama, K., Ishii, K. J., Barber, G. N., Komatsu, K., Akira, S., & Kawai, T. (2013). DNA damage sensor MRE11 recognizes cytosolic double-stranded DNA and induces type I interferon by regulating STING trafficking. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *110*(8), 2969-2974. <https://doi.org/10.1073/pnas.1222694110>
- König, F., Schubert, T., & Längst, G. (2017). The monoclonal S9.6 antibody exhibits highly variable binding affinities towards different R-loop sequences. *PLOS ONE*, *12*(6), e0178875. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0178875>
- Kramarz, K., Schirmeisen, K., Boucherit, V., Ait Saada, A., Lovo, C., Palancade, B., Freudenreich, C., & Lambert, S. A. E. (2020). The nuclear pore primes recombination-dependent DNA synthesis at arrested forks by promoting SUMO removal. *Nature Communications*, *11*(1), 5643. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-19516-z>
- Krejci, L., Altmannova, V., Spirek, M., & Zhao, X. (2012). Homologous recombination and its regulation. *Nucleic Acids Research*, *40*(13), 5795-5818. <https://doi.org/10.1093/nar/gks270>

- Krokan, H. E., Standal, R., & Slupphaug, G. (1997). DNA glycosylases in the base excision repair of DNA. *The Biochemical Journal*, *325 (Pt 1)*, 1-16. <https://doi.org/10.1042/bj3250001>
- Kruhlak, M., Crouch, E. E., Orlov, M., Montano, C., Gorski, S. A., Nussenzweig, A., Misteli, T., Phair, R. D., & Casellas, R. (2007). The ATM repair pathway inhibits RNA polymerase I transcription in response to chromosome breaks. *Nature*, *447(7145)*, 730-734. <https://doi.org/10.1038/nature05842>
- Kruhlak, M. J., Celeste, A., Dellaire, G., Fernandez-Capetillo, O., Müller, W. G., McNally, J. G., Bazett-Jones, D. P., & Nussenzweig, A. (2006). Changes in chromatin structure and mobility in living cells at sites of DNA double-strand breaks. *Journal of Cell Biology*, *172(6)*, 823-834. <https://doi.org/10.1083/jcb.200510015>
- Kunkel, T. A., & Burgers, P. M. (2008). Dividing the workload at a eukaryotic replication fork. *Trends in Cell Biology*, *18(11)*, 521-527. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2008.08.005>
- Kunkel, T. A., & Erie, D. A. (2005). DNA mismatch repair. *Annual Review of Biochemistry*, *74*, 681-710. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.74.082803.133243>
- Kuzminov, A. (1999). Recombinational Repair of DNA Damage in *Escherichia coli* and Bacteriophage λ . *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, *63(4)*, 751-813. <https://doi.org/10.1128/MMBR.63.4.751-813.1999>
- Lalonde, M., Trauner, M., Werner, M., & Hamperl, S. (2021). Consequences and Resolution of Transcription-Replication Conflicts. *Life (Basel, Switzerland)*, *11(7)*, 637. <https://doi.org/10.3390/life11070637>
- Lamaa, A., Le Bras, M., Skuli, N., Britton, S., Frit, P., Calsou, P., Prats, H., Cammas, A., & Millevoi, S. (2016). A novel cytoprotective function for the DNA repair protein Ku in regulating p53 mRNA translation and function. *EMBO Reports*, *17(4)*, 508-518. <https://doi.org/10.15252/embr.201541181>
- Lambert, S., & Carr, A. M. (2013). Impediments to replication fork movement : Stabilisation, reactivation and genome instability. *Chromosoma*, *122(1-2)*, 33-45. <https://doi.org/10.1007/s00412-013-0398-9>
- Lambert, S., Mizuno, K., Blaisonneau, J., Martineau, S., Chanut, R., Fréon, K., Murray, J. M., Carr, A. M., & Baldacci, G. (2010). Homologous recombination restarts blocked replication forks at the expense of genome rearrangements by template exchange. *Molecular Cell*, *39(3)*, 346-359. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.07.015>
- Lambert, S., Watson, A., Sheedy, D. M., Martin, B., & Carr, A. M. (2005). Gross chromosomal rearrangements and elevated recombination at an inducible site-specific replication fork barrier. *Cell*, *121(5)*, 689-702. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.03.022>
- Landsverk, H. B., Sandquist, L. E., Bay, L. T. E., Steurer, B., Campsteijn, C., Landsverk, O. J. B., Martejn, J. A., Petermann, E., Trinkle-Mulcahy, L., & Syljuåsen, R. G. (2020). WDR82/PNUTS-PP1 Prevents Transcription-Replication Conflicts by Promoting RNA Polymerase II Degradation on Chromatin. *Cell Reports*, *33(9)*. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.108469>

- Langerak, P., Mejia-Ramirez, E., Limbo, O., & Russell, P. (2011). Release of Ku and MRN from DNA Ends by Mre11 Nuclease Activity and Ctp1 Is Required for Homologous Recombination Repair of Double-Strand Breaks. *PLOS Genetics*, *7*(9), e1002271. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002271>
- Larsen, E., Gran, C., Saether, B. E., Seeberg, E., & Klungland, A. (2003). Proliferation failure and gamma radiation sensitivity of Fen1 null mutant mice at the blastocyst stage. *Molecular and Cellular Biology*, *23*(15), 5346-5353. <https://doi.org/10.1128/MCB.23.15.5346-5353.2003>
- Lazzaro, F., Novarina, D., Amara, F., Watt, D. L., Stone, J. E., Costanzo, V., Burgers, P. M., Kunkel, T. A., Plevani, P., & Muzi-Falconi, M. (2012). RNase H and Postreplication Repair Protect Cells from Ribonucleotides Incorporated in DNA. *Molecular Cell*, *45*(1), 99-110. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2011.12.019>
- Lazzaro, F., Sapountzi, V., Granata, M., Pellicoli, A., Vaze, M., Haber, J. E., Plevani, P., Lydall, D., & Muzi-Falconi, M. (2008). Histone methyltransferase Dot1 and Rad9 inhibit single-stranded DNA accumulation at DSBs and uncapped telomeres. *The EMBO Journal*, *27*(10), 1502-1512. <https://doi.org/10.1038/emboj.2008.81>
- Lee, K., & Lee, S. E. (2007). *Saccharomyces cerevisiae* Sae2- and Tel1-dependent single-strand DNA formation at DNA break promotes microhomology-mediated end joining. *Genetics*, *176*(4), 2003-2014. <https://doi.org/10.1534/genetics.107.076539>
- Lee, K.-J., Saha, J., Sun, J., Fattah, K. R., Wang, S.-C., Jakob, B., Chi, L., Wang, S.-Y., Taucher-Scholz, G., Davis, A. J., & Chen, D. J. (2016). Phosphorylation of Ku dictates DNA double-strand break (DSB) repair pathway choice in S phase. *Nucleic Acids Research*, *44*(4), 1732-1745. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv1499>
- Lee, K.-Y., & Park, S. H. (2020). Eukaryotic clamp loaders and unloaders in the maintenance of genome stability. *Experimental & Molecular Medicine*, *52*(12), 1948-1958. <https://doi.org/10.1038/s12276-020-00533-3>
- Lee, Y., Jeon, K., Lee, J.-T., Kim, S., & Kim, V. N. (2002). MicroRNA maturation: Stepwise processing and subcellular localization. *The EMBO Journal*, *21*(17), 4663-4670. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdf476>
- Leland, B. A., Chen, A. C., Zhao, A. Y., Wharton, R. C., & King, M. C. (2018). Rev7 and 53BP1/Crb2 prevent RecQ helicase-dependent hyper-resection of DNA double-strand breaks. *eLife*, *7*, e33402. <https://doi.org/10.7554/eLife.33402>
- Lemaçon, D., Jackson, J., Quinet, A., Brickner, J. R., Li, S., Yazinski, S., You, Z., Ira, G., Zou, L., Mosammaparast, N., & Vindigni, A. (2017). MRE11 and EXO1 nucleases degrade reversed forks and elicit MUS81-dependent fork rescue in BRCA2-deficient cells. *Nature Communications*, *8*(1), 860. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-01180-5>
- Li, L., Germain, D. R., Poon, H.-Y., Hildebrandt, M. R., Monckton, E. A., McDonald, D., Hendzel, M. J., & Godbout, R. (2016). DEAD Box 1 Facilitates Removal of RNA and Homologous Recombination at DNA Double-Strand Breaks. *Molecular and Cellular Biology*, *36*(22), 2794-2810. <https://doi.org/10.1128/MCB.00415-16>

- Li, S., Wang, H., Jehi, S., Li, J., Liu, S., Wang, Z., Truong, L., Chiba, T., Wang, Z., & Wu, X. (2021). PIF1 helicase promotes break-induced replication in mammalian cells. *The EMBO Journal*, *40*(8), e104509. <https://doi.org/10.15252/embj.2020104509>
- Li, X., & Heyer, W.-D. (2008). Homologous recombination in DNA repair and DNA damage tolerance. *Cell Research*, *18*(1), 99-113. <https://doi.org/10.1038/cr.2008.1>
- Li, X., Stith, C. M., Burgers, P. M., & Heyer, W.-D. (2009). PCNA is required for initiation of recombination-associated DNA synthesis by DNA polymerase delta. *Molecular Cell*, *36*(4), 704-713. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2009.09.036>
- Li, Y., Wang, J., Zhou, G., Lajeunesse, M., Le, N., Stawicki, B. N., Corcino, Y. L., Berkner, K. L., & Runge, K. W. (2017). Nonhomologous End-Joining with Minimal Sequence Loss Is Promoted by the Mre11-Rad50-Nbs1-Ctp1 Complex in *Schizosaccharomyces pombe*. *Genetics*, *206*(1), 481-496. <https://doi.org/10.1534/genetics.117.200972>
- Liberi, G., Maffioletti, G., Lucca, C., Chiolo, I., Baryshnikova, A., Cotta-Ramusino, C., Lopes, M., Pellicoli, A., Haber, J. E., & Foiani, M. (2005). Rad51-dependent DNA structures accumulate at damaged replication forks in *sgs1* mutants defective in the yeast ortholog of BLM RecQ helicase. *Genes & Development*, *19*(3), 339-350. <https://doi.org/10.1101/gad.322605>
- Lim, Y. W., Sanz, L. A., Xu, X., Hartono, S. R., & Chédin, F. (2015). Genome-wide DNA hypomethylation and RNA:DNA hybrid accumulation in Aicardi-Goutières syndrome. *ELife*, *4*. <https://doi.org/10.7554/eLife.08007>
- Liu, B., Hu, J., Wang, J., & Kong, D. (2017). Direct visualization of RNA-DNA primer removal from okazaki fragments provides support for flap cleavage and exonucleolytic pathways in eukaryotic cells. *Journal of Biological Chemistry*, *292*(12), 4777-4788. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.758599>
- Liu, J., Doty, T., Gibson, B., & Heyer, W.-D. (2010). Human BRCA2 protein promotes RAD51 filament formation on RPA-covered single-stranded DNA. *Nature Structural & Molecular Biology*, *17*(10), 1260-1262. <https://doi.org/10.1038/nsmb.1904>
- Liu, L., Yan, Z., Osia, B. A., Twarowski, J., Sun, L., Kramara, J., Lee, R. S., Kumar, S., Elango, R., Li, H., Dang, W., Ira, G., & Malkova, A. (2021). Tracking break-induced replication shows that it stalls at roadblocks. *Nature*, *590*(7847), 655-659. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-03172-w>
- Liu, S., Hua, Y., Wang, J., Li, L., Yuan, J., Zhang, B., Wang, Z., Ji, J., & Kong, D. (2021). RNA polymerase III is required for the repair of DNA double-strand breaks by homologous recombination. *Cell*, *184*(5), 1314-1329.e10. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.01.048>
- Liu, W., Krishnamoorthy, A., Zhao, R., & Cortez, D. (2020). Two replication fork remodeling pathways generate nuclease substrates for distinct fork protection factors. *Science Advances*, *6*(46), eabc3598. <https://doi.org/10.1126/sciadv.abc3598>
- Lockhart, A., Pires, V. B., Bento, F., Kellner, V., Luke-Glaser, S., Yakoub, G., Ulrich, H. D., & Luke, B. (2019). RNase H1 and H2 Are Differentially Regulated to Process RNA-DNA Hybrids. *Cell Reports*, *29*(9), 2890-2900.e5. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.10.108>

- Lomonosov, M., Anand, S., Sangrithi, M., Davies, R., & Venkitaraman, A. R. (2003). Stabilization of stalled DNA replication forks by the BRCA2 breast cancer susceptibility protein. *Genes & Development*, *17*(24), 3017-3022. <https://doi.org/10.1101/gad.279003>
- Lopes, M., Foiani, M., & Sogo, J. M. (2006). Multiple Mechanisms Control Chromosome Integrity after Replication Fork Uncoupling and Restart at Irreparable UV Lesions. *Molecular Cell*, *21*(1), 15-27. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2005.11.015>
- Lu, G., Duan, J., Shu, S., Wang, X., Gao, L., Guo, J., & Zhang, Y. (2016). Ligase I and ligase III mediate the DNA double-strand break ligation in alternative end-joining. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *113*(5), 1256-1260. <https://doi.org/10.1073/pnas.1521597113>
- Lu, W.-T., Hawley, B. R., Skalka, G. L., Baldock, R. A., Smith, E. M., Bader, A. S., Malewicz, M., Watts, F. Z., Wilczynska, A., & Bushell, M. (2018). Drosha drives the formation of DNA:RNA hybrids around DNA break sites to facilitate DNA repair. *Nature Communications*, *9*(1), 532. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-02893-x>
- Lujan, S. A., Williams, J. S., Clausen, A. R., Clark, A. B., & Kunkel, T. A. (2013). Ribonucleotides are signals for mismatch repair of leading-strand replication errors. *Molecular Cell*, *50*(3), 437-443. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2013.03.017>
- MacKenzie, K. J., Carroll, P., Martin, C. A., Murina, O., Fluteau, A., Simpson, D. J., Olova, N., Sutcliffe, H., Rainger, J. K., Leitch, A., Osborn, R. T., Wheeler, A. P., Nowotny, M., Gilbert, N., Chandra, T., Reijns, M. A. M., & Jackson, A. P. (2017). CGAS surveillance of micronuclei links genome instability to innate immunity. *Nature*, *548*(7668), 461-465. <https://doi.org/10.1038/nature23449>
- Makharashvili, N., Tubbs, A. T., Yang, S.-H., Wang, H., Barton, O., Zhou, Y., Deshpande, R. A., Lee, J.-H., Lobrich, M., Sleckman, B. P., Wu, X., & Paull, T. T. (2014). Catalytic and noncatalytic roles of the CtIP endonuclease in double-strand break end resection. *Molecular Cell*, *54*(6), 1022-1033. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.04.011>
- Maloisel, L., Fabre, F., & Gangloff, S. (2008). DNA Polymerase δ Is Preferentially Recruited during Homologous Recombination To Promote Heteroduplex DNA Extension. *Molecular and Cellular Biology*, *28*(4), 1373-1382. <https://doi.org/10.1128/MCB.01651-07>
- Mankan, A. K., Schmidt, T., Chauhan, D., Goldeck, M., Höning, K., Gaidt, M., Kubarenko, A. V., Andreeva, L., Hopfner, K.-P., & Hornung, V. (2014). Cytosolic RNA:DNA hybrids activate the cGAS-STING axis. *The EMBO Journal*, *33*(24), 2937-2946. <https://doi.org/10.15252/embj.201488726>
- Manolis, K. G., Nimmo, E. R., Hartsuiker, E., Carr, A. M., Jeggo, P. A., & Allshire, R. C. (2001). Novel functional requirements for non-homologous DNA end joining in *Schizosaccharomyces pombe*. *The EMBO Journal*, *20*(1-2), 210-221. <https://doi.org/10.1093/emboj/20.1.210>
- Mansour, W. Y., Rhein, T., & Dahm-Daphi, J. (2010). The alternative end-joining pathway for repair of DNA double-strand breaks requires PARP1 but is not dependent upon microhomologies. *Nucleic Acids Research*, *38*(18), 6065-6077. <https://doi.org/10.1093/nar/gkq387>

- Manthei, K. A., & Keck, J. L. (2013). The BLM dissolvasome in DNA replication and repair. *Cellular and Molecular Life Sciences*, *70*(21), 4067-4084. <https://doi.org/10.1007/s00018-013-1325-1>
- Maric, M., Maculins, T., De Piccoli, G., & Labib, K. (2014). Cdc48 and a ubiquitin ligase drive disassembly of the CMG helicase at the end of DNA replication. *Science (New York, N.Y.)*, *346*(6208), 1253596. <https://doi.org/10.1126/science.1253596>
- Marnef, A., & Legube, G. (2020). M6A RNA modification as a new player in R-loop regulation. *Nature Genetics*, *52*(1), 27-28. <https://doi.org/10.1038/s41588-019-0563-z>
- Marteijn, J. A., Lans, H., Vermeulen, W., & Hoeijmakers, J. H. J. (2014). Understanding nucleotide excision repair and its roles in cancer and ageing. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *15*(7), 465-481. <https://doi.org/10.1038/nrm3822>
- Mayle, R., Campbell, I. M., Beck, C. R., Yu, Y., Wilson, M., Shaw, C. A., Bjergbaek, L., Lupski, J. R., & Ira, G. (2015). Mus81 and converging forks limit the mutagenicity of replication fork breakage. *Science (New York, N.Y.)*, *349*(6249), 742-747. <https://doi.org/10.1126/science.aaa8391>
- Mazina, O. M., Keskin, H., Hanamshet, K., Storici, F., & Mazin, A. V. (2017). Rad52 Inverse Strand Exchange Drives RNA-Templated DNA Double-Strand Break Repair. *Molecular Cell*, *67*(1), 19-29.e3. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.05.019>
- McDevitt, S., Rusanov, T., Kent, T., Chandramouly, G., & Pomerantz, R. T. (2018). How RNA transcripts coordinate DNA recombination and repair. *Nature Communications*, *9*(1), 1091. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-03483-7>
- McDonald, K. R., Guise, A. J., Pourbozorgi-Langroudi, P., Cristea, I. M., Zakian, V. A., Capra, J. A., & Sabouri, N. (2016). Pfh1 Is an Accessory Replicative Helicase that Interacts with the Replisome to Facilitate Fork Progression and Preserve Genome Integrity. *PLOS Genetics*, *12*(9), e1006238. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1006238>
- McElhinny, S. A. N., Watts, B. E., Kumar, D., Watt, D. L., Lundström, E.-B., Burgers, P. M. J., Johansson, E., Chabes, A., & Kunkel, T. A. (2010). Abundant ribonucleotide incorporation into DNA by yeast replicative polymerases. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *107*(11), 4949-4954. <https://doi.org/10.1073/pnas.0914857107>
- McIlwraith, M. J., McIlwraith, M. J., Vaisman, A., Liu, Y., Fanning, E., Woodgate, R., & West, S. C. (2005). Human DNA polymerase eta promotes DNA synthesis from strand invasion intermediates of homologous recombination. *Molecular Cell*, *20*(5), 783-792. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2005.10.001>
- McIlwraith, M. J., & West, S. C. (2008). DNA repair synthesis facilitates RAD52-mediated second-end capture during DSB repair. *Molecular Cell*, *29*(4), 510-516. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2007.11.037>
- Meroni, A., Nava, G. M., Bianco, E., Grasso, L., Galati, E., Bosio, M. C., Delmastro, D., Muzi-Falconi, M., & Lazzaro, F. (2019). RNase H activities counteract a toxic effect of Polymerase η in cells replicating with depleted dNTP pools. *Nucleic Acids Research*, *47*(9), 4612-4623. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz165>

- Michelini, F., Pitchiaya, S., Vitelli, V., Sharma, S., Gioia, U., Pessina, F., Cabrini, M., Wang, Y., Capozzo, I., Iannelli, F., Matti, V., Francia, S., Shivashankar, G. V., Walter, N. G., & Di Fagagna, F. D. A. (2017). Damage-induced lncRNAs control the DNA damage response through interaction with DDRNAs at individual double-strand breaks. *Nature Cell Biology*, *19*(12), 1400-1411. <https://doi.org/10.1038/ncb3643>
- Mijic, S., Zellweger, R., Chappidi, N., Berti, M., Jacobs, K., Mutreja, K., Ursich, S., Ray Chaudhuri, A., Nussenzweig, A., Janscak, P., & Lopes, M. (2017). Replication fork reversal triggers fork degradation in BRCA2-defective cells. *Nature Communications*, *8*(1), 859. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-01164-5>
- Miki, D., Zhu, P., Zhang, W., Mao, Y., Feng, Z., Huang, H., Zhang, H., Li, Y., Liu, R., Zhang, H., Qi, Y., & Zhu, J.-K. (2017). Efficient Generation of diRNAs Requires Components in the Posttranscriptional Gene Silencing Pathway. *Scientific Reports*, *7*(1), 301. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-00374-7>
- Mimitou, E. P., & Symington, L. S. (2008). Sae2, Exo1 and Sgs1 collaborate in DNA double-strand break processing. *Nature*, *455*(7214), 770-774. <https://doi.org/10.1038/nature07312>
- Mimitou, E. P., & Symington, L. S. (2010). Ku prevents Exo1 and Sgs1-dependent resection of DNA ends in the absence of a functional MRX complex or Sae2. *The EMBO Journal*, *29*(19), 3358-3369. <https://doi.org/10.1038/emboj.2010.193>
- Mimitou, E. P., & Symington, L. S. (2011). DNA end resection—Unraveling the tail. *DNA Repair*, *10*(3), 344-348. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2010.12.004>
- Miné-Hattab, J., & Rothstein, R. (2012). Increased chromosome mobility facilitates homology search during recombination. *Nature Cell Biology*, *14*(5), 510-517. <https://doi.org/10.1038/ncb2472>
- Mirkin, E. V., & Mirkin, S. M. (2007). Replication Fork Stalling at Natural Impediments. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, *71*(1), 13-35. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00030-06>
- Mirman, Z., Lottersberger, F., Takai, H., Kibe, T., Gong, Y., Takai, K., Bianchi, A., Zimmermann, M., Durocher, D., & de Lange, T. (2018). 53BP1-RIF1-shieldin counteracts DSB resection through CST- and Pol α -dependent fill-in. *Nature*, *560*(7716), 112-116. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0324-7>
- Mischo, H. E., Gómez-González, B., Grzechnik, P., Rondón, A. G., Wei, W., Steinmetz, L., Aguilera, A., & Proudfoot, N. J. (2011). Yeast Sen1 Helicase Protects the Genome from Transcription-Associated Instability. *Molecular Cell*, *41*(1), 21-32. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.12.007>
- Miyabe, I., Kunkel, T. A., & Carr, A. M. (2011). The major roles of DNA polymerases epsilon and delta at the eukaryotic replication fork are evolutionarily conserved. *PLoS Genetics*, *7*(12). <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002407>
- Miyabe, I., Mizuno, K., Keszthelyi, A., Daigaku, Y., Skouteri, M., Mohebi, S., Kunkel, T. A., Murray, J. M., & Carr, A. M. (2015). Polymerase δ replicates both strands after homologous

- recombination–dependent fork restart. *Nature Structural & Molecular Biology*, 22(11), 932-938. <https://doi.org/10.1038/nsmb.3100>
- Miyoshi, T., Kanoh, J., & Ishikawa, F. (2009). Fission yeast Ku protein is required for recovery from DNA replication stress. *Genes to Cells: Devoted to Molecular & Cellular Mechanisms*, 14(9), 1091-1103. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2443.2009.01337.x>
- Mizuno, K., Miyabe, I., Schalbetter, S. A., Carr, A. M., & Murray, J. M. (2013). Recombination-restarted replication makes inverted chromosome fusions at inverted repeats. *Nature*, 493(7431), 246-249. <https://doi.org/10.1038/nature11676>
- Mohammad, J. B., Wallgren, M., & Sabouri, N. (2018). The Pif1 signature motif of Pfh1 is necessary for both protein displacement and helicase unwinding activities, but is dispensable for strand-annealing activity. *Nucleic Acids Research*, 46(16), 8516-8531. <https://doi.org/10.1093/nar/gky654>
- Moore, J. K., & Haber, J. E. (1996). Capture of retrotransposon DNA at the sites of chromosomal double-strand breaks. *Nature*, 383(6601), 644-646. <https://doi.org/10.1038/383644a0>
- Moravec, M., Wischnewski, H., Bah, A., Hu, Y., Liu, N., Lafranchi, L., King, M. C., & Azzalin, C. M. (2016). TERRA promotes telomerase-mediated telomere elongation in *Schizosaccharomyces pombe*. *EMBO Reports*, 17(7), 999-1012. <https://doi.org/10.15252/embr.201541708>
- Moriel-Carretero, M., & Aguilera, A. (2010). Replication fork breakage and re-start: New insights into Rad3/XPD-associated deficiencies. *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)*, 9(15), 2958-2962.
- Moyer, S. E., Lewis, P. W., & Botchan, M. R. (2006). Isolation of the Cdc45/Mcm2-7/GINS (CMG) complex, a candidate for the eukaryotic DNA replication fork helicase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(27), 10236-10241. <https://doi.org/10.1073/pnas.0602400103>
- Mukherjee, C., Tripathi, V., Manolika, E. M., Heijink, A. M., Ricci, G., Merzouk, S., de Boer, H. R., Demmers, J., van Vugt, M. A. T. M., & Ray Chaudhuri, A. (2019). RIF1 promotes replication fork protection and efficient restart to maintain genome stability. *Nature Communications*, 10(1), 3287. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-11246-1>
- Myler, L. R., Gallardo, I. F., Soniat, M. M., Deshpande, R. A., Gonzalez, X. B., Kim, Y., Paull, T. T., & Finkelstein, I. J. (2017). Single-Molecule Imaging Reveals How Mre11-Rad50-Nbs1 Initiates DNA Break Repair. *Molecular Cell*, 67(5), 891-898.e4. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.08.002>
- Myler, L. R., Gallardo, I. F., Zhou, Y., Gong, F., Yang, S.-H., Wold, M. S., Miller, K. M., Paull, T. T., & Finkelstein, I. J. (2016). Single-molecule imaging reveals the mechanism of Exo1 regulation by single-stranded DNA binding proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(9), E1170-E1179. <https://doi.org/10.1073/pnas.1516674113>
- Naiman, K., Campillo-Funollet, E., Watson, A. T., Budden, A., Miyabe, I., & Carr, A. M. (2021). Replication dynamics of recombination-dependent replication forks. *Nature Communications*, 12(1), 923. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-21198-0>

- Nakad, R., & Schumacher, B. (2016). DNA Damage Response and Immune Defense : Links and Mechanisms. *Frontiers in Genetics, 7*, 147. <https://doi.org/10.3389/fgene.2016.00147>
- Nava, G. M., Grasso, L., Sertic, S., Pelliccioli, A., Muzi Falconi, M., & Lazzaro, F. (2020). One, No One, and One Hundred Thousand: The Many Forms of Ribonucleotides in DNA. *International Journal of Molecular Sciences, 21*(5), E1706. <https://doi.org/10.3390/ijms21051706>
- Neelsen, K. J., & Lopes, M. (2015). Replication fork reversal in eukaryotes : From dead end to dynamic response. *Nature Reviews Molecular Cell Biology, 16*(4), 207-220. <https://doi.org/10.1038/nrm3935>
- Neelsen, K. J., Zanini, I. M. Y., Herrador, R., & Lopes, M. (2013). Oncogenes induce genotoxic stress by mitotic processing of unusual replication intermediates. *The Journal of Cell Biology, 200*(6), 699-708. <https://doi.org/10.1083/jcb.201212058>
- Nguyen, M. O., Jalan, M., Morrow, C. A., Osman, F., & Whitby, M. C. (2015). Recombination occurs within minutes of replication blockage by RTS1 producing restarted forks that are prone to collapse. *ELife, 4*, e04539. <https://doi.org/10.7554/eLife.04539>
- Nick McElhinny, S. A., Gordenin, D. A., Stith, C. M., Burgers, P. M. J., & Kunkel, T. A. (2008). Division of labor at the eukaryotic replication fork. *Molecular Cell, 30*(2), 137-144. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2008.02.022>
- Nicolette, M. L., Lee, K., Guo, Z., Rani, M., Chow, J. M., Lee, S. E., & Paull, T. T. (2010). Mre11-Rad50-Xrs2 and Sae2 promote 5' strand resection of DNA double-strand breaks. *Nature Structural & Molecular Biology, 17*(12), 1478-1485. <https://doi.org/10.1038/nsmb.1957>
- Nimonkar, A. V., Genschel, J., Kinoshita, E., Polaczek, P., Campbell, J. L., Wyman, C., Modrich, P., & Kowalczykowski, S. C. (2011). BLM–DNA2–RPA–MRN and EXO1–BLM–RPA–MRN constitute two DNA end resection machineries for human DNA break repair. *Genes & Development, 25*(4), 350-362. <https://doi.org/10.1101/gad.2003811>
- Nishitani, H., Lygerou, Z., Nishimoto, T., & Nurse, P. (2000). The Cdt1 protein is required to license DNA for replication in fission yeast. *Nature, 404*(6778), 625-628. <https://doi.org/10.1038/35007110>
- Noordermeer, S. M., Adam, S., Setiaputra, D., Barazas, M., Pettitt, S. J., Ling, A. K., Olivieri, M., Álvarez-Quilón, A., Moatti, N., Zimmermann, M., Annunziato, S., Krastev, D. B., Song, F., Brandsma, I., Frankum, J., Brough, R., Sherker, A., Landry, S., Szilard, R. K., ... Durocher, D. (2018). The shieldin complex mediates 53BP1-dependent DNA repair. *Nature, 560*(7716), 117-121. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0340-7>
- Novac, O., Matheos, D., Araujo, F. D., Price, G. B., & Zannis-Hadjopoulos, M. (2001). In Vivo Association of Ku with Mammalian Origins of DNA Replication. *Molecular Biology of the Cell, 12*(11), 3386-3401. <https://doi.org/10.1091/mbc.12.11.3386>
- O'Donnell, M., Langston, L., & Stillman, B. (2013). Principles and concepts of DNA replication in bacteria, archaea, and eukarya. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology, 5*(7), a010108. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a010108>

- Ohle, C., Tesorero, R., Schermann, G., Dobrev, N., Sinning, I., & Fischer, T. (2016). Transient RNA-DNA Hybrids Are Required for Efficient Double-Strand Break Repair. *Cell*, *167*(4), 1001-1013.e7. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.10.001>
- Okazaki, R., Okazaki, T., Sakabe, K., Sugimoto, K., & Sugino, A. (1968). Mechanism of DNA chain growth. I. Possible discontinuity and unusual secondary structure of newly synthesized chains. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *59*(2), 598-605.
- Ono, R., Ishii, M., Fujihara, Y., Kitazawa, M., Usami, T., Kaneko-Ishino, T., Kanno, J., Ikawa, M., & Ishino, F. (2015). Double strand break repair by capture of retrotransposon sequences and reverse-transcribed spliced mRNA sequences in mouse zygotes. *Scientific Reports*, *5*(1), 12281. <https://doi.org/10.1038/srep12281>
- Onozawa, M., Zhang, Z., Kim, Y. J., Goldberg, L., Varga, T., Bergsagel, P. L., Kuehl, W. M., & Aplan, P. D. (2014). Repair of DNA double-strand breaks by templated nucleotide sequence insertions derived from distant regions of the genome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *111*(21), 7729-7734. <https://doi.org/10.1073/pnas.1321889111>
- Osman, F., Dixon, J., Barr, A. R., & Whitby, M. C. (2005). The F-Box DNA helicase Fbh1 prevents Rhp51-dependent recombination without mediator proteins. *Molecular and Cellular Biology*, *25*(18), 8084-8096. <https://doi.org/10.1128/MCB.25.18.8084-8096.2005>
- Palou, G., Palou, R., Zeng, F., Vashisht, A. A., Wohlschlegel, J. A., & Quintana, D. G. (2015). Three Different Pathways Prevent Chromosome Segregation in the Presence of DNA Damage or Replication Stress in Budding Yeast. *PLoS Genetics*, *11*(9), e1005468. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005468>
- Pankotai, T., Bonhomme, C., Chen, D., & Soutoglou, E. (2012). DNAPKcs-dependent arrest of RNA polymerase II transcription in the presence of DNA breaks. *Nature Structural & Molecular Biology*, *19*(3), 276-282. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2224>
- Park, S. H., Kang, N., Song, E., Wie, M., Lee, E. A., Hwang, S., Lee, D., Ra, J. S., Park, I. B., Park, J., Kang, S., Park, J. H., Hohng, S., Lee, K., & Myung, K. (2019). ATAD5 promotes replication restart by regulating RAD51 and PCNA in response to replication stress. *Nature Communications*, *10*(1), 5718. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-13667-4>
- Parnandi, N., Rendo, V., Cui, G., Botuyan, M. V., Remisova, M., Nguyen, H., Drané, P., Beroukhim, R., Altmeyer, M., Mer, G., & Chowdhury, D. (2021). TIRR inhibits the 53BP1-p53 complex to alter cell-fate programs. *Molecular Cell*, *81*(12), 2583-2595.e6. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2021.03.039>
- Pasero, P., & Vindigni, A. (2017). Nucleases Acting at Stalled Forks: How to Reboot the Replication Program with a Few Shortcuts. *Annual Review of Genetics*, *51*, 477-499. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-120116-024745>
- Paull, T. T. (2021). Reconsidering pathway choice: A sequential model of mammalian DNA double-strand break pathway decisions. *Current Opinion in Genetics & Development*, *71*, 55-62. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2021.06.011>

- Paull, T. T., Rogakou, E. P., Yamazaki, V., Kirchgessner, C. U., Gellert, M., & Bonner, W. M. (2000). A critical role for histone H2AX in recruitment of repair factors to nuclear foci after DNA damage. *Current Biology*, *10*(15), 886-895. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(00\)00610-2](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(00)00610-2)
- Pérez-Calero, C., Bayona-Feliu, A., Xue, X., Barroso, S. I., Muñoz, S., González-Basallote, V. M., Sung, P., & Aguilera, A. (2020). UAP56/DDX39B is a major cotranscriptional RNA-DNA helicase that unwinds harmful R loops genome-wide. *Genes & Development*, *34*(13-14), 898-912. <https://doi.org/10.1101/gad.336024.119>
- Pessina, F., Giavazzi, F., Yin, Y., Gioia, U., Vitelli, V., Galbiati, A., Barozzi, S., Garre, M., Oldani, A., Flaus, A., Cerbino, R., Parazzoli, D., Rothenberg, E., & d'Adda di Fagagna, F. (2019). Functional transcription promoters at DNA double-strand breaks mediate RNA-driven phase separation of damage-response factors. *Nature Cell Biology*, *21*(10), 1286-1299. <https://doi.org/10.1038/s41556-019-0392-4>
- Petermann, E., Orta, M. L., Issaeva, N., Schultz, N., & Helleday, T. (2010). Hydroxyurea-stalled replication forks become progressively inactivated and require two different RAD51-mediated pathways for restart and repair. *Molecular Cell*, *37*(4), 492-502. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.01.021>
- Petukhova, G., Sung, P., & Klein, H. (2000). Promotion of Rad51-dependent D-loop formation by yeast recombination factor Rdh54/Tid1. *Genes & Development*, *14*(17), 2206-2215.
- Petukhova, G., Van Komen, S., Vergano, S., Klein, H., & Sung, P. (1999). Yeast Rad54 promotes Rad51-dependent homologous DNA pairing via ATP hydrolysis-driven change in DNA double helix conformation. *The Journal of Biological Chemistry*, *274*(41), 29453-29462. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.41.29453>
- Phillips, D. D., Garboczi, D. N., Singh, K., Hu, Z., Leppla, S. H., & Leysath, C. E. (2013). The sub-nanomolar binding of DNA-RNA hybrids by the single-chain Fv fragment of antibody S9.6. *Journal of Molecular Recognition: JMR*, *26*(8), 376-381. <https://doi.org/10.1002/jmr.2284>
- Pizzi, S., Sertic, S., Orcesi, S., Cereda, C., Bianchi, M., Jackson, A. P., Lazzaro, F., Plevani, P., & Muzi-Falconi, M. (2015). Reduction of hRNase H2 activity in Aicardi-Goutières syndrome cells leads to replication stress and genome instability. *Human Molecular Genetics*, *24*(3), 649-658. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddu485>
- Pohl, T. J., & Zakian, V. A. (2019). Pif1 family DNA helicases: A helpmate to RNase H? *DNA repair*, *84*, 102633. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2019.06.004>
- Poli, J., Gerhold, C.-B., Tosi, A., Hustedt, N., Seeber, A., Sack, R., Herzog, F., Pasero, P., Shimada, K., Hopfner, K.-P., & Gasser, S. M. (2016). Mec1, INO80, and the PAF1 complex cooperate to limit transcription replication conflicts through RNAPII removal during replication stress. *Genes & Development*, *30*(3), 337-354. <https://doi.org/10.1101/gad.273813.115>
- Polotnianka, R. M., Li, J., & Lustig, A. J. (1998). The yeast Ku heterodimer is essential for protection of the telomere against nucleolytic and recombinational activities. *Current Biology*, *8*(14), 831-835. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(98\)70325-2](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(98)70325-2)

- Pomerantz, R. T., & O'Donnell, M. (2008). The replisome uses mRNA as a primer after colliding with RNA polymerase. *Nature*, *456*(7223), 762-766. <https://doi.org/10.1038/nature07527>
- Potenski, C. J., Epshtein, A., Bianco, C., & Klein, H. L. (2019). Genome Instability Consequences of RNase H2 Aicardi-Goutières Syndrome Alleles. *DNA repair*, *84*, 102614. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2019.04.002>
- Prado, F., & Aguilera, A. (2005). Impairment of replication fork progression mediates RNA polII transcription-associated recombination. *The EMBO Journal*, *24*(6), 1267-1276. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600602>
- Promonet, A., Padioleau, I., Liu, Y., Sanz, L., Biernacka, A., Schmitz, A.-L., Skrzypczak, M., Sarrazin, A., Mettling, C., Rowicka, M., Ginalski, K., Chedin, F., Chen, C.-L., Lin, Y.-L., & Pasero, P. (2020). Topoisomerase 1 prevents replication stress at R-loop-enriched transcription termination sites. *Nature Communications*, *11*(1), 3940. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-17858-2>
- Puget, N., Miller, K. M., & Legube, G. (2019). Non-canonical DNA/RNA structures during Transcription-Coupled Double-Strand Break Repair :Roadblocks or Bona fide repair intermediates? *DNA Repair*, *81*, 102661. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2019.102661>
- Raghuraman, M. K. (2001). Replication Dynamics of the Yeast Genome. *Science*, *294*(5540), 115-121. <https://doi.org/10.1126/science.294.5540.115>
- Rass, E., Grabarz, A., Plo, I., Gautier, J., Bertrand, P., & Lopez, B. S. (2009). Role of Mre11 in chromosomal nonhomologous end joining in mammalian cells. *Nature Structural & Molecular Biology*, *16*(8), 819-824. <https://doi.org/10.1038/nsmb.1641>
- Rawal, C. C., Zardoni, L., Di Terlizzi, M., Galati, E., Brambati, A., Lazzaro, F., Liberi, G., & Pellicoli, A. (2020). Senataxin Ortholog Sen1 Limits DNA:RNA Hybrid Accumulation at DNA Double-Strand Breaks to Control End Resection and Repair Fidelity. *Cell Reports*, *31*(5), 107603. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.107603>
- Ray Chaudhuri, A., Hashimoto, Y., Herrador, R., Neelsen, K. J., Fachinetti, D., Bermejo, R., Cocito, A., Costanzo, V., & Lopes, M. (2012). Topoisomerase I poisoning results in PARP-mediated replication fork reversal. *Nature Structural & Molecular Biology*, *19*(4), 417-423. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2258>
- Reginato, G., Cannavo, E., & Cejka, P. (2017). Physiological protein blocks direct the Mre11-Rad50-Xrs2 and Sae2 nuclease complex to initiate DNA end resection. *Genes & Development*, *31*(23-24), 2325-2330. <https://doi.org/10.1101/gad.308254.117>
- Reginato, G., & Cejka, P. (2020). The MRE11 complex : A versatile toolkit for the repair of broken DNA. *DNA Repair*, *91-92*, 102869. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2020.102869>
- Reijns, M. A. M., & Jackson, A. P. (2014). Ribonuclease H2 in health and disease. *Biochemical Society Transactions*, *42*(4), 717-725. <https://doi.org/10.1042/BST20140079>
- Reijns, M. A. M., Rabe, B., Rigby, R. E., Mill, P., Astell, K. R., Lettice, L. A., Boyle, S., Leitch, A., Keighren, M., Kilanowski, F., Devenney, P. S., Sexton, D., Grimes, G., Holt, I. J., Hill, R. E., Taylor, M. S., Lawson, K. A., Dorin, J. R., & Jackson, A. P. (2012). Enzymatic Removal of

- Ribonucleotides from DNA Is Essential for Mammalian Genome Integrity and Development. *Cell*, 149(5), 1008-1022. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.04.011>
- Reis, C. C., Batista, S., & Ferreira, M. G. (2012). The fission yeast MRN complex tethers dysfunctional telomeres for NHEJ repair. *The EMBO Journal*, 31(24), 4576-4586. <https://doi.org/10.1038/emboj.2012.313>
- Renkawitz, J., Lademann, C. A., Kalocsay, M., & Jentsch, S. (2013). Monitoring Homology Search during DNA Double-Strand Break Repair In Vivo. *Molecular Cell*, 50(2), 261-272. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2013.02.020>
- Riballo, E., Kühne, M., Rief, N., Doherty, A., Smith, G. C. M., Recio, M.-J., Reis, C., Dahm, K., Fricke, A., Krempler, A., Parker, A. R., Jackson, S. P., Gennery, A., Jeggo, P. A., & Löbrich, M. (2004). A Pathway of Double-Strand Break Rejoining Dependent upon ATM, Artemis, and Proteins Locating to γ -H2AX Foci. *Molecular Cell*, 16(5), 715-724. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2004.10.029>
- Rice, G. I., Del Toro Duany, Y., Jenkinson, E. M., Forte, G. M., Anderson, B. H., Ariaudo, G., Bader-Meunier, B., Baildam, E. M., Battini, R., Beresford, M. W., Casarano, M., Chouchane, M., Cimaz, R., Collins, A. E., Cordeiro, N. J., Dale, R. C., Davidson, J. E., De Waele, L., Desguerre, I., ... Crow, Y. J. (2014). Gain-of-function mutations in IFIH1 cause a spectrum of human disease phenotypes associated with upregulated type I interferon signaling. *Nature Genetics*, 46(5), 503-509. <https://doi.org/10.1038/ng.2933>
- Richard, P., Feng, S., & Manley, J. L. (2013). A SUMO-dependent interaction between Senataxin and the exosome, disrupted in the neurodegenerative disease AOA2, targets the exosome to sites of transcription-induced DNA damage. *Genes & Development*, 27(20), 2227-2232. <https://doi.org/10.1101/gad.224923.113>
- Rohman, M. S., Koga, Y., Takano, K., Chon, H., Crouch, R. J., & Kanaya, S. (2008). Effect of the disease-causing mutations identified in human RNase H2 on the activities and stabilities of yeast RNase H2 and archaeal RNase HII. *The FEBS journal*, 275(19), 4836-4849. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2008.06622.x>
- Rossiello, F., Aguado, J., Sepe, S., Iannelli, F., Nguyen, Q., Pitchiaya, S., Carninci, P., & d'Adda di Fagagna, F. (2017). DNA damage response inhibition at dysfunctional telomeres by modulation of telomeric DNA damage response RNAs. *Nature Communications*, 8(1), 13980. <https://doi.org/10.1038/ncomms13980>
- Roth, S., Rottach, A., Lotz-Havla, A. S., Laux, V., Muschwackh, A., Gersting, S. W., Muntau, A. C., Hopfner, K.-P., Jin, L., Vanness, K., Petrini, J. H. J., Drexler, I., Leonhardt, H., & Ruland, J. (2014). Rad50-CARD9 interactions link cytosolic DNA sensing to IL-1 β production. *Nature Immunology*, 15(6), 538-545. <https://doi.org/10.1038/ni.2888>
- Sabatinos, S. A., & Forsburg, S. L. (2010). Chapter 32—Molecular Genetics of *Schizosaccharomyces pombe*. In *Methods in Enzymology* (Vol. 470, p. 759-795). Academic Press. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(10\)70032-X](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(10)70032-X)

- Sabatinos, S. A., & Forsburg, S. L. (2015). Measuring DNA content by flow cytometry in fission yeast. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, *1300*, 79-97. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2596-4_5
- Saini, N., Ramakrishnan, S., Elango, R., Ayyar, S., Zhang, Y., Deem, A., Ira, G., Haber, J. E., Lobachev, K. S., & Malkova, A. (2013). Migrating bubble during break-induced replication drives conservative DNA synthesis. *Nature*, *502*(7471), 389-392. <https://doi.org/10.1038/nature12584>
- Saintigny, Y., Delacôte, F., Varès, G., Petitot, F., Lambert, S., Averbek, D., & Lopez, B. S. (2001). Characterization of homologous recombination induced by replication inhibition in mammalian cells. *The EMBO Journal*, *20*(14), 3861-3870. <https://doi.org/10.1093/emboj/20.14.3861>
- San Martin-Alonso, M., Soler-Oliva, M. E., García-Rubio, M., García-Muse, T., & Aguilera, A. (2021). Harmful R-loops are prevented via different cell cycle-specific mechanisms. *Nature Communications*, *12*(1), 4451. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-24737-x>
- Sancar, A., Lindsey-Boltz, L. A., Unsal-Kaçmaz, K., & Linn, S. (2004). Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints. *Annual Review of Biochemistry*, *73*, 39-85. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.73.011303.073723>
- Sánchez, A., & Russell, P. (2015). Ku stabilizes replication forks in the absence of Brc1. *PLoS One*, *10*(5), e0126598. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0126598>
- Schaarschmidt, D., Ladenburger, E.-M., Keller, C., & Knippers, R. (2002). Human Mcm proteins at a replication origin during the G1 to S phase transition. *Nucleic Acids Research*, *30*(19), 4176-4185. <https://doi.org/10.1093/nar/gkf532>
- Schlacher, K., Christ, N., Siaud, N., Egashira, A., Wu, H., & Jasin, M. (2011). Double-strand break repair-independent role for BRCA2 in blocking stalled replication fork degradation by MRE11. *Cell*, *145*(4), 529-542. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.03.041>
- Schlacher, K., Wu, H., & Jasin, M. (2012). A distinct replication fork protection pathway connects Fanconi anemia tumor suppressors to RAD51-BRCA1/2. *Cancer Cell*, *22*(1), 106-116. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2012.05.015>
- Schwab, R. A., Nieminuszczy, J., Shah, F., Langton, J., Lopez Martinez, D., Liang, C.-C., Cohn, M. A., Gibbons, R. J., Deans, A. J., & Niedzwiedz, W. (2015). The Fanconi Anemia Pathway Maintains Genome Stability by Coordinating Replication and Transcription. *Molecular Cell*, *60*(3), 351-361. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.09.012>
- Segurado, M., de Luis, A., & Antequera, F. (2003). Genome-wide distribution of DNA replication origins at A+T-rich islands in *Schizosaccharomyces pombe*. *EMBO Reports*, *4*(11), 1048-1053. <https://doi.org/10.1038/sj.embor.embor7400008>
- Sessa, G., Gómez-González, B., Silva, S., Pérez-Calero, C., Beaurepere, R., Barroso, S., Martineau, S., Martin, C., Ehlén, Å., Martínez, J. S., Lombard, B., Loew, D., Vagner, S., Aguilera, A., & Carreira, A. (2021). BRCA2 promotes DNA-RNA hybrid resolution by DDX5 helicase at DNA breaks to facilitate their repair. *The EMBO Journal*, *40*(7), e106018. <https://doi.org/10.15252/emj.2020106018>

- Setiaputra, D., & Durocher, D. (2019). Shieldin—The protector of DNA ends. *EMBO Reports*, *20*(5), e47560. <https://doi.org/10.15252/embr.201847560>
- Shakibai, N., Kumar, V., & Eisenberg, S. (1996). The Ku-like protein from *Saccharomyces cerevisiae* is required in vitro for the assembly of a stable multiprotein complex at a eukaryotic origin of replication. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *93*(21), 11569-11574. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.21.11569>
- Shanbhag, N. M., Rafalska-Metcalf, I. U., Balane-Bolivar, C., Janicki, S. M., & Greenberg, R. A. (2010). ATM-dependent chromatin changes silence transcription in cis to DNA double-strand breaks. *Cell*, *141*(6), 970-981. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.04.038>
- Shao, X., Joergensen, A. M., Howlett, N. G., Lisby, M., & Oestergaard, V. H. (2020). A distinct role for recombination repair factors in an early cellular response to transcription–replication conflicts. *Nucleic Acids Research*, *48*(10), 5467-5484. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa268>
- Sharma, A. B., Erasmus, H., Pinto, L., Caron, M.-C., Gopaul, D., Peterlini, T., Neumann, K., Nazarov, P. V., Fritah, S., Klink, B., Herold-Mende, C. C., Niclou, S. P., Pasero, P., Calsou, P., Masson, J.-Y., Britton, S., & Van Dyck, E. (2021). XAB2 promotes Ku eviction from single-ended DNA double-strand breaks independently of the ATM kinase. *Nucleic Acids Research*, *49*(17), 9906-9925. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab785>
- Sharma, S., Anand, R., Zhang, X., Francia, S., Michelini, F., Galbiati, A., Williams, H., Ronato, D. A., Masson, J.-Y., Rothenberg, E., Cejka, P., & d'Adda di Fagagna, F. (2021). MRE11-RAD50-NBS1 Complex Is Sufficient to Promote Transcription by RNA Polymerase II at Double-Strand Breaks by Melting DNA Ends. *Cell Reports*, *34*(1), 108565. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.108565>
- Shibata, A., Jeggo, P., & Löbrich, M. (2018). The pendulum of the Ku-Ku clock. *DNA Repair*, *71*, 164-171. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2018.08.020>
- Shibata, A., Moiani, D., Arvai, A. S., Perry, J., Harding, S. M., Genois, M.-M., Maity, R., van Rossum-Fikkert, S., Kertokallio, A., Romoli, F., Ismail, A., Ismalaj, E., Petricci, E., Neale, M. J., Bristow, R. G., Masson, J.-Y., Wyman, C., Jeggo, P. A., & Tainer, J. A. (2014). DNA double-strand break repair pathway choice is directed by distinct MRE11 nuclease activities. *Molecular cell*, *53*(1), 7-18. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2013.11.003>
- Shim, E. Y., Chung, W.-H., Nicolette, M. L., Zhang, Y., Davis, M., Zhu, Z., Paull, T. T., Ira, G., & Lee, S. E. (2010). *Saccharomyces cerevisiae* Mre11/Rad50/Xrs2 and Ku proteins regulate association of Exo1 and Dna2 with DNA breaks. *The EMBO Journal*, *29*(19), 3370-3380. <https://doi.org/10.1038/emboj.2010.219>
- Shim, E. Y., Ma, J.-L., Oum, J.-H., Yanez, Y., & Lee, S. E. (2005). The yeast chromatin remodeler RSC complex facilitates end joining repair of DNA double-strand breaks. *Molecular and Cellular Biology*, *25*(10), 3934-3944. <https://doi.org/10.1128/MCB.25.10.3934-3944.2005>

- Shin, J.-H., & Kelman, Z. (2006). The Replicative Helicases of Bacteria, Archaea, and Eukarya Can Unwind RNA-DNA Hybrid Substrates *. *Journal of Biological Chemistry*, *281*(37), 26914-26921. <https://doi.org/10.1074/jbc.M605518200>
- Shinohara, A., & Ogawa, T. (1998). Stimulation by Rad52 of yeast Rad51-mediated recombination. *Nature*, *391*(6665), 404-407. <https://doi.org/10.1038/34943>
- Shiromoto, Y., Sakurai, M., Minakuchi, M., Ariyoshi, K., & Nishikura, K. (2021). ADAR1 RNA editing enzyme regulates R-loop formation and genome stability at telomeres in cancer cells. *Nature Communications*, *12*(1), 1654. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-21921-x>
- Simon, M.-N., Churikov, D., & Géli, V. (2016). Replication stress as a source of telomere recombination during replicative senescence in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Research*, *16*(7). <https://doi.org/10.1093/femsyr/fow085>
- Simoneau, A., Robellet, X., Ladouceur, A.-M., & D'Amours, D. (2014). Cdk1-dependent regulation of the Mre11 complex couples DNA repair pathways to cell cycle progression. *Cell Cycle*, *13*(7), 1078-1090. <https://doi.org/10.4161/cc.27946>
- Singh, B., Bisht, K. K., Upadhyay, U., Kushwaha, A. C., Nanda, J. S., Srivastava, S., Saini, J. K., Klar, A. J. S., & Singh, J. (2019). Role of Cdc23/Mcm10 in generating the ribonucleotide imprint at the mat1 locus in fission yeast. *Nucleic Acids Research*, *47*(7), 3422-3433. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz092>
- Sinha, M., & Peterson, C. L. (2009). Chromatin dynamics during repair of chromosomal DNA double-strand breaks. *Epigenomics*, *1*(2), 371-385. <https://doi.org/10.2217/epi.09.22>
- Skourti-Stathaki, K., Proudfoot, N. J., & Gromak, N. (2011). Human Senataxin Resolves RNA/DNA Hybrids Formed at Transcriptional Pause Sites to Promote Xrn2-Dependent Termination. *Molecular Cell*, *42*(6), 794-805. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2011.04.026>
- Sneeden, J. L., Grossi, S. M., Tappin, I., Hurwitz, J., & Heyer, W.-D. (2013). Reconstitution of recombination-associated DNA synthesis with human proteins. *Nucleic Acids Research*, *41*(9), 4913-4925. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt192>
- Sogo, J. M., Lopes, M., & Foiani, M. (2002). Fork reversal and ssDNA accumulation at stalled replication forks owing to checkpoint defects. *Science (New York, N.Y.)*, *297*(5581), 599-602. <https://doi.org/10.1126/science.1074023>
- Solinger, J. A., Kiianitsa, K., & Heyer, W.-D. (2002). Rad54, a Swi2/Snf2-like Recombinational Repair Protein, Disassembles Rad51:dsDNA Filaments. *Molecular Cell*, *10*(5), 1175-1188. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(02\)00743-8](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(02)00743-8)
- Sollier, J., Stork, C. T., García-Rubio, M. L., Paulsen, R. D., Aguilera, A., & Cimprich, K. A. (2014). Transcription-coupled nucleotide excision repair factors promote R-loop-induced genome instability. *Molecular cell*, *56*(6), 777-785. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.10.020>
- Sommers, J. A., Rawtani, N., Gupta, R., Bugreev, D. V., Mazin, A. V., Cantor, S. B., & Brosh, R. M. (2009). FANCDJ Uses Its Motor ATPase to Destabilize Protein-DNA Complexes, Unwind

- Triplexes, and Inhibit RAD51 Strand Exchange. *The Journal of Biological Chemistry*, *284*(12), 7505-7517. <https://doi.org/10.1074/jbc.M809019200>
- Soniat, M. M., Myler, L. R., Kuo, H.-C., Paull, T. T., & Finkelstein, I. J. (2019). RPA Phosphorylation Inhibits DNA Resection. *Molecular Cell*, *75*(1), 145-153.e5. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2019.05.005>
- Sotiriou, S. K., Kamileri, I., Lugli, N., Evangelou, K., Da-Ré, C., Huber, F., Padayachy, L., Tardy, S., Nicati, N. L., Barriot, S., Ochs, F., Lukas, C., Lukas, J., Gorgoulis, V. G., Scapozza, L., & Halazonetis, T. D. (2016). Mammalian RAD52 Functions in Break-Induced Replication Repair of Collapsed DNA Replication Forks. *Molecular Cell*, *64*(6), 1127-1134. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.10.038>
- Sparks, J. L., & Burgers, P. M. (2015). Error-free and mutagenic processing of topoisomerase 1-provoked damage at genomic ribonucleotides. *The EMBO Journal*, *34*(9), 1259-1269. <https://doi.org/10.15252/emj.201490868>
- Sparks, J. L., Chon, H., Cerritelli, S. M., Kunkel, T. A., Johansson, E., Crouch, R. J., & Burgers, P. M. (2012). RNase H2-Initiated Ribonucleotide Excision Repair. *Molecular Cell*, *47*(6), 980-986. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2012.06.035>
- Stith, C. M., Sterling, J., Resnick, M. A., Gordenin, D. A., & Burgers, P. M. (2008). Flexibility of Eukaryotic Okazaki Fragment Maturation through Regulated Strand Displacement Synthesis *. *Journal of Biological Chemistry*, *283*(49), 34129-34140. <https://doi.org/10.1074/jbc.M806668200>
- Sung, P. (1997a). Yeast Rad55 and Rad57 proteins form a heterodimer that functions with replication protein A to promote DNA strand exchange by Rad51 recombinase. *Genes & Development*, *11*(9), 1111-1121. <https://doi.org/10.1101/gad.11.9.1111>
- Sung, P. (1997b). Function of yeast Rad52 protein as a mediator between replication protein A and the Rad51 recombinase. *The Journal of Biological Chemistry*, *272*(45), 28194-28197. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.45.28194>
- Sung, P., Krejci, L., Komen, S. V., & Sehorn, M. G. (2003). Rad51 Recombinase and Recombination Mediators *. *Journal of Biological Chemistry*, *278*(44), 42729-42732. <https://doi.org/10.1074/jbc.R300027200>
- Šviković, S., Crisp, A., Tan-Wong, S. M., Guilliam, T. A., Doherty, A. J., Proudfoot, N. J., Guilbaud, G., & Sale, J. E. (2019). R-loop formation during S phase is restricted by PrimPol-mediated repriming. *The EMBO Journal*, *38*(3). <https://doi.org/10.15252/emj.201899793>
- Teixeira-Silva, A., Ait Saada, A., Hardy, J., Iraqui, I., Nocente, M. C., Fréon, K., & Lambert, S. A. E. (2017). The end-joining factor Ku acts in the end-resection of double strand break-free arrested replication forks. *Nature Communications*, *8*(1), 1982. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-02144-5>
- Thangavel, S., Berti, M., Levikova, M., Pinto, C., Gomathinayagam, S., Vujanovic, M., Zellweger, R., Moore, H., Lee, E. H., Hendrickson, E. A., Cejka, P., Stewart, S., Lopes, M., & Vindigni, A. (2015). DNA2 drives processing and restart of reversed replication forks in human

- cells. *The Journal of Cell Biology*, 208(5), 545-562. <https://doi.org/10.1083/jcb.201406100>
- Ting, N. S. Y., Yu, Y., Pohorelic, B., Lees-Miller, S. P., & Beattie, T. L. (2005). Human Ku70/80 interacts directly with hTR, the RNA component of human telomerase. *Nucleic Acids Research*, 33(7), 2090-2098. <https://doi.org/10.1093/nar/gki342>
- Toledo, L. I., Altmeyer, M., Rask, M.-B., Lukas, C., Larsen, D. H., Povlsen, L. K., Bekker-Jensen, S., Mailand, N., Bartek, J., & Lukas, J. (2013). ATR Prohibits Replication Catastrophe by Preventing Global Exhaustion of RPA. *Cell*, 155(5), 1088-1103. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.10.043>
- Tran, P. L. T., Pohl, T. J., Chen, C.-F., Chan, A., Pott, S., & Zakian, V. A. (2017). PIF1 family DNA helicases suppress R-loop mediated genome instability at tRNA genes. *Nature Communications*, 8(1), 15025. <https://doi.org/10.1038/ncomms15025>
- Trujillo, K. M., Yuan, S.-S. F., Lee, E. Y.-H. P., & Sung, P. (1998). Nuclease Activities in a Complex of Human Recombination and DNA Repair Factors Rad50, Mre11, and p95 *. *Journal of Biological Chemistry*, 273(34), 21447-21450. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.34.21447>
- Tsang, E., Miyabe, I., Iraqui, I., Zheng, J., Lambert, S. A. E., & Carr, A. M. (2014). The extent of error-prone replication restart by homologous recombination is controlled by Exo1 and checkpoint proteins. *Journal of Cell Science*, 127(Pt 13), 2983-2994. <https://doi.org/10.1242/jcs.152678>
- Tsukuda, T., Fleming, A. B., Nickoloff, J. A., & Osley, M. A. (2005). Chromatin remodelling at a DNA double-strand break site in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature*, 438(7066), 379-383. <https://doi.org/10.1038/nature04148>
- Udayakumar, D., Bladen, C. L., Hudson, F. Z., & Dynan, W. S. (2003). Distinct Pathways of Nonhomologous End Joining That Are Differentially Regulated by DNA-dependent Protein Kinase-mediated Phosphorylation *. *Journal of Biological Chemistry*, 278(43), 41631-41635. <https://doi.org/10.1074/jbc.M306470200>
- Unk, I., Hajdú, I., Fátýol, K., Szakál, B., Blastyák, A., Bermudez, V., Hurwitz, J., Prakash, L., Prakash, S., & Haracska, L. (2006). Human SHPRH is a ubiquitin ligase for Mms2-Ubc13-dependent polyubiquitylation of proliferating cell nuclear antigen. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(48), 18107-18112. <https://doi.org/10.1073/pnas.0608595103>
- Uziel, T., Lerenthal, Y., Moyal, L., Andegeko, Y., Mittelman, L., & Shiloh, Y. (2003). Requirement of the MRN complex for ATM activation by DNA damage. *The EMBO Journal*, 22(20), 5612-5621. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdg541>
- Veaute, X., Jeusset, J., Soustelle, C., Kowalczykowski, S. C., Le Cam, E., & Fabre, F. (2003). The Srs2 helicase prevents recombination by disrupting Rad51 nucleoprotein filaments. *Nature*, 423(6937), 309-312. <https://doi.org/10.1038/nature01585>
- Vengrova, S., & Dalgaard, J. Z. (2006). The wild-type *Schizosaccharomyces pombe* mat1 imprint consists of two ribonucleotides. *EMBO Reports*, 7(1), 59-65. <https://doi.org/10.1038/sj.embor.7400576>

- Vitor, A. C., Sridhara, S. C., Sabino, J. C., Afonso, A. I., Grosso, A. R., Martin, R. M., & Almeida, S. F. de. (2019). Single-molecule imaging of transcription at damaged chromatin. *Science Advances*, *5*(1), eaau1249. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aau1249>
- Wang, D., Zhou, Z., Wu, E., Ouyang, C., Wei, G., Wang, Y., He, D., Cui, Y., Zhang, D., Chen, X., Reed, S. H., Luo, J., & Chen, R. (2020). LRIK interacts with the Ku70-Ku80 heterodimer enhancing the efficiency of NHEJ repair. *Cell Death and Differentiation*, *27*(12), 3337-3353. <https://doi.org/10.1038/s41418-020-0581-5>
- Wang, H., Perrault, A. R., Takeda, Y., Qin, W., Wang, H., & Iliakis, G. (2003). Biochemical evidence for Ku-independent backup pathways of NHEJ. *Nucleic Acids Research*, *31*(18), 5377-5388. <https://doi.org/10.1093/nar/gkg728>
- Wang, H., Shi, L. Z., Wong, C. C. L., Han, X., Hwang, P. Y.-H., Truong, L. N., Zhu, Q., Shao, Z., Chen, D. J., Berns, M. W., Iii, J. R. Y., Chen, L., & Wu, X. (2013). The Interaction of CtIP and Nbs1 Connects CDK and ATM to Regulate HR-Mediated Double-Strand Break Repair. *PLoS Genetics*, *9*(2), e1003277. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003277>
- Wang, I. X., Grunseich, C., Fox, J., Burdick, J., Zhu, Z., Ravazian, N., Hafner, M., & Cheung, V. G. (2018). Human proteins that interact with RNA/DNA hybrids. *Genome Research*, *28*(9), 1405-1414. <https://doi.org/10.1101/gr.237362.118>
- Wang, J., Aroumougame, A., Loblrich, M., Li, Y., Chen, D., Chen, J., & Gong, Z. (2014). PTIP associates with Artemis to dictate DNA repair pathway choice. *Genes & Development*, *28*(24), 2693-2698. <https://doi.org/10.1101/gad.252478.114>
- Wang, M., Wu, W., Wu, W., Rosidi, B., Zhang, L., Wang, H., & Iliakis, G. (2006). PARP-1 and Ku compete for repair of DNA double strand breaks by distinct NHEJ pathways. *Nucleic Acids Research*, *34*(21), 6170-6182. <https://doi.org/10.1093/nar/gkl840>
- Wang, Q., & Goldstein, M. (2016). Small RNAs Recruit Chromatin-Modifying Enzymes MMSET and Tip60 to Reconfigure Damaged DNA upon Double-Strand Break and Facilitate Repair. *Cancer Research*, *76*(7), 1904-1915. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-15-2334>
- Wang, W., Daley, J. M., Kwon, Y., Xue, X., Krasner, D. S., Miller, A. S., Nguyen, K. A., Williamson, E. A., Shim, E. Y., Lee, S. E., Hromas, R., & Sung, P. (2018). A DNA nick at Ku-blocked double-strand break ends serves as an entry site for exonuclease 1 (Exo1) or Sgs1-Dna2 in long-range DNA end resection. *The Journal of Biological Chemistry*, *293*(44), 17061-17069. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.004769>
- Wang, Y., Fu, Z., Li, X., Liang, Y., Pei, S., Hao, S., Zhu, Q., Yu, T., Pei, Y., Yuan, J., Ye, J., Fu, J., Xu, J., Hong, J., Yang, R., Hou, H., Huang, X., Peng, C., Zheng, M., & Xiao, Y. (2021). Cytoplasmic DNA sensing by KU complex in aged CD4+ T cell potentiates T cell activation and aging-related autoimmune inflammation. *Immunity*, *54*(4), 632-647.e9. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2021.02.003>
- Ward, I. M., & Chen, J. (2001). Histone H2AX Is Phosphorylated in an ATR-dependent Manner in Response to Replicational Stress *. *Journal of Biological Chemistry*, *276*(51), 47759-47762. <https://doi.org/10.1074/jbc.C100569200>

- Ward, J. D., Muzzini, D. M., Petalcorin, M. I. R., Martinez-Perez, E., Martin, J. S., Plevani, P., Cassata, G., Marini, F., & Boulton, S. J. (2010). Overlapping Mechanisms Promote Postsynaptic RAD-51 Filament Disassembly during Meiotic Double-Strand Break Repair. *Molecular Cell*, *37*(2), 259-272. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2009.12.026>
- Waters, L. S., Minesinger, B. K., Wiltrot, M. E., D'Souza, S., Woodruff, R. V., & Walker, G. C. (2009). Eukaryotic Translesion Polymerases and Their Roles and Regulation in DNA Damage Tolerance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, *73*(1), 134-154. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00034-08>
- Wei, L., Nakajima, S., Böhm, S., Bernstein, K. A., Shen, Z., Tsang, M., Levine, A. S., & Lan, L. (2015). DNA damage during the G0/G1 phase triggers RNA-templated, Cockayne syndrome B-dependent homologous recombination. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *112*(27), E3495-3504. <https://doi.org/10.1073/pnas.1507105112>
- Wei, W., Ba, Z., Gao, M., Wu, Y., Ma, Y., Amiard, S., White, C. I., Rendtlew Danielsen, J. M., Yang, Y.-G., & Qi, Y. (2012). A role for small RNAs in DNA double-strand break repair. *Cell*, *149*(1), 101-112. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.03.002>
- Weinert, T., Kaochar, S., Jones, H., Paek, A., & Clark, A. (2009). The replication fork's five degrees of freedom, their failure and genome rearrangements. *Current Opinion in Cell Biology*, *21*(6), 778-784. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2009.10.004>
- Weller, G. R., Kysela, B., Roy, R., Tonkin, L. M., Scanlan, E., Della, M., Devine, S. K., Day, J. P., Wilkinson, A., d'Adda di Fagagna, F., Devine, K. M., Bowater, R. P., Jeggo, P. A., Jackson, S. P., & Doherty, A. J. (2002). Identification of a DNA nonhomologous end-joining complex in bacteria. *Science (New York, N.Y.)*, *297*(5587), 1686-1689. <https://doi.org/10.1126/science.1074584>
- Williams, J. S., Lujan, S. A., & Kunkel, T. A. (2016). Processing ribonucleotides incorporated during eukaryotic DNA replication. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *17*(6), 350-363. <https://doi.org/10.1038/nrm.2016.37>
- Williams, R. S., Dodson, G. E., Limbo, O., Yamada, Y., Williams, J. S., Guenther, G., Classen, S., Glover, J. N. M., Iwasaki, H., Russell, P., & Tainer, J. A. (2009). Nbs1 Flexibly Tethers Ctp1 and Mre11-Rad50 to Coordinate DNA Double-Strand Break Processing and Repair. *Cell*, *139*(1), 87-99. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.07.033>
- Wilson, T. E., Topper, L. M., & Palmbo, P. L. (2003). Non-homologous end-joining : Bacteria join the chromosome breakdance. *Trends in Biochemical Sciences*, *28*(2), 62-66. [https://doi.org/10.1016/S0968-0004\(03\)00005-7](https://doi.org/10.1016/S0968-0004(03)00005-7)
- Wolf, C., Rapp, A., Berndt, N., Staroske, W., Schuster, M., Dobrick-Mattheuer, M., Kretschmer, S., König, N., Kurth, T., Wieczorek, D., Kast, K., Cardoso, M. C., Günther, C., & Lee-Kirsch, M. A. (2016). RPA and Rad51 constitute a cell intrinsic mechanism to protect the cytosol from self DNA. *Nature Communications*, *7*(1), 11752. <https://doi.org/10.1038/ncomms11752>

- Wolner, B., & Peterson, C. L. (2005). ATP-dependent and ATP-independent Roles for the Rad54 Chromatin Remodeling Enzyme during Recombinational Repair of a DNA Double Strand Break *. *Journal of Biological Chemistry*, *280*(11), 10855-10860. <https://doi.org/10.1074/jbc.M414388200>
- Wood, V., Gwilliam, R., Rajandream, M.-A., Lyne, M., Lyne, R., Stewart, A., Sgouros, J., Peat, N., Hayles, J., Baker, S., Basham, D., Bowman, S., Brooks, K., Brown, D., Brown, S., Chillingworth, T., Churcher, C., Collins, M., Connor, R., ... Cerrutti, L. (2002). The genome sequence of *Schizosaccharomyces pombe*. *Nature*, *415*(6874), 871-880. <https://doi.org/10.1038/nature724>
- Wu, J., & Yan, N. (2021). A « KU » new sensor for cytosolic DNA in T cells. *Immunity*, *54*(4), 603-605. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2021.03.017>
- Wyatt, D. W., Feng, W., Conlin, M. P., Yousefzadeh, M. J., Roberts, S. A., Mieczkowski, P., Wood, R. D., Gupta, G. P., & Ramsden, D. A. (2016). Essential Roles for Polymerase θ -Mediated End Joining in the Repair of Chromosome Breaks. *Molecular Cell*, *63*(4), 662-673. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.06.020>
- Wyatt, H. D. M., & West, S. C. (2014). Holliday Junction Resolvases. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *6*(9), a023192. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a023192>
- Xiao, W., Lin, S. L., Broomfield, S., Chow, B. L., & Wei, Y. F. (1998). The products of the yeast MMS2 and two human homologs (hMMS2 and CROC-1) define a structurally and functionally conserved Ubc-like protein family. *Nucleic Acids Research*, *26*(17), 3908-3914. <https://doi.org/10.1093/nar/26.17.3908>
- Xie, A., Kwok, A., & Scully, R. (2009). Role of mammalian Mre11 in classical and alternative non-homologous end joining. *Nature structural & molecular biology*, *16*(8), 814-818. <https://doi.org/10.1038/nsmb.1640>
- Xu, W., Aparicio, J. G., Aparicio, O. M., & Tavaré, S. (2006). Genome-wide mapping of ORC and Mcm2p binding sites on tiling arrays and identification of essential ARS consensus sequences in *S. cerevisiae*. *BMC Genomics*, *7*, 276. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-7-276>
- Yang, H., Ren, S., Yu, S., Pan, H., Li, T., Ge, S., Zhang, J., & Xia, N. (2020). Methods Favoring Homology-Directed Repair Choice in Response to CRISPR/Cas9 Induced-Double Strand Breaks. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(18), 6461. <https://doi.org/10.3390/ijms21186461>
- Yang, H., Zhou, C., Dhar, A., & Pavletich, N. P. (2020). Mechanism of strand exchange from RecA-DNA synaptic and D-loop structures. *Nature*, *586*(7831), 801-806. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2820-9>
- Yang, S.-H., Zhou, R., Campbell, J., Chen, J., Ha, T., & Paull, T. T. (2013). The SOSS1 single-stranded DNA binding complex promotes DNA end resection in concert with Exo1. *The EMBO Journal*, *32*(1), 126-139. <https://doi.org/10.1038/emboj.2012.314>

- Yardimci, H., Loveland, A. B., Habuchi, S., Oijen, A. M. van, & Walter, J. C. (2010). Uncoupling of Sister Replisomes during Eukaryotic DNA Replication. *Molecular Cell*, *40*(5), 834-840. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.11.027>
- Yasuhara, T., Kato, R., Hagiwara, Y., Shiotani, B., Yamauchi, M., Nakada, S., Shibata, A., & Miyagawa, K. (2018). 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>
- Zellweger, R., Dalcher, D., Mutreja, K., Berti, M., Schmid, J. A., Herrador, R., Vindigni, A., & Lopes, M. (2015). Rad51-mediated replication fork reversal is a global response to genotoxic treatments in human cells. *The Journal of Cell Biology*, *208*(5), 563-579. <https://doi.org/10.1083/jcb.201406099>
- Zeman, M. K., & Cimprich, K. A. (2014). Causes and consequences of replication stress. *Nature Cell Biology*, *16*(1), 2-9. <https://doi.org/10.1038/ncb2897>
- Zhang, X., Brann, T. W., Zhou, M., Yang, J., Oguariri, R. M., Lidie, K. B., Imamichi, H., Huang, D.-W., Lempicki, R. A., Baseler, M. W., Veenstra, T. D., Young, H. A., Lane, H. C., & Imamichi, T. (2011). Cutting Edge: Ku70 Is a Novel Cytosolic DNA Sensor That Induces Type III Rather Than Type I IFN. *The Journal of Immunology*, *186*(8), 4541-4545. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1003389>
- Zhang, X., & Paull, T. T. (2005). The Mre11/Rad50/Xrs2 complex and non-homologous end-joining of incompatible ends in *S. cerevisiae*. *DNA Repair*, *4*(11), 1281-1294. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2005.06.011>
- Zhang, Y., He, Q., Hu, Z., Feng, Y., Fan, L., Tang, Z., Yuan, J., Shan, W., Li, C., Hu, X., Tanyi, J. L., Fan, Y., Huang, Q., Montone, K., Dang, C. V., & Zhang, L. (2016). Long noncoding RNA LINP1 regulates repair of DNA double-strand breaks in triple-negative breast cancer. *Nature Structural & Molecular Biology*, *23*(6), 522-530. <https://doi.org/10.1038/nsmb.3211>
- Zhao, B., Rothenberg, E., Ramsden, D. A., & Lieber, M. R. (2020). The molecular basis and disease relevance of non-homologous DNA end joining. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *21*(12), 765-781. <https://doi.org/10.1038/s41580-020-00297-8>
- Zhao, B., Watanabe, G., Morten, M. J., Reid, D. A., Rothenberg, E., & Lieber, M. R. (2019). The essential elements for the noncovalent association of two DNA ends during NHEJ synapsis. *Nature Communications*, *10*(1), 3588. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-11507-z>
- Zhao, F., Kim, W., Gao, H., Liu, C., Zhang, Y., Chen, Y., Deng, M., Zhou, Q., Huang, J., Hu, Q., Chen, S.-H., Nowsheen, S., Kloeber, J. A., Qin, B., Yin, P., Tu, X., Guo, G., Qin, S., Zhang, C., ... Yuan, J. (2021). ASTE1 promotes shieldin-complex-mediated DNA repair by attenuating end resection. *Nature Cell Biology*, *23*(8), 894-904. <https://doi.org/10.1038/s41556-021-00723-9>

- Zhao, F., Kim, W., Kloeber, J. A., & Lou, Z. (2020). DNA end resection and its role in DNA replication and DSB repair choice in mammalian cells. *Experimental & Molecular Medicine*, *52*(10), 1705-1714. <https://doi.org/10.1038/s12276-020-00519-1>
- Zhao, H., Zhu, M., Limbo, O., & Russell, P. (2018). RNase H eliminates R-loops that disrupt DNA replication but is nonessential for efficient DSB repair. *EMBO Reports*, *19*(5), e45335. <https://doi.org/10.15252/embr.201745335>
- Zheng, L., Dai, H., Zhou, M., Li, M., Singh, P., Qiu, J., Tsark, W., Huang, Q., Kernstine, K., Zhang, X., Lin, D., & Shen, B. (2007). Fen1 mutations result in autoimmunity, chronic inflammation and cancers. *Nature Medicine*, *13*(7), 812-819. <https://doi.org/10.1038/nm1599>
- Zheng, L., Meng, Y., Campbell, J. L., & Shen, B. (2020). Multiple roles of DNA2 nuclease/helicase in DNA metabolism, genome stability and human diseases. *Nucleic Acids Research*, *48*(1), 16-35. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz1101>
- Zheng, L., & Shen, B. (2011). Okazaki fragment maturation : Nucleases take centre stage. *Journal of Molecular Cell Biology*, *3*(1), 23-30. <https://doi.org/10.1093/jmcb/mjq048>
- Zhou, Z.-X., Lujan, S. A., Burkholder, A. B., Garbacz, M. A., & Kunkel, T. A. (2019). Roles for DNA polymerase δ in initiating and terminating leading strand DNA replication. *Nature Communications*, *10*(1), 3992. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-11995-z>
- Zhu, Z., Chung, W.-H., Shim, E. Y., Lee, S. E., & Ira, G. (2008). Sgs1 helicase and two nucleases Dna2 and Exo1 resect DNA double-strand break ends. *Cell*, *134*(6), 981-994. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.08.037>
- Zimmer, A. D., & Koshland, D. (2016). Differential roles of the RNases H in preventing chromosome instability. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *113*(43), 12220-12225. <https://doi.org/10.1073/pnas.1613448113>
- Zimmermann, M., Murina, O., Reijns, M. A. M., Agathangelou, A., Challis, R., Tarnauskaitė, Ž., Muir, M., Fluteau, A., Aregger, M., McEwan, A., Yuan, W., Clarke, M., Lambros, M. B., Paneesha, S., Moss, P., Chandrashekhar, M., Angers, S., Moffat, J., Brunton, V. G., ... Durocher, D. (2018). CRISPR screens identify genomic ribonucleotides as a source of PARP-trapping lesions. *Nature*, *559*(7713), 285-289. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0291-z>
- Ziv, Y., Bielopolski, D., Galanty, Y., Lukas, C., Taya, Y., Schultz, D. C., Lukas, J., Bekker-Jensen, S., Bartek, J., & Shiloh, Y. (2006). Chromatin relaxation in response to DNA double-strand breaks is modulated by a novel ATM- and KAP-1 dependent pathway. *Nature Cell Biology*, *8*(8), 870-876. <https://doi.org/10.1038/ncb1446>
- Zong, D., Oberdoerffer, P., Batista, P. J., & Nussenzweig, A. (2020). RNA : A double-edged sword in genome maintenance. *Nature Reviews. Genetics*, *21*(11), 651-670. <https://doi.org/10.1038/s41576-020-0263-7>
- Zou, L., & Elledge, S. J. (2003). Sensing DNA damage through ATRIP recognition of RPA-ssDNA complexes. *Science (New York, N.Y.)*, *300*(5625), 1542-1548. <https://doi.org/10.1126/science.1083430>

Title : RNA:DNA hybrids biology in the processing of dysfunctional replication forks by homologous recombination

Keywords : Replication stress, RNA:DNA hybrids, Homologous recombination, NHEJ, Okazaki fragment

Abstract : Maintaining genome stability is essential to ensure the high-fidelity transmission of genetic information. Genome instability results in increased mutation rate and chromosomal aberrations, followed by their missegregation during mitosis. Such abnormalities, in turn, may lead to many human disorders and are a well-recognized hallmark of most cancer cells. A major cause of instability is the alteration of DNA replication dynamics, also known as replicative stress. Indeed, the fulfillment of DNA replication is constantly threatened by replication fork barriers leading to the slowdown or the arrest of replication forks. One of the major structures likely to impair fork progression are R-loops, co-transcriptionally forming RNA:DNA hybrids. Interestingly, aside the arguments considering R-loops as threats for genome integrity, they are involved in regulating gene expression. Also, RNA:DNA hybrids form at DNA double-strand break sites, where they modulate positively, as negatively, the repair machineries. Their controlled degradation is a necessary step for homologous recombination-mediated repair. My thesis project aimed to decipher whether RNA:DNA hybrids associated with replication stress could be formed as a consequence of the recombination-dependent replication restart process of arrested forks. To do so, I exploited a site-specific replication fork barrier (RTS1-RFB) developed by the team in fission yeast. Well-controlled and conditional RFB had been integrated into the *S. pombe* genome to induce

at a site-specific locus, a single dysfunctional replication fork, independently of transcription activity. I identified a novel RNA:DNA hybrid-related mechanism to overcome the NHEJ factor Ku-mediated barrier to nascent strand degradation. RNase H activities promote nascent strand degradation and replication restart with a prevailing role of RNase H2's ability to process RNA:DNA hybrids to engage physiological and pathological fork-resection. RNase H2 acts in a parallel pathway to MRN-Ctp1 to sustain cell resistance to replication stress, in a Ku-dependent manner. Mechanistically, RNase H2 allows bypassing the Ku-mediated barrier to initiate the short-range resection by processing RNA primer of Okazaki Fragments. Finally, I found that replication stress favors Ku binding to RNA:DNA hybrids, indicating a novel function for Okazaki fragments in controlling Ku-mediated barrier to safeguard fork integrity. These results shed lights on how RNase H2 acts at arrested forks while implementing new aspects of the relationship between post-replicative forming RNA:DNA hybrid structures and the replication stress response. RNase H2 dysfunctions are associated with more than 50% of the Aicardi-Goutières syndrome cases. The molecular causes of this inflammatory syndrome are still poorly understood, and this work could contribute to better characterized the molecular mechanisms involved in the pathology.

Titre : Métabolisme des hybrides ARN:ADN et sauvetage des fourches de réplication par la recombinaison homologue

Mots clés : Stress réplicatif, Hybride ARN:ADN, Recombinaison Homologue, NHEJ, Fragment d'Okazaki

Résumé : Des défauts de réplication de l'ADN, autrement connus sous le terme de stress réplicatif, sont une source d'instabilité génétique qui peuvent conduire à l'entrée en mitose de cellules ayant un génome partiellement répliqué. Le stress réplicatif a été associé chez l'homme à de nombreuses pathologies comme les cancers ou des syndromes neurologiques et inflammatoires. L'altération de la progression des fourches de réplication est une des causes principales du stress réplicatif. C'est entre autres la formation de R-loops, des hybrides ARN:ADN formés de manière co-transcriptionnelle, qui compromet le maintien de la stabilité du génome notamment via l'augmentation des risques de collision entre les machineries de réplication et transcription. Bien qu'étant des éléments régulateurs de l'expression génique, les R-loops peuvent être génotoxiques si leur formation n'est pas contrôlée. Récemment, il a été proposé que des hybrides ARN:ADN se forment lors de la réparation des cassures d'ADN double-brin. Ils seraient des intermédiaires du processus de réparation, jouant des rôles positifs comme négatifs, sur les machineries de réparation. La dégradation contrôlée des hybrides ARN:ADN est une étape nécessaire pour achever la réparation des cassures d'ADN double-brin par la recombinaison homologue. Mon projet de thèse vise à déterminer si les hybrides ARN:ADN associés au stress réplicatif seraient formés en conséquence du processus de redémarrage des fourches de réplication bloquées par la recombinaison homologue. J'ai exploité un système de blocage de fourche conditionnel chez *S. pombe*, le système RTS1, permettant de bloquer une fourche de réplication donnée à un locus défini, indépendamment de la transcription.

J'ai étudié les conséquences de la stabilisation des hybrides ARN:ADN sur l'intégrité et le devenir de cette fourche bloquée. J'ai pu identifier que la dégradation d'hybrides ARN:ADN permet d'initier la résection des brins naissants, étape contrôlée par la présence du facteur de NHEJ Ku. L'activité des enzymes RNase H promeut la résection et le redémarrage des fourches bloquées, et c'est notamment RNase H2 qui a un rôle clé pour initier la dégradation, physiologique comme pathologique, des brins naissants. RNase H2 agit dans une voie parallèle à celle de MRN-Ctp1, dépendamment de la présence de Ku. Plus précisément, RNase H2 permet, en éliminant l'amorce ARN du dernier fragment d'Okazaki, de contrecarrer le rôle protecteur de Ku contre la résection des fourches bloquées. Enfin, j'ai observé que l'induction d'un stress de réplication favorise la fixation de Ku sur des hybrides ARN:ADN. Ces observations mettent en avant une nouvelle fonction pour les fragments d'Okazaki dans le contrôle de l'intégrité des fourches bloquées. Ces travaux contribuent à mieux définir le rôle de RNase H2 aux fourches bloquées, et mettent en lumière le rôle d'hybrides ARN:ADN formés de manière post-répllicative dans la mise en place de la réponse cellulaire au stress réplicatif. Des mutations de RNase H2 sont associées à plus de 50% des cas du syndrome d'Aircardi-Goutières, un syndrome inflammatoire dont les tenants moléculaires sont encore mal compris. Les résultats présentés dans ce manuscrit pourraient aider à clarifier les mécanismes moléculaires impliqués dans cette pathologie.