

Fonctions et régulations de la polo kinase Cdc5 dans l'adaptation aux dommages à l'ADN chez Saccharomyces cerevisiae

Jeanne Le Peillet

► To cite this version:

Jeanne Le Peillet. Fonctions et régulations de la polo kinase Cdc5 dans l'adaptation aux dommages à l'ADN chez Saccharomyces cerevisiae. Génétique. Sorbonne Université, 2022. Français. NNT: 2022SORUS353 . tel-03949132

HAL Id: tel-03949132 https://theses.hal.science/tel-03949132

Submitted on 20 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.







Page

Sorbonne Université

ED515 Complexité Du Vivant Laboratoire de Biologie Computationnelle et Quantitative, Équipe Télomère et Stabilité des Génomes

Fonctions et régulations de la polo kinase Cdc5 dans l'adaptation aux dommages à l'ADN chez Saccharomyces cerevisiae.

Par Jeanne Le Peillet

Thèse de doctorat de Génétique et Génomique Dirigée par Zhou Xu

Présentée et soutenue publiquement le 27 octobre 2022

Devant un jury composé de :

000000

0

Pascale Lesage, Directrice de Recherche, Rapportrice CNRS/INSERM – Université Paris Cité, U944, UMR 7212 – Hôpital Saint-Louis

Gérard Mazón, Chargé de Recherche, Rapporteur INSERM – Université Paris-Sud, UMR 9019 – Institut Gustave Roussy

Claire Torchet, Maîtresse de Conférence, Examinatrice Sorbonne Université, UMR 8226 – Institut de Biologie Physico-Chimique

Sandra Touati, Chargée de Recherche, Membre invité du jury CNRS – Université Paris Cité, UMR 7592 – Institut Jacques Monod

Zhou Xu, Directeur de Recherche, Directeur de Thèse CNRS – Sorbonne Université, UMR 7238 – Institut de Biologie Paris-Seine



Concertation de levures bourgeonnantes. Vues à Paris.

Budding Yeasts. Buddy.

À mes projets futurs

Remerciements

Je remercie Pascale Lesage, Gérard Mazón, Claire Torchet et Sandra Touati pour avoir accepté aussi rapidement et avec enthousiasme de constituer ce jury pour évaluer mon travail, et pour avoir endossé la responsabilité de relire cette thèse en qualité de rapporteurs en ce qui concerne Mme Lesage et M. Mazón. J'espère que vous apprécierez la lire autant que j'ai apprécié l'écrire. Je remercie les membres de mon comité de thèse, Julien Henri, Guy-Franck Richard et Angela Taddei qui m'ont apporté à deux reprises leurs questions et impressions sur la présentation de mes résultats, et ont par-là grandement participé aux réflexions scientifiques auxquelles nous avons aujourd'hui abouties. Je remercie l'ensemble des membres du LCQB, en particulier Alessandra Carbone, Directrice du LCQB, qui m'a soutenue dès le jour de mon arrivée, par son intérêt scientifique mais aussi artistique et personnel, et qui s'est toujours montrée très disponible.

Merci à Zhou Xu de m'avoir donné la chance de faire équipe ensemble durant ces trois années. J'ai beaucoup appris, et j'ai aussi appris qu'il me restait beaucoup à apprendre. Merci pour ta réactivité qui a effectivement permis de faire tenir la rédaction de cette thèse en 2 mois et demi. Merci aussi d'être comme tu es : compréhensif, empathique, patient et éclairé. Et un peu drôle quand même.

Un grand plaisir aussi d'avoir côtoyé Oana Ilioaia et Frédéric Chaux-Jukic durant toute mon expérience de thèse, c'était à la fois divertissant et enrichissant. Merci aussi d'avoir pris le temps de relire des parties de mon manuscrit et d'en avoir relevé les points faibles et curiosités. Un remerciement spécial à Oana pour avoir pris soin de mon estomac tous les jours à 11h, premiers de Jussieu à partir manger évidemment. Je remercie aussi l'ensemble des membres de cette belle équipe : Héloïse Coutelier – qui a initié certains des travaux présentés dans ce manuscrit –, Liébaut Dudragne, Stephan Eberhard et Clotilde Garrido.

Merci à Mathilde Garcia et à Salomé Nashed pour les discussions enrichissantes sur nos expériences de transposons et les analyses de Gene Ontology. Merci à Gilles Fisher, Nicolas Agier, Stéphane Delmas pour les multiples échanges à propos du crible des transposons, testant les limites de mes raisonnements et me rassurant sur mes compétences quant aux difficultés expérimentales et analytiques de ce protocole tout nouveau pour nous. Merci à Thierry Delaveau pour le soutien émotionnel permanent. Merci à Frédéric Devaux pour l'intérêt et l'aide pour mes projets entrepreneuriaux. Merci à Bianca Sclavi pour m'avoir initiée à intervenir auprès des élèves du secondaire, expérience extrêmement enrichissante et qui se poursuivra. Merci à Fabienne Velter et Mylène Jomie pour l'accueil toujours chaleureux et le soutien pour mes différentes aventures. Merci à Jodia pour nos discussions marocaines et ton amitié. Merci à mes co-bourreaux, Houssam El Barbry et Salomé Nashed, deux excellents scientifiques, à la fois curieux et généreux, drôles et assidus. Bref je ne doute pas de votre prochain prix Nobel, vous êtes absolument المعتاز. Nos réflexions scientifiques tirées par les cheveux vont me manquer. Merci aussi à Lexuan, 你帮助我保持了我的中文水 平, 我总是会惊讶你能理解我说的话。I took a real pleasure making you discover some French weirdness and testing on you my latest findings in Chinese expressions. You're smart and hardworking, no doubt you will manage to pursue a great scientific career wherever you want to be!

Merci à Julien Miniou pour m'avoir hissée à la place de championne de Sorbonne Université pour les Opens de Cross Fit 2022. Il faut croire que j'avais un réel besoin de me défouler.

Merci au réseau Pépite d'avoir cru en mon projet entrepreneurial Beink et de m'avoir formée tout au long de cette dernière année de thèse. Mais surtout merci de m'avoir invitée en tant qu'intervenante à différentes tables rondes, conférences et formations, car ce sont ces rôles, combinés à mes travaux de thèse, qui m'ont le plus fait grandir en tant que personne et entrepreneure. Remerciements spéciaux à Valérie Patrin-Leclère, Mathieu Porchet, Mickaël Le Guen, Adrien Tusseau, Myriam Deghrar, Claudine Prieur, Audrey Petit, Ana Amado. L'obtention des Prix Pépite IDF et Pépite France est un accélérateur fort du développement de Beink ! Merci à Milan d'avoir été le pilier de mon organisation double entre thèse et entreprise. Merci aussi à Stéphane Lemaire, Pierre Crozet et Erfane Arwani pour avoir fait partie des premiers à soutenir Beink en tant que clients.

Merci à l'ensemble des personnes que j'ai côtoyées au sein de Jussieu durant ces trois années. Merci aussi à tous ceux avec qui j'ai eu l'honneur d'échanger au sein du Museum National d'Histoire Naturelle pour des projets Art et Science, en particulier Anne-Laure Peugeot-Guieysse et Didier Geffard-Kuriyama. J'en profite pour remercier Sophie Gournet à l'IBPS pour son soutien à Beink également. Merci à Caty Olive et Yves Le Peillet d'avoir fabriqué mon cerveau bizarre et de continuer à l'alimenter de nouvelles façons de penser hors des sentiers. Ça fait 27 ans que vous donnez sens à mes incohérences, un travail d'acharnés. Merci à Victor Le Peillet de continuer à m'apprendre des millions de choses, notamment sur moi-même. Ta seule existence suffit à rendre le monde un peu plus chouette et beaucoup plus ingénieux. Merci à Nicole et Loule Olive pour avoir hébergée une ermite et une thèse pendant trois semaines consécutives. J'entends encore le bruit des cigales dans certaines pages de mon manuscrit, en particulier l'article 2 : ouvrez-le et écoutez bien, vous sentirez peut-être le soleil du Sud. Merci à l'entièreté de la famille pour le soutien, toujours avec humour !

Merci à Joseph Guilliet pour l'initiation à la langue russe et les échanges scientifiques toujours effervescents, mais aussi pour nourrir mon humour déconcertant.

Merci à Pascale et Stéphane Vancostenoble de m'avoir hébergée le temps d'une deuxième incubation covid et de m'avoir autant choyée pendant ma rédaction de thèse. Merci à Baptiste Vancostenoble pour m'avoir fait bénéficier de ton expérience de thèse fraîchement soutenue : mon blocage s'est complètement évanoui et j'ai pu enfin rédiger un article scientifique au-delà de ce que je me croyais capable. Merci aussi pour ta patience face à mon impatience.

Merci à mes amis de m'avoir emmenée rédiger un peu n'importe où en France et en Navarre cet été. À Félix.

Merci à Gorphe, cochon d'Inde altruiste qui a su repousser les lois du vieillissement cellulaire pour éviter de trépasser au cours de ma thèse.

Merci au Covid de m'avoir encore une fois appris à relativiser. Plus sérieusement, merci de m'avoir privée de mon odorat très tôt dans ma thèse, cela fait maintenant 2 ans que je peux nettoyer la chambre froide de ses multiples champignons et garder quand même de l'appétit pour aller à la cantine après. Le Petit Prince a dit : « Pour les uns, qui voyagent, les étoiles sont des guides. Pour d'autres elles ne sont rien que de petites lumières. Pour d'autres qui sont savants elles sont des problèmes ». Mais ce que Le Petit Prince n'a pas encore dit, c'est qu'à mes yeux de myope, elles sont des destinations sur lesquelles vous embarquer avec moi.

Je vous souhaite bonne lecture, si vous êtes partis pour un tel voyage, sinon vous pouvez ne regarder que les images, c'est bien aussi.



Jeannot Labo – personnage fictif, image mentale de Jeanne au Labo –, nageant dans le fleuve qu'il a créé après avoir oublié d'éteindre le robinet d'eau.

Avant-propos

Ces travaux de thèse ont été menés sous la direction de Zhou Xu, dans l'équipe Télomère et Stabilité Génomique au laboratoire de Biologie Computationnelle et Quantitative du CNRS sur le campus Jussieu de Sorbonne Université. L'équipe travaille plus précisément sur les télomères, les dommages à l'ADN et les mécanismes de réponse à ces dommages, ainsi que sur les conséquences de l'instabilité génomique. Ces recherches sont menées sur deux organismes modèles, *Chlamydomonas reinhardtii* et *Saccharomyces cerevisiae*.

Le présent manuscrit regroupe des travaux de thèse menés sur trois ans sur la levure bourgeonnante *Saccharomyces cerevisiae* dans le but d'étudier spécifiquement une réponse au dommage à l'ADN : l'adaptation au dommage à l'ADN.

Les dommages à l'ADN sont une menace sévère pour l'intégrité du génome d'une cellule. Lorsqu'un tel dommage est détecté, des mécanismes de contrôle arrêtent le cycle cellulaire à la transition des phases G2 et M, au *checkpoint* de dommage à l'ADN. Ce temps d'arrêt permet à la cellule d'enclencher les processus de réparation du dommage. Mais lorsque la réparation n'est pas possible, la cellule finit par reprendre sa division cellulaire malgré la persistance de la lésion de l'ADN. Ce processus est appelé l'adaptation au dommage à l'ADN et dépend fortement de l'activité de la polo kinase Cdc5. Cdc5 est essentielle à la survie cellulaire et participe à différentes étapes du cycle cellulaire, pour lesquelles sont rôle est bien décrit. Mais les mécanismes par lesquels Cdc5 permet spécifiquement l'adaptation au dommage à l'ADN, de même que les mécanismes généraux de l'adaptation, restent méconnus.

La partie introductive présentée dans ce manuscrit reprend les connaissances actuelles sur l'adaptation au dommage à l'ADN et le rôle spécifique de Cdc5. Elle démarre par une description de la famille des polo kinases puis plus spécifiquement de Cdc5. Elle se poursuit par la présentation des très nombreux rôles de Cdc5 au cours d'un cycle cellulaire hors conditions de dommage, avant de détailler son rôle spécifique dans le checkpoint de dommage à l'ADN puis dans l'adaptation. Enfin, cette introduction est l'occasion de présenter l'implication potentielle de l'adaptation au dommage à l'ADN dans les cancers chez l'humain. De nombreuses inconnues sont pointées tout au long de cette première partie, nous permettant d'aboutir à la question scientifique suivante : comment la coordination de deux systèmes, le cycle cellulaire et le checkpoint de dommage à l'ADN, permet l'adaptation au dommage à l'ADN ?

Nous répondons à cette question en l'abordant sous deux angles principaux. Dans un premier article, nous révélons les régulations transcriptionnelles et post-traductionnelles de Cdc5 spécifiques de l'adaptation. Dans un second article, nous utilisons une méthode de crible génétique à grande échelle spécifiquement mis au point pour l'étude de l'adaptation, et grâce auquel nous avons pu identifier de nombreux substrats potentiels de Cdc5 permettant l'adaptation.

L'ensemble des résultats majeurs de cette thèse sont enfin synthétisés dans une discussion qui propose un modèle mécanistique de l'adaptation au dommage à l'ADN ainsi que des pistes d'investigation à suivre poursuivre les recherches.

Ce manuscrit se termine enfin sur un dernier article, en rupture du sujet de thèse présenté ci-dessus, et issu de recherches initiées antérieurement. Cet article présente le DNA Drive, une technologie innovante de stockage de données numériques dans de l'ADN et qui a donné lieu au dépôt d'un brevet. Sa rédaction s'est faite sur le temps de la thèse.

Sommaire

Remerciements			
Avant-propos9			
Sommaire			
Table des figures (hors articles) 1			
Table des tableaux (hors articles) 18			
Table des abréviations1			
Introduction bibliographique2			
1. Caractéristiques phylogénétiques et structurelles de la Polo-kinase Cdc5 d			
1 1 Généralités sur les Polo-kinases			
1 1 1 La diversité des Plk 2			
1.1.2 La phylogénie des Plk 2			
1.1.2. L'absence des Plk chez certains organismes			
1.2. La structure des Plk			
1.2. La su detta e des rik			
1.2.1. Le domaine Rilase			
1.2.3. Régulations réciproques entre le domaine kinase et le PBD			
1.2.4. La liaison interdomaine			
1.2.5. Le domaine de dégradation23			
 Rôles et localisations de Cdc5 au cours du cycle cellulaire en conditions physiologique 			
31			
2.1. Présentation du cycle cellulaire de <i>S. cerevisiae</i> et de ses régulations			
2.1.1. Description générale des phases du cycle cellulaire			
2.1.2. Le cycle cellulaire chez <i>S. cerevisiae</i>			

		2.1.3		Les phosphorylations régulatrices du cycle cellulaire	3
		2.1.4	•	Les déphosphorylations régulatrices du cycle cellulaire3	5
	2.	2. L	.es i	rôles de Cdc5 dans le cycle cellulaire associés à ses changements de localisatior	۱S
	et	de ni	ivea	aux d'expression	8
		2.2.1	•	Cdc5 est dégradée en fin de mitose, permettant l'entrée en G1	8
		2.2.2	•	Cdc5 permet le maintien de l'intégrité du fuseau mitotique en phase S3	8
		2.2.3	•	La localisation de Cdc5 au noyau en phase G2/M permet de déclencher l'entré	e
		en m	itos	se3	9
		2.2.4	•	Les fonctions de Cdc5 au cours de la mitose4	0
		2.2.5	•	Les fonctions de Cdc5 au cours de la méiose4	5
	2.	3. L	.es i	rôles de Cdc5 dans les différents <i>checkpoints</i> de sortie de mitose4	8
		2.3.1		Le checkpoint de l'assemblage du fuseau mitotique (SAC) 4	8
		2.3.2		Le checkpoint du positionnement du fuseau mitotique (SPOC)	9
		2.3.3	•	Le <i>checkpoint</i> de dommage à l'ADN4	9
3.		Impli	cat	ions de Cdc5 dans le <i>checkpoint</i> de dommages à l'ADN5	0
	3.	1. 0	Gén	éralités sur le <i>checkpoint</i> de dommage à l'ADN5	0
	3.	2. L	.es s	signaux reconnus par le <i>checkpoint</i> de dommage à l'ADN5	1
		3.2.1	•	Les cassures double-brin de l'ADN5	1
		3.2.2		La déstabilisation des télomères5	3
	3.	3. L	.a c	cascade de signalisation du checkpoint de dommages à l'ADN (exemple de	a
	cassure double-brin)			6	
		3.3.1	•	Le rôle des protéines senseures et transductrices dans le checkpoint d	e
		domr	mag	ges à l'ADN5	7
		3.3.2		Les kinases de transduction du <i>checkpoint</i> de dommage à l'ADN5	8
		3.3.3	•	Le rôle des effecteurs de l'arrêt du cycle cellulaire5	9
		3.3.4	•	L'expression de gènes spécifiques de la réponse au dommage à l'ADN 6	0

	3.3.5	5.	Modifications de la chromatine participant à l'activation robuste du <i>checkpoint</i> 61
3	3.4. Jouble	Sim e-bri	ilitudes et différences du <i>checkpoint</i> de dommage à l'ADN activé par des cassures n ou par <i>cdc13-1</i> 63
3	8.5.	Le r	ôle de Cdc5 dans le <i>checkpoint</i> de dommages à l'ADN65
	3.5.: indii	1. recto	Le complexe MRX et sa protéine associée Sae2 interagissent au moins ement avec Cdc565
	3.5.2	2.	Les interactions entre Cdc5 et Rad53 promeuvent l'adaptation65
	3.5.3	3.	La localisation de Cdc5 change au cours de l'arrêt en G2/M66
	3.5.4 Cdc	4. 5	L'expression de <i>CDC5</i> dépend de la phosphorylation de la protéine Ndd1 par 67
	8.6.	L'ex	tinction du <i>checkpoint</i> de dommage à l'ADN69
	3.6.: ľAD	1. N	Mécanisme général menant à la désactivation du <i>checkpoint</i> de dommage à 69
	3.6.2 cass	2. ures	La désactivation du <i>checkpoint</i> de dommage à l'ADN après réparation des s double-brin
	3.6.3 de d	3. Iom	L'adaptation au dommage à l'ADN et la reprise du cycle cellulaire en présence mages persistants
4.	Méc	anis	sme de l'adaptation au dommage à l'ADN et rôles de Cdc5 dans ce processus . 73
4.1. La		La n	nise en évidence de l'adaptation au dommage à l'ADN73
	4.1.3	1.	La mise en évidence chez <i>S. cerevisiae</i> 73
	4.1.2	2.	L'adaptation est un phénomène conservé chez les organismes pluricellulaires 74
Z	1.2.	Le n	nécanisme général de l'adaptation au dommage à l'ADN et l'implication de Cdc5
C	dans co	e pr	ocessus
	4.2.2	1.	L'extinction du signal du <i>checkpoint</i> pendant l'adaptation
	4.2.2	2.	L'importance de Cdc5 dans l'adaptation au dommage à l'ADN

 4.3. Description des nombreux facteurs impliqués dans l'adaptation au dommage à l'ADN 78
4.3.1. L'état de phosphorylation de Rad53 joue un rôle dans la capacité des cellules à s'adapter
4.3.2. Le niveau de résection semble impacter la capacité d'adaptation
4.3.3. La dynamique de séquestration et de dégradation des protéines mitotiques
impacte l'adaptation
4.3.4. Les modifications d'histones influencent l'adaptation
5. L'adaptation est un mécanisme qui semble impliqué dans l'émergence des cancers87
Résultats
Article 1 : Cdc5 est régulée à plusieurs niveaux, transcriptionnellement et post-
traductionnellement, en réponse à un dommage à l'ADN provoqué par déstabilisation des
télomères
Title: The Polo kinase Cdc5 is regulated at multiple levels in the adaptation response to
telomere dysfunction
Abstract:
Introduction
Results
Discussion
Material and Methods129
SDS-PAGE and western blot analysis130
Time-lapse microscopy133
References
Supplementary data139
Article 2 : Mise en évidence de nouvelles voies impliquées dans l'adaptation au dommage
à l'ADN
Uncovering new pathways implicated in adaptation to DNA damage

Abstract			
Introduction148			
Results			
Discussion			
Materials and methods173			
Acknowledgments			
Supplemental data			
References			
Matériels et Méthodes sur le crible saturé en transposons pour l'étude de l'adaptation au			
dommage à l'ADN213			
1. Préparation de la banque de mutants en milieu liquide			
1.1. Principe de l'expérience et aperçu des étapes			
1.2. Sélection des clones sur lesquels démarrer l'expérience			
1.3. Précultures liquides217			
1.4. Induction de la transposition			
1.5. Réensemencement			
1.6. Expérience d'adaptation au dommage à l'ADN			
1.7. Evaluation du bruit de fond et de l'efficacité de la transposition			
2. Préparation de l'ADN pour le séquençage 221			
2.1. Principe de l'expérience et aperçu des étapes 221			
2.2. Extraction de l'ADN222			
2.3. Digestions enzymatiques			
2.4. Circularisation de l'ADN 223			
2.5. Précipitation de l'ADN circularisé223			
2.6. Amplification des sites d'insertions de transposons			
Discussion			

1. Cribler les mutants d'adaptation par des méthodes indirectes
2. L'adaptation au dommage à l'ADN est un mécanisme extrêmement complexe 233
2.1. L'adaptation concerne de multiples voies métaboliques
2.2. Cdc5 tient une place centrale dans l'adaptation en interagissant avec un grand
nombre de facteurs
2.3. Cdc5 est dégradée au cours de l'adaptation selon des voies non canoniques, tout
en étant essentielle à ce processus237
2.4. Proposition d'un modèle liant les complexes cohésine, MRX et APC/C239
3. Conclusion
Références
Annexes
La révolution de l'ADN: biocompatible and biosafe DNA data storage
Abstract:
One-Sentence Summary:
Main Text:
References and notes:
Acknowledgments:
- Funding:
Author contributions: 273
Competing interests: 273
Competing interests
Data and materials availability:
Résumé en français 279
Résumé en anglais

Table des figures (hors articles)

Figure 1. Arbre non raciné montrant la distance phylogénétique entre les différentes Plk 24
Figure 2. Structures de Cdc5
Figure 3. Fonctions et localisations de Cdc5 au cours du cycle cellulaire
Figure 4. Rôles de Cdc5 dans la régulation du FEAR et du MEN43
Figure 5. Résumé des étapes de détection du dommage à l'ADN et de résection
Figure 6. Inhibition de la séparation des chromatides sœurs par l'action de Rad53 et Chk1 en
réponse à un dommage à l'ADN59
Figure 7. Expression de gènes spécifiques de la réponse au dommage à l'ADN
Figure 8. Modifications des histones autour du site du dommage
Figure 9. Régulation du cluster de gènes CLB267
Figure 10. Résumé graphique des mécanismes favorisant l'arrêt du cycle cellulaire après
induction d'un dommage à l'ADN et des voies métaboliques possibles après l'arrêt
Figure 11. Diversité des voies impactant l'adaptation85
Figure 12. Carte du plasmide pBK549215
Figure 13. Schématisation des étapes de cultures jusqu'à l'enrichissement en cellules
transposées
transposées. 216 Figure 14. Colonies formées sur boîtes drop-out -Leu et -Ura pour 6 transformants après 3 jours d'incubation à 23°C. 217 Figure 15. Courbe de croissance du nombre de cellules LEU+ normalisé 221 Figure 16. Etapes récapitulatives depuis l'extraction d'ADN génomique jusqu'au séquençage. 221 Figure 17. Profils de digestion de l'ADN génomique 223 Figure 18. Profil de migration des échantillons après amplification des sites d'insertions de transposons par PCR 224 Figure 19. Profils de digestion par EcoRV du plasmide pBK625. 226
transposées
transposées.216Figure 14. Colonies formées sur boîtes drop-out -Leu et -Ura pour 6 transformants après 3jours d'incubation à 23°C.217Figure 15. Courbe de croissance du nombre de cellules LEU+ normalisé221Figure 16. Etapes récapitulatives depuis l'extraction d'ADN génomique jusqu'au séquençage.221Figure 17. Profils de digestion de l'ADN génomique223Figure 18. Profil de migration des échantillons après amplification des sites d'insertions de224Figure 19. Profils de digestion par EcoRV du plasmide pBK625.226Figure 20. Comparaison de la capacité de croissance.227Figure 21. Les rôles de Cdc5 dans le cycle cellulaire et les facteurs impliquées dans l'adaptation
transposées
transposées

Table des tableaux (hors articles)

Tableau 1. Récapitulatif des mutants d'adaptation et du mécanisme sous-jacent
Tableau 2. Mesures des DO _{600 nm} obtenues pendant la phase de préculture. 218
Tableau 3. Mesures des DO ₆₀₀ obtenues pendant la phase de réensemencement
Tableau 4. DO ₆₀₀ prises au moment de la collecte des cellules après l'expérience d'adaptation.
Tableau 5. Dilutions appliquées lors de l'étalement sur boîtes drop-out -IEU, drop-out -URA et
YPD, à différents temps d'induction de la transposition 220
Tableau 6. Séquences des amorces P5 et P7 utilisées, avec les index Illumina correspondants
Tableau 7. Séquences des amorces de séquençage. 225

Table des abréviations

Abréviation	Anglais	Français
	Anaphase-Promoting	Complexe promoteur de
APC/C	Complex/Cyclosome	l'anaphase/cyclosome
		Protéine mutée dans le syndrome
ATM	Ataxia telangiectasia mutated	d'ataxie télangiectasie
ATP	Adenosine-TriPhosphate	Adénosine-triphosphate
	Ataxia telangiectasia and Rad3-	Protéine liée à l'ataxie
ATR	related protein	télangiectasie et à Rad3
CAR	Contractile Actomyosin Ring	Anneau d'actomyosine contractile
CDC	Cell-division cycle	Cycle cellulaire
CDK	Cyclin-dependent kinase	Kinase cylcine-dépendante
		Immunoprécipitation de la
ChIP	Chromatin ImmunoPrecipitation	chromatine
		Centre organisateur des
COMT / MTOC	Microtubule-Organizing Center	microtubule
		Protéine 9 associée aux répétitions
	Clustered Regularly Interspaced	palindromiques courtes
	Short Palindromic Repeats	régulièrement espacées et
CRISPR-Cas9	Associated protein 9	groupées
CST	Cdc13-Stn1-Ten1 complex	Complexe Cdc13-Stn1-Ten1
Cyt	Cytoplasm-to-vacuole targeting	Ciblage cytoplasme-vacuole
DB1/DB2	Destruction box 1/2	0 7 1
D-box	Destruction box	
	Dbf4-Dependent Cdc7 Kinase	Complexe de la kinase Cdc7
DDK	complex	dépendante de Dbf4
DDR	DNA Damage Response	Réponse au dommage à l'ADN
dNTP	Deoxyribonucleotide triphosphate	Désoxyribonucléotide triphosphate
DSB	Double-Strand Break	Cassure simple-brin
dsDNA	Double-sStrand DNA	ADN double-brin
	CDC fourteen early anaphase	Libération de Cdc14 en anaphase
FEAR	release	précoce
FHA	Fork Head-Associated	
G1	Gap 1	Ecart 1
G2	Gap 2	Ecart 2
	Golgi-Associated Retrograde Protein	Complexe de protéines rétrogrades
GARP	complex	associées au Golgi
		Enzyme catalysant l'hydrolyse de la
GTPase	Guanosine TriPhosphate hydrolase	guanosine triphosphate
HR	Homologous Recombination	Recombinaison homologue
Μ	Mitosis	Mitose
MEN	Mitotic Exit Network	Réseau de sortie de mitose
	Microhomology-Mediated End	Jonction d'extrémité médiée par la
MMEJ	Joining	microhomologie
MMS	Methyl MethaneSulfonate	Méthane sulfonate de méthyle
MRN	Mre11-Rad50-Nbs1 complex	Complexe Mre11-Rad50-Nbs1

MRX	Mre11-Rad50-Xrs2 complex	Complexe Mre11-Rad50-Xrs2 Jonction d'extrémités non-
NHEJ	Non-Homologous End Joining	homologues
PBD	Polo-Box Domain	Domaine Polo-box
	Phosphatidylinositol 3-kinase-	Kinase liée à la phosphatidylinositol
ΡΙΚΚ	related kinase	3-kinase
РКА	Protein Kinase A	Protéine kinase A
PP2A	Phosphatase Protein 2A	Protéine phosphatase 2A
PPP	Phosphoprotein PhosPhatase	Phosphoprotéine phosphatase
РТР	Phosphotyrosine PhosPhatase	Phosphatase phosphotyrosine Complexe de la ribonucléotide
RNR	RiboNucleotide Reductase complex	réductase
ROS	Reactive Oxygen Species	Dérivés réactifs de l'oxygène
RPA	Replication Protein A	Protéine de réplication A
	Chromatin Structure Remodeling	Complexe de remodelage de la
RSC	complex	chromatine
S	Interphase	Interphase
		Point de Contrôle de l'assemblage
SAC	Spindle Assembly Checkpoint	du fuseau mitotique
SPB	Spindle Pole Body	Corps du fuseau mitotique
		Point de contrôle de la position du
SPOC	Spindle Position Checkpoint	fuseau mitotique
SSB	Single-Strand Break	Cassure simple-brin
ssDNA	Single-Strand DNA	ADN simple-brin
TALEN	TAL-Effector nuclease	Nucléase TAL-effector
	Target of rapamycin kinase	Cible du complexe kinase I de la
TORC1	complex I	rapamycine
V(D)J	Viariable Diversity Joining	Variable diversité jonction
WB	Western blot	
ZFN	Zinc Finger Nuclease	Nucléase en doigts de zinc

Introduction

o)

iograp

1. Caractéristiques phylogénétiques et structurelles de la Polo-kinase Cdc5 de *Saccharomyces cerevisiae*

1.1. Généralités sur les Polo-kinases

Les Polo-kinases (Plk) sont des sérines/thréonines (S/T) kinases qui jouent un rôle clef au cours des multiples étapes de la mitose et de la méiose, dans la transition G1/S et dans la réponse à des dommages à l'ADN (Barr et al., 2004). La première découverte d'une Plk vient du crible de mutants du cycle cellulaire (*CDC*) mené chez *Saccharomyces cerevisiae* et révélant la protéine Cdc5 (Hartwell et al., 1973), qui a été ensuite caractérisée comme appartenant à la famille des Plk. Des membres de la famille des Plk ont été identifiés dans divers organismes eucaryotes, de la levure bourgeonnante jusqu'aux mammifères, à l'exception des plantes (Kim and Goshima, 2022).

1.1.1. La diversité des Plk

Le nom de cette famille vient d'un phénotype de malformation du centre organisateur des microtubules (MTOC, appelé *spindle pole body* SPB chez la levure), observé chez *Drosophila melanogaster* lorsqu'un gène, appelé *POLO*, est muté (Sunkel and Glover, 1988). Plus tard, le gène *POLO* s'est révélé coder pour une protéine kinase de type S/T (Llamazares et al., 1991). Chez *D. melanogaster*, *S. cerevisiae* et *Schizosaccharomyces pombe*, un seul membre de la famille des Plk existe, respectivement nommé Polo (Llamazares et al., 1991), Cdc5 (Hartwell et al., 1973) et Plo1 (Ohkura et al., 1995). L'homme, la souris, *Xenopus laevis* et *Caenorhabditis elegans* possèdent quant à eux trois Plk majoritaires, qui sont respectivement &: Plk1,2 et 3 ; Plx1, 2 et 3 ; et Plc1, 2 et 3 chez les deux derniers organismes cités(Archambault et al., 2015; Lowery et al., 2005).L'homme, la souris, *X. laevis* et *D. melanogaster* possèdent une quatrième Plk, appelée Plk4 chez les mammifères, et, chez la souris et l'homme, une cinquième Plk a été caractérisée, Plk5, qui se distingue clairement des autres en ce qu'elle ne possède pas d'activité kinase (de Cárcer et al., 2011).

1.1.2. La phylogénie des Plk

L'analyse phylogénétique des séquences des Plk révèle que les Plk1, 2 et 3 semblent être paralogues au sein de chaque espèce, que ce soit chez l'humain, la souris ou *X. laevis*, tandis que Plk1, Polo et Cdc5 sont des orthologues les unes par rapport aux autres (Lowery et al., 2005). L'expansion d'une Plk en trois Plk semble être un événement précoce dans l'histoire évolutive, et qui aurait eu lieu au moins deux fois de manière indépendante. Cette dernière hypothèse est appuyée par le fait que les Plk de *C. elegans* présentent moins de fonctions communes aux autres membres de la famille des Plk (Lowery et al., 2005). Les gènes *PLK* d'organismes ne possédant qu'un seul membre de cette famille sont plus proches de la classe des Plk1 d'un point de vue évolutif et présentent des fonctions en mitose, à l'image de Plk1 (Fig. 1). Plk1 et ses orthologues Cdc5 et Polo sont toutes des protéines codées par des gènes essentiels dont l'inactivation est léthale (Kitada et al., 1993; Llamazares et al., 1991).



Figure 1. Arbre non raciné montrant la distance phylogénétique entre les différentes Plk (Lowery et al., 2005). On y observe que Plk1 est la Plk la plus proche de Cdc5 et Plo1, comparée aux Plk2 et 3.

1.1.3. L'absence des Plk chez certains organismes

Chez les bactéries, les archées et, parmi les eucaryotes, chez les plantes, aucune protéine présentant une homologie forte avec les Plk n'a été identifiée (Kim and Goshima, 2022; Lowery et al., 2005). Les plantes possèdent pourtant des kinases cycline-dépendantes

Page | 24

et leur cycle cellulaire montre de fortes similitudes avec la levure et les animaux (Dewitte and Murray, 2003). Une étude suggère que les plantes auraient perdu l'orthologue du gène *PLK* avant la divergence des plantes terrestres au cours de l'évolution (Okamura et al., 2017). Quant aux algues, des orthologues de *PLK* semblent avoir été trouvés chez les algues vertes et les algues rouges, ainsi que chez *Klebsormidium flaccidum*, une algue filamenteuse capable de vivre dans l'eau et sur terre (Okamura et al., 2017).

*

Plk1 est la protéine la plus conservée de la famille des Plk et sera décrite en filigrane de son orthologue Cdc5 tout au long de ce chapitre.

1.2. La structure des Plk

Les Plk sont définies par deux séquences caractéristiques conservées : un domaine kinase en N-terminal et une région *Polo-box* en C-terminal.

1.2.1. Le domaine kinase

Les domaines kinases sont fortement conservés parmi les Plk. Leurs séquences et structures tridimensionnelles ressemblent à celles des kinases Aurora et des kinases calcium/calmoduline dépendantes (Archambault et al., 2015; Lowery et al., 2005). Le domaine kinase de Cdc5 s'étend de l'acide aminé 82 à 337 (Fig. 2 B). Il contient un domaine signal de localisation au noyau en position 171-174, de la forme LRRL (Nakashima et al., 2008).

Comme d'autres kinases, Cdc5 peut être activée par une phosphorylation au niveau du résidu T238 – correspondant à la thréonine 210 chez Plk1 –, permettant le recrutement de Cdc5 au SPB en conditions de dommage à l'ADN (Rawal et al., 2016; Rodriguez-Rodriguez et al., 2016). Le résidu T238 est situé dans une région du domaine kinase appelée *T-loop* (Archambault and Carmena, 2012). La *T-loop* est une boucle activatrice, dont la phosphorylation lui donne une conformation ouverte permettant à la kinase de se lier à ses substrats (Johnson et al., 1995). Cette activation se produit au moment de l'entrée en mitose. Cdc5 est ainsi activée par Cdc28 (protéine également connue sous le nom de kinase cycline-dépendante Cdk1), et potentiellement d'autres kinases, qui phosphorylent la *T-loop* en plusieurs résidus, dont T242 (Mortensen et al., 2005).

Au sein du domaine kinase de Cdc5 se trouve un résidu particulièrement intéressant pour notre étude : la leucine 251, qui, lorsqu'elle est mutée en tryptophane (L251W, mutant *cdc5-ad*), confère à Cdc5 une déficience spécifique en adaptation au dommage (Toczyski et al., 1997). L'adaptation permet à la cellule de reprendre la progression de son cycle cellulaire malgré la persistance d'un dommage : il s'agit du phénomène phare de notre étude, et bien que parfois mentionné par nécessité, il sera pleinement décrit en partie 4.

1.2.2. Le domaine Polo-box

En plus du domaine kinase, les Plk contiennent une séquence dans le domaine Cterminal non catalytique appelée *Polo-box domain* (PBD) (Fig. 2 A&B). Le PBD contient deux *Polo-boxes* (PB1 en position 520-582 et PB2 en position 619-692) précédées d'une *Polo-cap*. La *Polo-cap* est définie comme une région capable de stabiliser le PBD en conformation repliée, en s'enroulant autour de la PB2 (Elia et al., 2003). Le PBD est beaucoup moins bien conservé que le domaine kinase, avec seulement ~70 acides aminés en partie C-terminale considérés comme formant le cœur du PBD (Ratsima et al., 2011).

À l'image d'une pince, les deux *Polo-boxes* contribuent au recrutement des substrats du domaine kinase, permettant de localiser les Plk à proximité de leurs cibles. Chez *S. cerevisiae*, il a été montré que la délétion du PBD seul (depuis le résidu 511 jusqu'au résidu 705) ou avec la région *Polo-cap* (depuis le résidu 470 jusqu'au résidu 705) conduit à une forte augmentation des niveaux protéiques de ces mutants, comparés à la protéine Cdc5 sauvage (Ratsima et al., 2011). Ces mutants sont capables de compléter la mitose, mais pas de maintenir l'intégrité du SPB (Ratsima et al., 2011). De plus, la délétion du PBD n'est pas viable, semblant suggérer que le PBD est essentiel à la phosphorylation des substrats de Cdc5. Cependant, il a par la suite été montré que l'essentialité apparente du PBD est contrecarrée en forçant le recrutement de Cdc5 au SPB (Ratsima et al., 2016).

Le motif optimal reconnu par le PBD est de la forme S - [pS/pT] - [P/X] (Elia et al., 2003). La phosphorylation des résidus sérine et thréonine peut se faire entre autres par Cdc28, qui reconnaît la proline (Archambault et al., 2015). La liaison du PBD à ces phosphopeptides mène en général à une activation du domaine kinase, interaction qui sera développée dans la partie suivante. Par ailleurs, le PBD est capable de se lier à des protéines ne possédant pas ce site de reconnaissance. Par exemple, chez *S. cerevisiae*, Dbf4 – sous-unité régulatrice de Cdc7 – se lie à Cdc5 au niveau de la séquence des résidus 82-96, qui ne comprennent pas le motif canonique précédemment décrit, et qui se trouve à l'opposé du site de liaison pS/pT (Almawi et al., 2020). L'interaction entre Cdc5 et Dbf4 au niveau de ces résidus, se fait sans phosphorylation préliminaire et semble inhiber Cdc5.

Récemment, la structure cristalline du PBD de Cdc5, présentant PB1, PB2 et la *Polo-cap*, a été résolue, révélant des interactions entre le domaine kinase et le PBD (Almawi et al., 2020).

1.2.3. Régulations réciproques entre le domaine kinase et le PBD

Les structures cristallines du domaine kinase, du PBD et du complexe PBD/domaine kinase, déterminées chez Plk1, révèlent que l'interaction entre le domaine kinase et le PBD permet la régulation fine de plusieurs processus biologiques (Lee and Haber, 2015).

Comme nous l'avons brièvement évoqué, le PBD est capable de réguler l'activité kinase de Plk : cette structure inhibe la fonction kinase en se liant au domaine kinase, ou bien l'active en prenant une conformation dissociée du domaine kinase. La co-structure cristalline des domaines kinase et *Polo-box*, obtenue chez *Danio rerio*, révèle le positionnement relatif d'un domaine par rapport à l'autre et appuie l'hypothèse d'une régulation allostérique entre eux (Archambault et al., 2008). Le domaine kinase se lie au PBD sur un site éloigné de celui sur lequel se lie le substrat, changeant la conformation du PBD. De son côté, le PBD se lie au domaine kinase dans la région charnière entre les deux lobes du domaine kinase, sans obstruer l'accès à son site actif. Cette structure cristalline a aussi permis de révéler certains mécanismes activateurs. Par exemple, la phosphorylation de S137 permet à ce résidu d'interférer avec l'interaction inhibitrice de PBD sur le domaine kinase, augmentant ainsi Plk1 (Jang et al., 2002). D'autres exemples appuient l'idée que la phosphorylation de la *T-loop* régule les interactions allostériques avec le PBD (Archambault et al., 2015).

1.2.4. La liaison interdomaine

Entre le domaine kinase et le PBD se trouve une séquence appelée la liaison interdomaine (Fig. 2 A). Il s'agit d'une séquence peu structurée et moins conservée parmi les Plk que celles décrites jusqu'ici. Il a été montré que la régulation de la flexibilité de cette région impacte l'activité de Plk1 et semble interagir avec la *T-loop*, inhibant la fonction kinase (Archambault et al., 2015; Xu et al., 2013).

Chez certaines espèces, comme par exemple chez *Trypanosoma brucei*, la séquence interdomaine comprend un motif de dégradation, appelé *Destruction box* (D-*box*). Cdc5 possède également un domaine de dégradation, mais celui-ci n'est pas situé dans la région interdomaine, comme nous allons le voir ci-après (Archambault et al., 2015; Hu et al., 2017).

1.2.5. Le domaine de dégradation

Cdc5 possède en tout trois motifs de dégradation en région N-terminale, tous ciblés par le système de dégradation ubiquitine-protéasome (Arnold et al., 2015; Charles et al., 1998; Cheng et al., 1998; Shirayama et al., 1998). Ces motifs sont composés de deux sites de destruction (D-*box*1 et D-*box*2) de la forme RXXL, conservés parmi les Plk, et d'un motif de destruction de type KEN-*box*, de séquence éponyme (Glotzer et al., 1991; Pfleger and Kirschner, 2000). L'ensemble du domaine de dégradation permet de contrôler la stabilité de Cdc5 et semble par ailleurs impliqué dans la régulation de sa localisation au noyau (Gonzalez-Arranz, 2021).

Les sites D-*box* et KEN-*box* sont tous des cibles du complexe promoteur de l'anaphase/cyclosome (APC/C) (Arnold et al., 2015; Charles et al., 1998). Ce complexe est une ubiquitine ligase E3 constituée de plusieurs sous-unités et conservée parmi les eucaryotes. Le complexe APC/C est activé d'une part par Cdc20 en métaphase, facilitant la séparation des chromatides sœurs par destruction de la sécurine, et d'autre part par Cdh1 en fin de mitose, favorisant la sortie de mitose et le maintien de l'activité d'APC/C pendant la phase G1 suivante (Kramer et al., 2000). Les substrats des activateurs d'APC/C présentent des signaux de reconnaissance spécifiques, dont les mieux décrits sont ceux des D-*box* et KEN-*box*, énoncés précédemment. Les D-*box* sont reconnues par APC/C^{Cdc20} ou par APC/C^{Cdh1} alors que la KEN-*box* ne peut être ubiquitinylée que par APC/C^{Cdh1} (Arnold et al., 2015; Lowery et al., 2005).

Les informations données ci-dessus proviennent d'un nombre restreint d'études sur la dégradation de Cdc5, que je vais détailler ici. La première étude (Charles et al., 1998), qui montre que la dégradation de Cdc5 *via* les D-*boxes* 1 et 2 dépend d'APC/C et de Cdh1, a été menée sur des cellules synchronisées en G1 grâce au facteur α . Dans ces cellules, Cdc5 est

surexprimée par induction au galactose d'un promoteur fort. Puis l'induction est stoppée et une diminution des niveaux protéiques de Cdc5 est observée en conditions sauvages, dégradation qui peut être empêchée en mutant le complexe APC/C (*cdc23-1* et *hct1-Δ1*) et les D-*boxes* 1 et 2 (*cdc5-db1,2*). Une autre étude (Arnold et al., 2015) a montré que la partie Nterminale – et plus précisément la KEN-*box* et la D-*box* – de Cdc5 est importante pour sa dégradation par le système APC/C-protéasome. Cette démonstration a été faite en mutant la partie N-terminale de Cdc5 et en observant la quantité de la protéine pendant 75 min, sur des cellules arrêtées en G1 par le facteur α également, après surexpression de Cdc5 de la même manière que décrite précédemment.

Les données dont nous disposons sur le mécanisme de dégradation de Cdc5 proviennent donc d'études sur des cellules arrêtées en G1 et surexprimant Cdc5. Nous montrerons dans l'article 2 que les voies de dégradation de Cdc5 arrêtées en G2/M en conditions de dommages à l'ADN dans des cellules présentant un niveau d'expression de Cdc5 non perturbé semblent différentes (Coutelier, Ilioaia, Le Peillet et al., 2021).



Figure 2. Structures de Cdc5. (A) Structure tridimensionnelle prédite par Alphafold. En violet : les hélices alpha ; en jaune : les feuillets bêta. Visualisation effectuée sur Visual Molecular Dynamics. Nous ne disposons pas de structure cristallographique de la protéine entière, probablement à cause des parties non structurées ou flexibles. Il ne faut donc pas accorder une trop grande confiance dans la représentation 3D de ces régions, à savoir l'extrémité N-terminale et la liaison interdomaine. (B) Structure primaire de Cdc5. Les mutations à l'origine des mutants *cdc5-T238A, cdc5-ad* et *cdc5-16* dont il sera mention dans ce manuscrit sont indiqués en bleu, violet et orange respectivement.

2. Rôles et localisations de Cdc5 au cours du cycle cellulaire



en conditions physiologiques

Figure 3. Fonctions et localisations de Cdc5, en bleu, au cours du cycle cellulaire. En beige est représentée la cellule en division. En rouge, ce qui a trait au dommage à l'ADN. Les rôles de Cdc5 sont complétés par une synthèse des événements moléculaires au cours du cycle cellulaire, en noir. Cette figure sert de référence pour l'ensemble des descriptions qui vont suivre.

2.1. Présentation du cycle cellulaire de *S. cerevisiae* et de ses régulations

2.1.1. Description générale des phases du cycle cellulaire

Le cycle cellulaire est un processus hautement ordonné qui entraîne la duplication et la transmission de l'information génétique d'une génération cellulaire à la suivante. Au cours de ce processus, l'ADN doit être répliqué avec précision et des copies identiques du génome doivent être distribuées aux deux cellules filles. Le cycle cellulaire est divisé en phases distinctes.

La phase gap 1 (G1) représente l'intervalle entre la mitose (M) et la synthèse d'ADN (S). Au cours de la phase G1 et en l'absence de conditions génétiques ou environnementales défavorables, la cellule est soumise à divers stimuli l'engageant de manière irréversible dans le cycle cellulaire (Hartwell, 1974). La cellule initie alors la synthèse de l'ADN en phase S. Une fois la phase S achevée, la cellule entre en phase gap 2 (G2), qui représente l'intervalle entre les phases S et M. La phase M, ou mitose, est caractérisée par la bipolarisation du MTOC, la ségrégation des chromatides sœurs et la division cellulaire. Elle est définie par plusieurs étapes successives que sont la prophase – condensation de l'ADN –, la métaphase – alignement des chromosomes sur le plan équatorial du SPB –, l'anaphase – séparation des chromatides sœurs – et la télophase – décondensation des chromosomes, répartition des organites et du cytosol dans les deux cellules filles et cytokinèse. La cytokinèse est un processus qui permet aux cellules eucaryotes ayant déjà subi la ségrégation de ses chromosomes de scinder en deux leur cytoplasme, permettant la constitution de deux cellules filles (Ewald, 2018; Hartwell, 1974; Limas and Cook, 2019).

La régulation du cycle cellulaire permet d'assurer l'achèvement correct de chaque phase du cycle avant le début de la suivante. Cette régulation passe par des mécanismes de contrôle, appelés *checkpoints*, qui permettent de surveiller l'intégrité du génome et de vérifier l'achèvement réussi des étapes précédentes avant d'enclencher les suivantes (Hartwell and Weinert, 1989). Ils sont placés en fin de phase G1 et à l'interface G2/M, contribuant à empêcher la division des cellules endommagées (Foiani et al., 2000).

La phase G0 fait référence à des cellules quiescentes, c'est-à-dire qu'elles ne prolifèrent plus et sont temporairement ou définitivement hors cycle. L'entrée en quiescence se fait en réponse à un manque de substances nutritives. La sortie de la phase GO est permise en réponse à des stimuli externes, et les cellules reprennent alors la progression de leur cycle cellulaire à partir de la phase G1. Cette phase ne concerne pas notre système d'étude et ne sera donc pas plus longuement abordée dans ce manuscrit.

2.1.2. Le cycle cellulaire chez S. cerevisiae

La levure bourgeonnante *S. cerevisiae* est un microorganisme unicellulaire capable de se diviser rapidement (~1h30). Plus précisément, la durée de la mitose est d'une cinquantaine de minutes et les phases G1, S et G2 durent, ensemble, 20 à 30 minutes en moyenne en conditions optimales de culture. *S. cerevisiae* se divise par bourgeonnement de la cellule fille sur la cellule mère (Brewer et al., 1984). La première étape de la cytokinèse est donc caractérisée par la formation d'un anneau de septine au niveau du *budneck*, de manière concomitante avec l'émergence du bourgeon cellulaire qui survient dès la phase S. Après le début de son bourgeonnement, la cellule fille croît ensuite en taille au cours du cycle cellulaire avant de se détacher de la cellule mère. Il a été montré que la cellule fille complète son premier cycle cellulaire un peu plus lentement que la cellule mère, en raison d'une phase G1 plus longue d'environ un quart d'heure et d'une phase G2 rallongée de quelques minutes également (Brewer et al., 1984).

Chaque étape du cycle cellulaire est finement régulée par des épisodes de phosphorylations et de déphosphorylations, décrits ci-après.

2.1.3. Les phosphorylations régulatrices du cycle cellulaire

La phosphorylation des protéines est la modification post-traductionnelle la plus répandue chez les eucaryotes. Elle est rapide et réversible et permet de moduler le rôle des protéines dans divers processus en impactant leur activité, leur localisation, leur temps de demi-vie et leur capacité à se lier à d'autres protéines. La phosphorylation des protéines est un mécanisme de contrôle particulièrement important dans la régulation des protéines clefs impliquées dans la progression du cycle cellulaire (Fraschini et al., 2012; Offley and Schmidt, 2019).

Le niveau de phosphorylation d'une protéine est régulé par les kinases et les phosphatases, qui représentent ensemble 3% des protéines totales chez *S. cerevisiae* (Fraschini et al., 2012). Les kinases, au nombre de 130 réparties en 62 sous-familles chez *S.*

cerevisiae, catalysent le transfert du phosphate terminal de l'ATP sur le groupe hydroxyle d'un résidu S, T et dans une bien moindre mesure sur un résidu Y (Hanks, 1991; Manning et al., 2002). Les kinases sont elles-mêmes majoritairement activées par des phosphorylations.

Les kinases cycline-dépendantes (Cdk) sont les régulatrices principales du cycle cellulaire. Cdk1 en particulier est le moteur de la progression du cycle cellulaire. L'activité de Cdk1 est régulée par sa liaison avec des cyclines – des protéines qui se lient aux Cdk et en modulent l'activité – et par son propre état de phosphorylation.

À la fin de la phase G1, une régulation métabolique contrôle le point de non-retour qui détermine l'entrée des cellules dans le cycle cellulaire. Ce point de non-retour, appelé Start, consiste en un changement moléculaire menant à l'engagement irréversible des cellules dans la phase S et la division cellulaire (Cross and Meizel, 1989). Au point Start, la Cdk Cdc28 coopère avec la cycline Cln3 et inactive Whi5 par phosphorylation (Costanzo et al., 2004). Whi5 est un inhibiteur de l'entrée dans le cycle cellulaire. Son inhibition favorise donc l'entrée dans le cycle cellulaire (Ewald, 2018). Au moment de la transition G1/S, la taille des cellules augmente grâce à l'activation d'une protéine kinase A (PKA) qui régule négativement l'inhibiteur de croissance Cln1 via la phosphorylation de la kinase inhibitrice de mitose Swe1 (Amigoni et al., 2015). Toujours en coopération avec Cln3, Cdk1 phosphoryle la sous-unité Rpb1 de l'ARN polymérase II ADN-dépendante, augmentant la transcription de gènes régulateurs de l'entrée dans le cycle cellulaire (Kõivomägi et al., 2021). Par ailleurs, au cours de la phase S, lorsque la formation du nouveau bourgeon cellulaire est réussie, la kinase Swe1 est recrutée au budneck en formation grâce à son interaction avec les régulateurs Hsl1 et Hsl7. Cette localisation est nécessaire pour permettre à Swe1 d'être multiphosphorylée, notamment par Cdc5 (Lee et al., 2005). La forme multiphosphorylée de Swe1 conduit à son ubiquitinylation et à sa dégradation par le protéasome, permettant ainsi l'entrée en mitose (Fraschini et al., 2012).

En phase G2, la protéine kinase Swe1 inhibe le complexe CDK en le phosphorylant au niveau de sa sous-unité catalytique constituée de la kinase Cdc28. Cet événement bloque d'une part l'orientation de la croissance du bourgeon cellulaire et d'autre part la division du noyau (Booher et al., 1993). La régulation complexe de Swe1 en phases G1 et G2 illustre la diversité d'impact des phosphorylations dans la localisation des protéines, leur activité et les interactions qu'elles ont avec des ubiquitines ligases qui déclenchent leur dégradation.

Les mécanismes de phosphorylations jouent aussi un rôle important en sortie de mitose et lors de la cytokinèse, événements contrôlés par une cascade de kinases. Cdc5 fait partie des kinases clefs de ces processus, en permettant l'activation de la phosphatase Cdc14 via les voies FEAR et MEN (processus détaillés en partie 3.6.1). La kinase Ipl1 est elle aussi impliquée dans la ségrégation des chromosomes et la cytokinèse en phosphorylant l'histone H3, permettant ainsi de réguler la condensation des chromosomes (Hsu et al., 2000). La kinase Cdc15, quant à elle, favorise la sortie de mitose en phosphorylant le complexe kinase Dbf2-Mob1, ce qui active la S/T kinase Dbf2 (Mah et al., 2001). Dbf2-Mob1 phosphoryle la protéine de cytokinèse Cyk3 qui est ensuite recrutée au budneck et qui contribue à la cytokinèse, en association avec Hof1 (Korinek et al., 2000), une protéine phosphorylée par Cdc5 et par Dbf2-Mob1. La phosphorylation de Hof1 provoque sa libération de l'anneau de septine et sa relocalisation au cytoplasme (Meitinger et al., 2011). Dbf2 phosphoryle aussi la chitine kinase Chs2, impliquée dans la formation d'une cloison primaire entre la cellule mère et la cellule fille lors de la cytokinèse chez S. cerevisiae (Oh et al., 2012; Veinot-Drebot et al., 1991). Avant cette étape, Chs2 est retenue au réticulum endoplasmique grâce à sa phosphorylation par Cdc28-Clb2 au niveau de son extrémité N-terminale exposée dans le cytoplasme (Chin et al., 2012).

Nous venons de présenter le rôle des kinases dans les phosphorylations régulatrices du cycle cellulaire. Mais le statut de phosphorylation d'une protéine ne dépend pas seulement de sa capacité à être phosphorylée : il est aussi déterminé par sa capacité à être déphosphorylée.

*

2.1.4. Les déphosphorylations régulatrices du cycle cellulaire

Les phosphatases catalysent la réaction inverse à celle des kinases en hydrolysant la liaison phosphoester, ce qui libère le groupement phosphate. Les phosphatases sont régulées par leur liaison à des cofacteurs : cette interaction forme un complexe actif alliant une sousunité catalytique à une sous-unité régulatrice (Fraschini et al., 2012; Rubenstein and Schmidt, 2007). Certaines déphosphorylations permettent l'activation des protéines, tandis que d'autres les inactivent. Le génome de *S. cerevisiae* code pour au moins 43 phosphatases, issues de cinq groupes évolutifs différents (Offley and Schmidt, 2019). Le nombre de phosphatases est trois fois plus faible que le nombre de kinases, et pourtant elles sont, elles aussi, impliquées
dans toutes les étapes du cycle cellulaire. Les phosphatases sont en effet reconnues pour être moins spécifiques que les kinases, chaque phosphatase pouvant ainsi reconnaître une plus grande variété de substrats que les kinases (De Munter et al., 2013).

La phosphatase Cdc14, de la famille des phosphotyrosines phosphatases (PTP), compte 455 substrats potentiels (Kao et al., 2014) et est considérée comme l'acteur principal des déphosphorylations en sortie de mitose chez *S. cerevisiae*. Nous détaillerons son rôle dans les voies de sortie de mitose FEAR et MEN dans la partie 2.2.4.3. Par ailleurs, Cdc14 est aussi impliquée dans un grand nombre d'autres processus cellulaires, dont la ségrégation des chromosomes, l'induction de l'autophagie, la cytokinèse, la duplication des SPB et leur stabilité pendant la réparation de l'ADN (Offley and Schmidt, 2019).

Cdc14 est activée par la voie FEAR à chaque cycle cellulaire après le début de l'anaphase, grâce à APC/C^{Cdc20} qui ubiquitine la sécurine qui se dégrade alors et permet le clivage de la cohésine qui maintient les chromatides sœurs ensemble, et l'entrée en anaphase. Cette activation initie le début de la baisse d'activité du complexe CDK. Puis Cdc14 subit une seconde vague d'activation, notamment permise par Cdc5, et qui accélère fortement l'inhibition de CDK. Au moment de la cytokinèse, et grâce à son relargage complet dans le cytosol, Cdc14 déphosphoryle nombre de substrats du complexe CDK et déclenche ainsi la dernière vague d'événements métaboliques conduisant à l'inactivation complète de CDK (Visintin et al., 2003). Cette inactivation est essentielle à la sortie de mitose et à l'entrée dans une nouvelle phase G1 (Machín et al., 2016; Stegmeier and Amon, 2004).

La protéine phosphatase 2A (PP2A) joue un rôle prépondérant dans la progression de la mitose. PP2A est constituée des sous-unités structurales (Tpd3), catalytiques (Pph21 et Pph22) et régulatrices Rts3, Cdc55 et Rts1, dont les trois dernières sont mutuellement exclusives (Zhao et al., 1997). PP2A^{Cdc55}, PP2A^{Rts1} et Cdc14 agissent à la fois de manière redondante et complémentaire (Touati et al., 2019). En fin de mitose, Cdc14 déphosphoryle l'extrémité N-terminale de Chs2, permettant la translocation de Chs2 dans l'appareil de Golgi puis dans la membrane plasmique au niveau du *budneck*. Là, Chs2 est déphosphorylée par PP2A^{Cdc55}, favorisant la contraction de l'anneau de septine (Moyano-Rodríguez et al., 2022). PP2A^{Rts1} contribue quant à elle à la régulation de la taille des cellules au moment de la transition entre les phases G1 et S, à la biorientation des chromosomes en mitose et est impliquée dans la réorganisation de l'anneau de septine (Dobbelaere et al., 2003; Peplowska et al., 2014; Zapata et al., 2014).

La progression du cycle cellulaire est aussi permise par la phosphatase Mih1 de la famille des PTP, qui active la sous-unité Cdc28 du complexe CDK en supprimant la phosphorylation opérée par Swe1 sur Cdc28 décrite précédemment (Fraschini et al., 2012).

D'autre part, la protéine phosphatase 1, Glc7, essentielle et appartenant à la famille des phosphoprotéines phosphatases (PPP), est, elle aussi, impliquée dans une myriade de processus cellulaires dont l'activation complète du SPOC (voir partie 2.3.1) par déphosphorylation de Bfa1 (Kocakaplan et al., 2021).

*

L'action des kinases est contrecarrée par les phosphatases et ces deux contrôles sont essentiels à la régulation de l'état de phosphorylation des protéines cibles. L'ensemble des étapes de phosphorylations et de déphosphorylations participe au déroulement correct de la division cellulaire. Dans nos recherches sur le rôle de Cdc5 dans le processus d'adaptation (décrit en partie 4), nous adressons l'impact potentiel des phosphorylations encore inconnues de Cdc5 (voir l'article 1 de ce manuscrit).

2.2. Les rôles de Cdc5 dans le cycle cellulaire associés à ses changements de localisations et de niveaux d'expression

Cdc5 est une protéine fortement dynamique, ce qui lui permet d'entrer en contact avec ses nombreux substrats et d'assurer ainsi ses multiples fonctions tout au long du cycle cellulaire. L'expression de Cdc5 atteint son sommet en fin de phase G2 et au cours de la mitose, puis décroît jusqu'à la phase G1 où Cdc5 n'est plus exprimée.

2.2.1. Cdc5 est dégradée en fin de mitose, permettant l'entrée en G1

À la fin de la division cellulaire, les voies de sortie de mitose (FEAR et MEN) sont éteintes. Ce mécanisme d'extinction est permis par Cdc14 qui active le complexe APC/C^{Cdh1}, dont la sous-unité Cdh1 cible alors les domaines KEN-*box* et D-*box* de Cdc5, provoquant la dégradation de Cdc5 au protéasome (Arnold et al., 2015; Botchkarev and Haber, 2018; Charles et al., 1998; Pfleger and Kirschner, 2000). La dégradation de Cdc5 survient après l'achèvement de la cytokinèse et promeut l'entrée en G1.

Plk1 présente un mécanisme similaire de dégradation : sa quantité protéique revient à un niveau basal en G1 grâce au ciblage de sa D-*box* par le complexe APC/C. La dégradation de Plk1 bloque la phosphorylation de la protéine centrosomale Cep55 par Plk1, ce qui permet à Cep55 de promouvoir l'abscission des deux cellules filles au moment de la cytokinèse (Iliaki et al., 2021).

2.2.2. Cdc5 permet le maintien de l'intégrité du fuseau mitotique en phase S

L'expression de Cdc5 commence à augmenter dès l'entrée dans la phase S (Cheng et al., 1998). En conditions normales, Cdc28 et Cdc5 phosphorylent un certain nombre de substrats permettant de maintenir le complexe APC/C^{Cdh1} inactif jusqu'en anaphase tardive, ce qui n'est pas le cas de APC/C^{Cdc20} qui est actif durant cette phase (Liakopoulos, 2021). Cette action favorise l'accumulation de facteurs associés au fuseau mitotique, autrement dégradé par APC/C^{Cdh1} : Cin8, Ase1 et Kip1 (Gordon and Roof, 2001; Hildebrandt and Hoyt, 2001; Hoyt et al., 1992; Juang et al., 1997).

Lorsque le *checkpoint* de la phase S est activé, Cdc28 est phosphorylée et inactivée par Swe1, levant son inhibition sur APC/C^{Cdh1}, tandis que Cdc5 au contraire inactive APC/C^{Cdh1} en se liant à Cdh1 (Crasta et al., 2006; Sanchez et al., 1999; Sorger and Murray, 1992; Zhang et al., 2009). Le complexe APC/C^{Cdh1} est donc maintenu dans un état partiellement activé, ce qui limite l'accumulation de Cin8, Ase1 et Kip1 associés au fuseau mitotique (Liakopoulos, 2021; Zhang et al., 2009). Par ce mécanisme, le *checkpoint* de la phase S permet d'empêcher la survenue intempestive de la séparation des SPB jusqu'en fin d'anaphase.

2.2.3. La localisation de Cdc5 au noyau en phase G2/M permet de déclencher l'entrée en mitose

La ségrégation des chromosomes au cours de la mitose est étroitement contrôlée par un ensemble de protéines. Parmi elles, Cdc5 joue un rôle crucial dans ce processus. En G2/M, Cdc5 est localisée au noyau, une importation régulée par les voies TORC1 (voir partie 4.2.2) et PP2A *via* sa séquence signal de localisation au noyau, et représente un des événements clef de l'entrée en mitose (Nakashima et al., 2008; Rincón and Monje-Casas, 2020) (Fig.4). Malgré ces éléments, le mécanisme exact permettant le recrutement de Cdc5 au noyau n'est pas encore très bien défini. Des études sur d'autres organismes donnent des pistes supplémentaires sur les mécanismes par lesquels Cdc5 pourrait être recruté au noyau, processus non encore incomplètement caractérisé. Par exemple, chez *D. melanogaster*, la phosphorylation de Polo est nécessaire à son importation dans le noyau *via* son signal de localisation nucléaire. Par ailleurs, la structure cristalline de Plk1, résolue chez *D. rerio*, montre que la phosphorylation permet un changement de conformation, exposant la séquence signal de localisation nucléaire (Kachaner et al., 2017; Pintard and Archambault, 2018; Xu et al., 2013).

Juste après la duplication des SPB, Cdc5 reste dans le noyau et s'accumule sur la partie nucléaire des SPB grâce à son interaction avec les protéines Spc110 – de la plaque interne des SPB –, Slk19, Cse4 et Tid3 – protéines du kinétochore –, ainsi que grâce à Csa1 (Botchkarev et al., 2017; Örd et al., 2020). En plus de sa localisation aux SPB, Cdc5 semble s'accumuler aussi au niveau du *budneck* bien que de manière moins prononcée : l'anneau de septine sert de plateforme permettant à Cdc5, mais aussi à Cla4 - une kinase impliquée dans la formation de l'anneau de septine - de phosphoryler Swe1, favorisant le démarrage correct de la mitose (Asano et al., 2005; Sakchaisri et al., 2004; Song et al., 2000) (Fig. 4).

En ce qui concerne Plk1, elle est maintenue inactive jusqu'à ce que la cycline B/Cdk1 phosphoryle Bora, permettant ensuite à Aurora A d'activer Plk1 (Joukov and De Nicolo, 2018). Une fois activée, Plk1 active à son tour Cdk1 et phosphoryle Myt1, inhibant son activité kinase en G2/M. Cette inhibition contribue à l'activation des kinases mitotiques conduisant à l'entrée en mitose. En parallèle, Plk1 phosphoryle la phosphatase Cdc25C, responsable de l'activation du complexe Cycline B1/CDK. Ce complexe promeut la localisation nucléaire de Cdc25C au moment de la transition G2/M. De plus, Plk1 phosphoryle la Cycline B1, permettant la translocation de cette dernière au noyau. Ces étapes conduisent à l'activation du complexe Cycline B1/Cdk1 et à l'entrée en mitose (Liu et al., 2019). Bien que nécessaire à l'assemblage et au fonctionnement correct des fuseaux mitotiques, Plk1 n'est pas essentielle à l'entrée en mitose ni à l'activation d'APC/C (Sumara et al., 2004). Il semble néanmoins que l'interaction entre la déubiquitinase Cyld et Plk1 soit requise dans l'entrée en mitose au moment opportun (Iliaki et al., 2021).

À l'instar du rôle de Cdc5 aux SPB, Plk1 joue un rôle clef au MTOC. Après duplication des centrosomes, Plk1 permet leur séparation en phosphorylant les protéines impliquées dans ce processus, telles que la kinésine EG5 et la kinase Mst2 (Mardin et al., 2011). Puis Plk1 est recrutée aux centrosomes grâce à Aurora A et à d'autres substrats de Plk1, permettant la maturation des centrosomes (Iliaki et al., 2021).

2.2.4. Les fonctions de Cdc5 au cours de la mitose

Cdc5 est impliquée dans de multiples mécanismes moléculaires au cours de la mitose et cible un grand nombre de substrats différents, permettant la progression du cycle cellulaire.

2.2.4.1. Les rôles de Cdc5 dans l'entrée en prophase

Comme mentionné précédemment, Cdc5 permet le recrutement de Swe1 au *budneck* en toute fin de G2. De manière plus détaillée, deux voies sont impliquées dans la régulation de l'entrée en mitose par Cdc5.

D'une part, Cdc5 phosphoryle Swe1, provoquant sa dégradation par ubiquitinylation (Asano et al., 2005). Une fois dégradée, Swe1 ne peut donc plus maintenir Cdk1 phosphorylée, qui peut alors être déphosphorylée par la phosphatase Mih1, permettant à Cdk1 d'interagir avec la cycline Clb2. Cette interaction provoque l'entrée en mitose (Russell et al., 1989).

Page | 40

D'autre part, Cdc5 phosphoryle Ndd1, permettant de réguler le complexe facteur de transcription Mcm1-Fkh2-Ndd1 requis pour l'expression du cluster de gènes mitotiques *CLB2*, dont fait partie le gène codant pour Clb2 citée précédemment, mais aussi *CDC5*, créant ainsi une boucle rétroactive positive (Darieva et al., 2006; Edenberg et al., 2014; Spellman et al., 1998; Yelamanchi et al., 2014) (Fig. 4). Grâce à l'activation de la transcription du cluster *CLB2*, Cdc5 favorise l'entrée en mitose.

2.2.4.2. Les rôles de Cdc5 en métaphase

La cohésion des chromatides sœurs, que ce soit au cours de la mitose ou de la méiose, requiert l'action de la cohésine, un complexe composé de l'hétérodimère Smc1-Smc3, protéines liées entre-elles par la sous-unité Scc1 et par la sous-unité associée Scc3. La cohésine se forme au niveau des chromosomes en début de phase S grâce à l'action de Scc2 et Scc4.

Au cours de la métaphase, Cdc5 s'associe aux centromères et facilite l'élimination de la cohésine associée au centrosome. Cdc5 phosphoryle la sous-unité de la cohésine Scc1, permettant le clivage et l'élimination de la cohésine par la séparase Esp1 (Alexandru et al., 2001; Mishra et al., 2019).

D'autre part, les centromères sont constitués d'un variant spécifique de l'histone H3, Cse4. Cse4 semble interagir avec le PBD de Cdc5. Cette interaction est impliquée dans la ségrégation des chromosomes. L'association régulée de Cse4 et Cdc5 est essentielle à la viabilité cellulaire et est proposée comme modèle d'élimination de la cohésine au niveau des centromères en empêchant le recrutement de la protéine du kinétochore Mif2 et de la cohésine Scc1 à l'ADN centromérique (Mishra et al., 2016, 2019).

L'ensemble des actions de Cdc5 au cours de la métaphase converge vers la dégradation de la cohésine, favorisant la séparation des chromatides sœurs au cours de l'anaphase.

2.2.4.3. Les rôles de Cdc5 en anaphase et dans la sortie de mitose

Cdc5 joue des rôles très divers au cours de l'anaphase. En milieu d'anaphase, Cdc5 est recrutée au niveau de l'ADN ribosomal et des centromères par la cohésine, favorisant la liaison de Cdc5 à la condensine. Cdc5 phosphoryle alors les sous-unités régulatrices Brn1, Ycg1 et Ycs4 de la condensine, permettant ainsi la stimulation de la condensine et le maintien de la condensation des chromosomes jusqu'à la fin de la mitose (Lamothe et al., 2020; Robellet et al., 2015). D'autre part Cdc5 empêche la duplication des SPB de survenir plus d'une fois par cycle cellulaire en phosphorylant Sfi1, un composant essentiel de la liaison entre les deux SPB dupliqués (Elserafy et al., 2014).

Pendant l'anaphase se mettent aussi en place les mécanismes de sortie de mitose. Cdc5 est impliquée dans la sortie de mitose par le biais de deux voies : la voie de libération en anaphase précoce de Cdc14 appelée le FEAR (*Cdc Fourteen Early Anaphase Release*) et le réseau de sortie de mitose appelé le MEN (*Mitotic Exit Network*) (Stegmeier and Amon, 2004; Visintin et al., 1999). Ces deux mécanismes mènent au relargage de Cdc14 du nucléole et à son activation.

Tout au long du cycle cellulaire, Cdc14 est séquestrée dans le nucléole par sa liaison avec la protéine Net1, qui l'empêche d'accéder à ses différents substrats, tant dans le noyau que dans le cytoplasme (Stegmeier and Amon, 2004; Visintin et al., 1999) (Fig. 3). Lorsque la cellule entre en anaphase, la voie FEAR permet la phosphorylation de Net1 par les kinases mitotiques Cdk-Clb2 et par Cdc5 (Azzam, 2004; Rodriguez-Rodriguez, 2016; Yoshida, 2002). Jusqu'au début de l'anaphase, la phosphorylation de Net1 était contrecarrée par PP2A^{Cdc55} qui est alors inhibée à ce moment du cycle par Cdk1-Clb2. Le complexe Cdk1-Clb2 phosphoryle la sous-unité régulatrice Cdc55 de façon dépendante de la séparase Esp1 et de Zds1. La forme phosphorylée de Net1 présente une faible affinité pour Cdc14, permettant la libération de Cdc14, d'abord dans le nucléole en début d'anaphase (Queralt et al., 2006). Cette libération n'est que transitoire et n'est pas essentielle à la sortie de mitose, mais est cruciale dans l'exécution de plusieurs mécanismes de l'anaphase tels que la ségrégation du nucléole (D'Amours et al., 2004; Sullivan et al., 2004). La libération de Cdc14 permet en outre l'activation du MEN en contribuant à l'inhibition du complexe CDK.

L'activation du MEN est primordiale au maintien de Cdc14 hors du nucléole : si le MEN ne s'opère pas, Cdc14 retourne dans le nucléole. L'activation de Cdc14 par la voie MEN s'opère en parallèle de la voie FEAR, *via* une cascade de signalisation pilotée par des GTPases et associée aux centrosomes (Fig. 3). La voie MEN régule la sortie de mitose, permet le contrôle de l'orientation du fuseau et promeut la cytokinèse chez *S. cerevisiae* (Yolanda and Krajaejun, 2020). En anaphase tardive, le MEN permet une libération plus soutenue et complète de Cdc14 hors du nucléole, entraînant la sortie de mitose. La voie MEN détecte deux événements



du cycle cellulaire : la position du fuseau grâce à la GTPase Tem1 et les signaux de progression du cycle cellulaire *via* les kinases en aval, Cdc15 et Dbf2-Mob1 (Hu et al., 2001). L'activation du MEN dépend du premier élément de la cascade de signalisation, Tem1. Lors d'un cycle cellulaire normal, Tem1 est maintenue inactive par le dimère

Figure 4. Rôles de Cdc5 dans la régulation du FEAR et du MEN (d'après Botchkarev and Haber, 2018).

Bub2-Bfa1, inhibiteur de la voie MEN (Fig. 4). Bub2-Bfa1 est quant à lui maintenu actif grâce à PP2A^{Cdc55} qui déphosphoryle Bfa1 en métaphase. Lorsque les cellules parviennent à l'anaphase avec un alignement correct du fuseau mitotique, Cdc5 inactive le complexe Bfa1-Bub2 en phosphorylant la sous-unité Bfa1 (Hu et al., 2001). L'inhibition de Bfa1-Bub2 lève l'inactivation de Tem1 (Geymonat et al., 2003). Tem1 peut alors être activée par le facteur d'échange de guanine Lte1, présent dans la cellule fille (Bardin and Amon, 2001). Tem1 activée cible ensuite la kinase Cdc15, elle-même activée grâce au relargage de Cdc14 dans le noyau par la voie FEAR, lui permettant de déphosphoryler Cdc15. L'interaction de Tem1 avec Cdc15 permet le recrutement de Cdc15 aux SPB (Rock and Amon, 2011). Cdc15 active ensuite Dbf2-Mob1 en deux étapes successives. D'abord Cdc15 phosphoryle Nud1, un composant central de la plaque externe des SPB. Cette phosphorylation crée un site d'arrimage de Dbf2-Mob1 sur Nud1, qui facilite ensuite l'activation de Dbf2-Mob1 par Cdc15 (Mah et al., 2001; Rock and Amon, 2011). Par ailleurs, Dbf2-Mob1 est activé par la déphosphorylation de Mob1, elle-même rendue possible par l'inactivation de Cdk1, le relargage de Cdc14 du nucléole et la réactivation de PP2A^{Cdc55}. Dbf2-Mob1 phosphoryle ensuite la séquence signal de localisation au noyau de Cdc14, permettant le relargage complet de Cdc14 vers le cytoplasme (Mohl et al., 2009). Parallèlement, Cdc14 déphosphoryle et active Bfa1-Bub1, assurant ainsi l'inactivation du MEN jusqu'au prochain cycle (Pereira et al., 2002) (Fig. 3).

Cdc5 contribue donc au FEAR en phosphorylant Net1 et au MEN en phosphorylant Bfa1, permettant la libération de Cdc14 et l'activation subséquente de Cdc15 (Manzano-López and Monje-Casas, 2020; Rock and Amon, 2011) (Fig.4). Par ailleurs, Cdc5 est ciblée au cytoplasme par Cdc14 qui libère Cdc5 de sa localisation Bfa1-dépendante aux SPB, favorisant la sortie de mitose (Botchkarev et al., 2017).

En anaphase tardive, Plk1 dégrade Emi1, l'inhibiteur du complexe APC/C, via le protéasome, permettant l'activation de ce complexe (Hansen et al., 2004). Comme Cdh1 est phosphorylée par Cdk1 à ce moment du cycle cellulaire, Cdh1 se détache du complexe APC/C. Au lieu du cofacteur Cdh1, c'est le cofacteur Cdc20 qui est capable de se lier à APC/C grâce à un changement de conformation par phosphorylation dépendante de Cdk1 et de la cycline B, formant ainsi le complexe APC/C^{Cdc20} (Mitra et al., 2006; Sørensen et al., 2001). L'expression de la cycline B se poursuit jusqu'à ce que le checkpoint de l'assemblage du fuseau mitotique (SAC) soit désactivé. Le SAC est une cascade de signalisation permettant de vérifier la liaison correcte des fuseaux mitotiques aux kinétochores des chromatides et de retarder la transition vers l'anaphase si des erreurs sont détectées. Dans cette étape, Plk1 se coordonne avec un certain nombre d'autres kinases mitotiques – dont Aurora B, Mps1, Bub1, BubR1 –, dont certaines sont elles-mêmes substrats de Plk1. L'expression de la cycline B est ensuite inhibée par APC/C^{Cdc20} (Holder et al., 2019; Kim and Goshima, 2022).

2.2.4.4. Les rôles de Cdc5 dans la cytokinèse

La cytokinèse conclut l'étape de la mitose et mène à la formation de deux cellules filles. Une partie de Cdc5 est localisée au futur site de la cytokinèse, au niveau du *budneck*, dès la fin de la phase G2, ce qui indique son rôle dans la formation de structures aboutissant à la cytokinèse (Sakchaisri et al., 2004).

Cdc5 permet le recrutement et l'activation des facteurs d'échange de guanine Tus1 et Rom2, qui vont à leur tour induire le recrutement et l'activation de la GTPase Rho1 au niveau du *budneck* (Yoshida 2006). Rho1 régule l'assemblage de l'anneau d'actine contractile (CAR) en favorisant la polymérisation de l'actine au niveau du *budneck* (Tolliday et al., 2002).

Cdc5 promeut aussi la cytokinèse *via* son domaine PB en régulant négativement – probablement par l'interaction potentielle de Cdc5 avec Bem2 et 3 – la GTPase Cdc42, qui contrôle la polarité des cellules. Par ailleurs, Cdc5 est délocalisée du *budneck* juste avant la contraction de l'anneau de septine (Botchkarev and Haber, 2018; Snead et al., 2007).

Cdc5 contribue donc à réguler la cytokinèse, et son PBD joue un rôle essentiel dans cet événement.

*

L'inhibition de Plk1 en anaphase empêche la cytokinèse, mais aussi l'accumulation de la GTPase RhoA en zone médiane entre les deux cellules filles. Comme RhoA est impliquée dans la formation de l'anneau contractile, son défaut de localisation empêche la constitution de l'anneau contractile (Iliaki et al., 2021). Plk1 phosphoryle le *centralspindlin complex*, un complexe impliqué dans pratiquement toutes les étapes de la cytokinèse. Cette interaction avec Plk1 est favorisée par le recrutement de Plk1 au niveau de la zone médiane grâce à l'interaction de son PBD avec plusieurs protéines de cette zone. De plus, Plk1 se lie à la protéine associée aux microtubules, PRC1, permettant le recrutement de Plk1 aux kinétochores (Iliaki et al., 2021).

2.2.4.5. Le maintien de la forme du noyau tout au long de la mitose

Cdc5 joue un rôle dans la forme du noyau des cellules pendant la division mitotique (Walters et al., 2014). Au moment de la mitose, l'enveloppe nucléaire s'étend grâce à Cdc5 et à trois autres protéines, Fsa1, Fsa2 et Acc1, et cette expansion est exagérée près du nucléole lors d'un arrêt du cycle cellulaire.

2.2.5. Les fonctions de Cdc5 au cours de la méiose

La méiose est un cycle cellulaire spécialisée durant laquelle deux divisions cellulaires se succèdent sans réplication intermédiaire de l'ADN. Cdc5 joue un rôle central dans la ségrégation des chromosomes de la méiose I, phase au cours de laquelle elle joue plusieurs rôles et phosphoryle des substrats spécifiques de cette phase, tels que décrits ci-après.

2.2.5.1. Cdc5 favorise les *crossing-overs* et la co-orientation des kinétochores en prophase I

En milieu de prophase I, le facteur de transcription Ndt80 induit l'expression de Cdc5. Cdc5 régule la recombinaison entre les chromosomes (Lee et al., 2003; Sanchez et al., 2020). Plus précisément, Cdc5 favorise l'activation du complexe MutLy qui possède une activité endonucléase impliquée dans les mécanismes de brassage génétique spécifique de la méiose, appelé enjambements, ou *crossing-overs* (Kulkarni et al., 2020). Il a été montré que le rôle de MutLy dans la formation de *crossing-overs* dépend de Cdc5, recrutée au niveau du complexe Exo1-MutLy *via* son interaction directe avec Exo1 (Sanchez et al., 2020). Les *crossing-overs* sont favorisés par le maintien des chromosomes homologues ensemble par le complexe synaptonémal. Ce complexe sera dégradé en métaphase de manière dépendante de Cdc5 (partie 2.2.5.3).

La fréquence de *crossing-overs* augmente en fin de prophase I. À ce moment du cycle, les chromosomes homologues se chevauchent, ce qui crée une proximité favorable aux *crossing-overs*. Cdc5 active par ailleurs le complexe endonucléase hétérodimérique Mus81-Mms4 en phosphorylant Mms4 (Talhaoui et al., 2016). Ce faisant, Cdc5 contribue à la formation de *crossing-overs* (Sanchez et al., 2020).

D'autre part, toujours en fin de prophase I, mais aussi en métaphase I, Cdc5 permet l'attachement des kinétochores des chromatides sœurs aux microtubules émanant du même SPB (on parle de co-orientation des kinétochores), en recrutant des composants du complexe de co-orientation au niveau des kinétochores (Hinshaw and Harrison, 2018). Les détails de l'implication de Cdc5 dans la co-orientation des kinétochores sont donnés ci-après.

2.2.5.2. Cdc5 déstabilise la cohésine en métaphase I

En l'absence de Cdc5, les kinétochores sont biorientés au lieu d'être co-orientés pendant la méiose I (Miller et al., 2013). En effet, Cdc5 est nécessaire au recrutement de Mam1 et de Lrs4, qui participent à la formation du complexe de co-orientation et se lient aux kinétochores. Le phénomène de co-orientation des kinétochores est couplé à la ségrégation des chromosomes en méiose I, puisque ces deux processus présentent une dépendance partagée à Cdc5.

En fin de métaphase I, Cdc5 phosphoryle la sous-unité Rec8 de la cohésine, provoquant le clivage protéolytique de celle-ci (Attner et al., 2013; Lee et al., 2003). Cdc5 contribue ainsi à la déstabilisation de la cohésine et donc à la séparation des chromosomes homologues en début d'anaphase I. La phosphorylation de Rec8 en méiose II n'est cependant pas requise pour la séparation des chromatides sœurs, et Cdc5 n'a donc pas de rôle équivalent à jouer à cette étape de la méiose II (Attner et al., 2013).

La sous-unité Rec8 de la cohésine rassemble les deux chromatides sœurs. Pendant la prophase 1, Cdc5 et le complexe kinase Dbf4-Cdc7 phosphorylent Rad61 et Rec8, ce qui

favoriserait le détachement de Rec8 et Scc3 des chromosomes et le clivage protéolytique de Rec8 par la séparase (Botchkarev et al., 2017; Challa et al., 2019).

Lorsque les cellules entrent en métaphase I, le complexe synaptonémal est dégradé, favorisant la ségrégation subséquente des chromosomes homologues. Cdc5 joue un rôle important dans la dissociation du complexe synaptonémal en phosphorylant Dbf4, la sousunité régulatrice du complexe DDK (*Dbf4-dependent Cdc7 kinase*), qui peut alors se lier directement au complexe synaptonémal et (Argunhan et al., 2017; Matos et al., 2008).

2.2.5.3. Cdc5 favorise le clivage de la cohésine en anaphase I et permet la sortie de méiose I

En anaphase I, Cdc5 promeut là aussi la libération de Cdc14, jusqu'ici retenue par Net1 dans le nucléole, et requise pour le démantèlement du SPB et la sortie de méiose I par la voie FEAR. Durant cette même phase, Cdc5 contrôle l'élimination de la cohésine de plusieurs manières. D'une part, en fin de prophase I, Rad61 favorise le clivage et le relargage de la cohésine. La sous-unité Scc1 de la cohésine interagit en plus avec des protéines essentielles : Scc3 (interaction directe) et Pds5 et Smc3 (interaction indirecte *via* Wpl1) (Litwin et al., 2018). L'action de Rad61 sur la cohésine requiert des phosphorylations spécifiques de la méiose : Rad61 et Rec8 sont phosphorylées par la kinase Cdc7 associée à Dbf4 et par Cdc5.

La voie FEAR, dans laquelle Cdc5 est impliquée, a été rapportée comme jouant également un rôle essentiel dans la sortie de méiose I (Attner et al., 2013).

2.2.5.4. Cdc5 déclenche la séparation des chromatides sœurs et la sortie de méiose II

Les fonctions assurées par Cdc5 en fin de méiose I permettent la préparation de la séparation des chromatides sœurs en méiose II. Spo13, une protéine spécifique de la méiose I, empêche la suppression de la cohésine et permet la co-orientation des kinétochores. En fin de méiose I, Cdc5 déclenche la dégradation de Spo13, contribuant au démantèlement de la cohésine et à la séparation des chromatides sœurs lors de la méiose II (Attner et al., 2013; Challa et al., 2019).

D'autre part, Cdc5 favorise la sortie de méiose II en permettant le relargage de Cdc14 par les mécanismes précédemment décrits, mais ce phénomène n'est pas indispensable à la sortie de méiose II (Attner et al., 2013).

2.3. Les rôles de Cdc5 dans les différents *checkpoints* de sortie

de mitose

Chez *S. cerevisiae*, les principaux points de contrôle mitotiques sont le *checkpoint* de l'assemblage du fuseau (SAC) déclenché par les kinétochores non attachés en début d'anaphase, le *checkpoint* de la position du fuseau (SPOC) déclenché par un mauvais alignement du fuseau mitotique et qui retarde la sortie de mitose, et le *checkpoint* de dommage à l'ADN qui bloque les cellules en G2/M.

Le SAC, le SPOC et le *checkpoint* de dommage à l'ADN sont activés par des signaux différents et agissent à des stades distincts du cycle cellulaire. Pourtant, tous dépendent de la capacité de Bfa1 et de Bub2 à inactiver le MEN, indiquant que la régulation correcte du MEN joue un rôle déterminant dans le maintien de l'intégrité du génome (Baro et al., 2017). Pour ces trois *checkpoints*, la phosphorylation inhibitrice de Bfa1 par Cdc5 est un événement clef qui doit être empêché pour bloquer le MEN (Baro et al., 2017).

2.3.1. Le checkpoint de l'assemblage du fuseau mitotique (SAC)

Le SAC permet de donner le temps nécessaire aux cellules pour que tous les chromosomes soient attachés aux microtubules du fuseau (Lara-Gonzalez et al., 2021). La présence d'erreurs dans l'attachement des chromosomes provoque un manque de tension dans le fuseau mitotique, créant un signal détecté par Ipl1. Cette protéine phosphoryle ensuite un ensemble de substrats qui favorisent la déstabilisation de ces attachements erronés, générant ainsi des kinétochores vides qui activent alors le SAC. Le bon fonctionnement du SAC nécessite l'extinction du MEN et la libération de Cdc14 dans le nucléole *via* Cdc5. D'autre part, Cdc5 contribue au SAC en permettant la phosphorylation de Mad3^{BubR1} après l'activation du SAC, en association avec Ipl1. Mad3 est une sous-unité du complexe du Mad3-Mad2-Bub3-Cdc20, qui inhibe le complexe APC/C^{Cdc20} en s'y liant, résultant en un complexe APC/C lié à deux protéines Cdc20. L'inhibition d'APC/C^{Cdh20}

provoque un fort arrêt du cycle cellulaire (Lara-Gonzalez et al., 2021; Matellán and Monje-Casas, 2020; Sun et al., 2022).

2.3.2. Le checkpoint du positionnement du fuseau mitotique (SPOC)

La répartition fidèle des chromosomes lors de la mitose nécessite un alignement et un positionnement correct du fuseau, parallèlement à l'axe de polarité des cellules en cours de division et perpendiculaire au plan de cytokinèse. Le SPOC est un mécanisme de surveillance permettant de retarder la progression du cycle cellulaire lorsque le fuseau n'est pas correctement positionné, en inhibant le MEN. Le principal effecteur du SPOC est la kinase Kin4 (Pereira and Schiebel, 2005). Kin4 régule l'activité et la localisation du complexe Bfa1-Bub2 sur les SPB en réponse à un mauvais alignement du fuseau mitotique (Hu et al., 2001). Kin4 phosphoryle Bfa1, empêchant Cdc5 de phosphoryler négativement Bfa1, ce qui maintient Bfa1 actif et donc le MEN inactivé. Le maintien de l'activité du complexe Bfa1-Bub2 est renforcé par Cdk qui agit en parallèle de Kin4 et phosphoryle également Bfa1. Kin4 agit aussi avec la protéine Bmh1 de la famille des molécules régulatrices 14-3-3, défavorisant l'interaction entre Bfa1 et Spc72, ce qui empêche plus encore la phosphorylation inhibitrice de Bfa1 par Cdc5. La localisation de Kin4 au niveau des SPB et du cortex de la cellule mère est contrôlée par la phosphatase PP2A^{Rts1}, qui maintient Kin4 phosphorylée. Rts1 agit donc comme un régulateur positif du SPOC, de même que Elm1 qui active également Kin4 (Caydasi et al., 2010). À l'inverse, Lte1 régule négativement Kin4, agissant comme un inhibiteur du SPOC et contribuant potentiellement à inhiber PP2A (Matellán and Monje-Casas, 2020). Récemment, il a été montré que la phosphatase Bud14 s'associe à la phosphatase Glc7, permettant de déphosphoryler Bfa1 et d'activer ainsi le SPOC de manière complète (Kocakaplan et al., 2021).

2.3.3. Le checkpoint de dommage à l'ADN

En présence de dommages à l'ADN, les cellules activent un mécanisme de réponse dont fait partie le *checkpoint* de dommage à l'ADN, qui coordonne ensemble la réparation de l'ADN et la progression du cycle cellulaire. Chez *S. cerevisiae*, le *checkpoint* de dommage à l'ADN affecte la transition entre la métaphase et l'anaphase tout en inhibant la sortie de mitose. Le mécanisme de ce *checkpoint* est détaillé dans la partie 3, qui suit.

3. Implications de Cdc5 dans le *checkpoint* de dommages à l'ADN

3.1. Généralités sur le checkpoint de dommage à l'ADN

La transmission fidèle de l'information génétique exige une extrême précision dans la réplication de l'ADN et dans la distribution des chromosomes, ainsi que la capacité à survivre aux dommages à l'ADN, spontanés ou induits, tout en minimisant le nombre de mutations héréditaires. Une telle fidélité de l'information génétique fait intervenir en premier lieu des mécanismes de surveillance des dommages à l'ADN. Ceux-ci contrôlent l'intégrité du génome, coordonnent la réparation, puis autorisent la reprise de la progression du cycle cellulaire.

Lorsqu'un dommage à l'ADN est détecté, une cascade de réactions s'enclenche en fonction du type et de la localisation du dommage, activant l'arrêt du cycle cellulaire et le recrutement de facteurs de réparation. L'ensemble de ces mécanismes constitue la voie de signalisation de la réponse aux dommages à l'ADN (Ciccia and Elledge, 2010). Elle est conservée chez tous les eucaryotes, bien qu'avec une grande diversité. Les multiples cascades de signalisation impliquées dans la réponse aux dommages à l'ADN résultent en une variété de réponses cellulaires : l'arrêt du cycle cellulaire, l'induction de gènes impliqués dans la réponse au stress, la réparation de l'ADN, l'adaptation au dommage à l'ADN (voir partie 4), la sénescence (voir partie suivante) et la mort cellulaire. Lors de la formation d'un dommage à l'ADN, des protéines senseures le détectent et communiquent ces informations jusqu'aux effecteurs *via* des transducteurs de signaux. Les effecteurs interviennent alors dans la réponse au dommage. Cette réponse comprend dans un premier temps l'arrêt ou le ralentissement du cycle cellulaire, et dans un second temps l'activation ou le maintien de la répression des voies nécessaires à la reprise du cycle cellulaire (Putnam et al., 2009). C'est l'ensemble de ces processus qui constituent le *checkpoint* de dommage à l'ADN.

3.2. Les signaux reconnus par le *checkpoint* de dommage à l'ADN

3.2.1. Les cassures double-brin de l'ADN

3.2.1.1. Les dommages programmés

Parmi les dommages à l'ADN, les cassures double-brins sont fortement cytotoxiques. Pourtant, elles sont nécessaires pour un certain nombre de processus cellulaires, tels que (i) la recombinaison méiotique, (ii) le changement de signe sexuel chez certaines espèces de levures dont *S. cerevisiae*, ou bien encore (iii) la recombinaison des gènes variables, de diversité et de jonction (V(D)J) de l'immunoglobuline chez les vertébrés (Chi et al., 2020; Maroc and Fairhead, 2021; Richardson et al., 2004; Strathern et al., 1982).

(i) La recombinaison méiotique est un processus cellulaire générateur de cassures double-brin qui permettent la recombinaison allélique. Le nombre de cassures double-brin formées par méiose varie selon les espèces et s'élèvent généralement à plusieurs centaines (Kauppi et al., 2013). Chez *S. cerevisiae*, le nombre de cassures double-brin générées à chaque méiose est d'environ 160 (Prugar et al., 2017).

(ii) Le changement de signe sexuel chez *S. cerevisiae* se fait par cassure de l'ADN au sein du gène sexuel actif *MAT* grâce à l'endonucléase HO, et permet d'alterner entre deux types sexuels : « Mata » et « Mata » (Oshima, 1993; Winge, 1949). L'ADN ainsi coupé est ensuite réparé par recombinaison homologue avec le locus codant pour *MATa* ou *MATa* (Wolfe and Butler, 2022). Ce système favorise la reproduction sexuée même dans un milieu où toutes les cellules seraient initialement de même signe sexuel.

(iii) La recombinaison V(D)J est le mécanisme clef à l'origine de la grande diversité des anticorps. Elle est initiée par des cassures double-brin (Chi et al., 2020). Ce mécanisme ne sera pas détaillé dans le présent écrit.

3.2.1.2. Les stress cellulaires provoquant des cassures double-brins

Les stress subis par les cellules peuvent être à l'origine de dommages à l'ADN. Qu'il s'agisse de cassures double-brin, simple-brin ou de l'effondrement de la fourche de réplication, ces dommages sont particulièrement préjudiciables pour la cellule (Katsuki et al., 2020). De tels stress peuvent être provoqués par des sources endogènes ou exogènes (Chatterjee and Walker, 2017). Je vais principalement détailler les cassures double-brin ici, un type de dommage qui a servi de modèle d'étude des *checkpoints* de dommages à l'ADN, et que nous détaillerons en partie 3.3.

La grande majorité des cassures double-brin endogènes survient lorsque la progression de la fourche de réplication est entravée, créant un stress réplicatif. Ce phénomène peut être dû à des problèmes lors de la réplication – au niveau de l'activité polymérase ou des topoisomérases par exemple (Yoshida and Fujita, 2021). D'autres dommages peuvent survenir lorsque l'ADN est impliqué dans une réaction chimique : par exemple, la présence excessive de dérivés réactifs de l'oxygène (*Reactive Oxygen Species*, ROS) oxyde les bases et provoque des cassures de l'ADN, et la présence de molécules d'eau hydrolyse l'ADN (Karanjawala et al., 2002; Shapiro, 1981).

Certains des stress évoqués peuvent aussi provenir de sources exogènes. C'est le cas par exemple de la désamination, qui peut être engendrée à la suite d'une exposition à des UV, en présence de bisulfite de sodium ou d'agents intercalants de l'ADN. C'est également le cas de la méthylation de l'ADN, qui peut être provoquée par l'environnement. Les sources de stress exogènes être d'origine physique : les radiations ionisantes sont capables de provoquer des lésions de l'ADN par coupure directe, mais aussi de manière indirecte en produisant des radicaux hydroxyles. Quant aux UV, ils peuvent provoquer des liaisons covalentes entre les bases (les dimères de thymines) (Ward, 1990; Wulff and Rupert, 1962). Il existe par ailleurs des stress exogènes d'origine chimique. On peut par exemple citer les composés alkylants tel que le méthane sulfonate de méthyle (MMS) qui est cancérigène. Ces composés sont capables d'ajouter des groupements alkyles sur les bases de l'ADN ou sur des groupements phosphates, et de provoquer des cassures double-brin de l'ADN lors de la réplication (Wyatt and Pittman, 2006). On peut aussi citer les amines aromatiques, qui modifient les bases guanines de l'ADN, provoquant des substitutions de bases ou des décalages du cadre de lecture. De plus, la présence de tabac, de pesticides, de toxines provenant de microorganismes, ou encore certains choix alimentaires, sont autant de facteurs de risques de lésions de l'ADN. Par exemple, les molécules toxiques citées peuvent s'intercaler dans l'ADN, modifier l'état de méthylation de l'ADN ou encore provoquer des stress oxydatifs (Alexandrov et al., 2016; Kaur and Kaur, 2018).

Certains phénomènes de stress ont inspiré le développement de systèmes d'induction de dommages à l'ADN, praticables en conditions contrôlées de laboratoire.

3.2.1.3. L'induction de cassures double-brin en conditions expérimentales

Les cassures double-brin ont servi de modèle pour étudier le *checkpoint* de dommage à l'ADN et la réparation. Historiquement, la coupure HO dans le gène *MAT* a permis de découvrir beaucoup d'aspects du *checkpoint*, de la réparation et de l'adaptation (ces deux derniers processus seront détaillés respectivement en parties 3.6.1 et 4). La cassure doublebrin provoquée par l'endonucléase HO est un système modèle d'induction de dommage à l'ADN, utilisé en laboratoire en contrôlant l'activité de l'endonucléase par un promoteur inductible au galactose (Haber, 2016). Les cassures double-brin peuvent aussi être générées par l'endonucléase I-Scel (Monteilhet et al., 1990). Par ailleurs, des nucléases sites-spécifiques ont émergé, facilitant le ciblage des sites de coupures : les nucléases en doigts de zinc (ZFN), les nucléases TAL-*Effector* (TALEN) et le système CRISPR-Cas9 (Doudna and Charpentier, 2014; Wood et al., 2011). Les cassures double-brin peuvent de plus être induites par des sources exogènes physiques en conditions contrôlées de laboratoire – telles que les radiations ionisantes – ou chimiques, en utilisant la bléomycine par exemple (Lown and Sim, 1977; Ward, 1988).

3.2.2. La déstabilisation des télomères

Les chromosomes linéaires présentent des extrémités, appelées télomères, qui sont des structures fournissant une "coiffe" sur l'ADN chromosomique et le protégeant contre une variété de phénomènes délétères pour le maintien de l'intégrité de ces extrémités, telle que la fusion, la résection ou la recombinaison par exemple (Wright and Shay, 2000). Plus précisément, les télomères désignent un complexe alliant des protéines et de l'ADN télomérique est constitué de séquences répétées riches en guanines et en thymines sur l'extrémité 3' (Shampay et al., 1984). Chez *S. cerevisiae*, les télomères présentent une longueur moyenne d'environ 300 paires de bases, avec une séquence simplebrin sortante en 3', longue d'une dizaine de bases (Teixeira, 2013; Wellinger and Zakian, 2012). La protéine Mre11, impliquée dans les dommages à l'ADN au sein du complexe MRX (voir partie 3.3.1.1) est essentielle à l'établissement de cette extrémité sortante, par ailleurs

protégée par le complexe Cdc13-Stn1-Ten1 (CST) (Larrivée et al., 2004). Le complexe CST est impliqué dans la réplication des télomères, le recrutement de la télomérase et entrave l'activité de résection d'Exo1 dans cette région, protégeant les télomères de mécanismes de détection des dommages à l'ADN et de réparation (Garvik et al., 1995; Maringele and Lydall, 2002). La sous-unité Cdc13 de ce complexe permet de plus le recrutement de la télomérase – une transcriptase inverse spécialisée qui synthétise l'ADN télomérique – sur l'extrémité 3' sortante grâce à son interaction avec la sous-unité Est1 de la télomérase, mais aussi *via* son interaction avec Tel1 (ATM chez l'homme) et les gènes du complexe MRX (Evans and Lundblad, 1999; Greider and Blackburn, 1987; Lustig and Petes, 1986).

Deux autres complexes assurent la protection des télomères : le complexe KU et le complexe Rap1-Rif1-Rif2 (Garvik et al., 1995; Vodenicharov et al., 2010; Westmoreland et al., 2018). Le complexe KU empêche également la résection des télomères par Exo1 et participe au recrutement de la télomérase (Dewar and Lydall, 2012). La protéine Rap1 se lie à l'ADN double-brin avec une forte affinité et permet la régulation de la taille des télomères par inhibition du recrutement de la télomérase *via* Rif1 et Rif2 (Shore, 1994). Rap1 permet aussi le recrutement d'autres protéines telles que Sir2, Sir3 et Sir4. C'est Sir4 qui permet à KU de favoriser le recrutement de la télomérase (Hass and Zappulla, 2015). Ces protéines contribuent à empêcher la réparation d'opérer au niveau des télomères et à inhiber l'activité transcriptionnelle en cet endroit (Liu et al., 2019).

En l'absence de tout processus de maintenance, les télomères raccourcissent à chaque division cellulaire (Lundblad and Szostak, 1989). Chez *S. cerevisiae*, ce raccourcissement conduit à un arrêt irréversible du cycle cellulaire déclenché par le télomère le plus court, appelé sénescence réplicative, après l'activation du *checkpoint* de dommage à l'ADN dépendant de Mec1, Rad9 et Rad53 selon un mécanisme proche de la détection d'une cassure double-brin. La réparation des télomères courts présente aussi des points communs avec les réparations des cassures double-brin, et en l'absence de réparation, l'arrêt de sénescence peut être suivi par de l'adaptation (Coutelier et al., 2018).

Les télomères constituent donc une structure spécifique responsable du maintien des extrémités des chromosomes et qui permet aux cellules de les distinguer d'une cassure de

*

l'ADN, les affranchissant d'être l'objet de mécanismes de réparation. La déstabilisation des structures télomériques fait partie des systèmes expérimentaux contrôlés permettant l'étude de la réponse cellulaire aux dommages à l'ADN.

La protéine mutante codée par le gène thermosensible *cdc13-1* est fonctionnelle à la température permissive de 23°C, protégeant les télomères. Mais lorsque la température devient restrictive, Cdc13 n'est plus localisée aux télomères, permettant à Exo1 de générer de l'ADN simple-brin par résection (Booth et al., 2001; Garvik et al., 1995). Cet ADN simple-brin est alors signalé comme un dommage à l'ADN, entraînant l'arrêt du cycle cellulaire entre les phases G2 et M de manière dépendante de Rad9, et similaire à l'arrêt provoqué par les cassures double-brin précédemment présenté, dont les réponses seront détaillées dans la partie qui suit (Lydall and Weinert, 1995; Weinert and Hartwell, 1988).

3.3. La cascade de signalisation du *checkpoint* de dommages à l'ADN (exemple de la cassure double-brin)

Comme précédemment mentionné, le *checkpoint* de dommage à l'ADN est un réseau de transduction du signal constitué de protéines senseures, transductrices et effectrices, dont nous allons détailler les fonctions en nous référençant à la figure ci-dessous (Fig. 5).



Figure 5. Résumé des étapes de détection du dommage à l'ADN et de résection. En bleu l'ADN, en beige les protéines, et en orange le sens de résection. (A) Recrutement des complexes MRX et KU au site du dommage.

(B) Résections courte et longue portées. (C) Recrutement de Mec1 et de RPA. (D) Recrutement et activation de Rad9, Rad53 et Chk1 au site du dommage.

3.3.1. Le rôle des protéines senseures et transductrices dans le checkpoint de dommages à l'ADN

En réponse à un dommage à l'ADN, le complexe Mre11-Rad50-Xrs2 (MRX, Mre11-Rad50-Nbs1, MRN, chez les mammifères) est recruté au niveau du site de la cassure en se liant directement aux extrémités de l'ADN (Lisby et al., 2004; Martin et al., 1999; Wu et al., 2008). Puis MRX recrute Tel1 grâce à sa sous-unité Xrs2, stabilisant ainsi la liaison MRX-ADN (Chen et al., 2001; Hopfner et al., 2001; Milne et al., 1996; Nakada et al., 2003). Tel1 et Mec1 (ATR chez l'homme) appartiennent à la famille des phosphatidylinositol 3' kinase-like kinases (PIKK) et signalent la présence du dommage. Parallèlement au recrutement de Tel1 et MRX, le complexe KU (yKu70 et yKu80) est lui aussi rapidement recruté au site du dommage. Sa phosphorylation promeut la réparation par NHEJ, mécanisme détaillé en partie 3.6. (Fig. 5A).

Le recrutement de MRX promeut la résection de l'ADN, un processus en deux étapes : une phase de résection à courte distance et une phase de résection sur longue distance d'ADN. La première phase, lente et limitée au voisinage de la cassure, est opérée dans le sens 3'-5' par la sous-unité Mre11 du complexe MRX et son cofacteur Sae2 (Clerici et al., 2005; Lee et al., 1998). Cette résection de courte portée est ensuite poursuivie par l'exonucléase Exo1 et par le complexe Sgs1-Dna2-Rmi1 (Mimitou and Symington, 2008; Zhu et al., 2008; Zubko et al., 2004). Les longues portions d'ADN simple-brin générées sont rapidement couvertes par la protéine de réplication A (RPA, contenant Rfa1, Rfa2 et Rfa3), constituant un complexe ADN simple-brin / RPA qui empêche la formation de structures secondaires (Alani 1992) (Fig. 5B).

Lorsque la résection a eu lieu, la kinase Mec1 est recrutée grâce à sa liaison à Ddc2 (ATRIP chez l'homme) lui permettant de reconnaître de l'ADN simple-brin recouvert de RPA (Nyberg et al., 2002; Rouse and Jackson, 2002; Usui et al., 2001; Zou and Elledge, 2003). Mec1 est activée par la protéine de réplication Dpb11, elle-même recrutée par Ddc1 – une sousunité du complexe 9-1-1 constitué aussi de Rad17 et Mec3 (Furuya et al., 2004; Kumagai et al., 2006; Puddu et al., 2008). Une fois activée, Mec1 initie la réponse du *checkpoint* de dommage à l'ADN, en plus de Tel1 (Fig. 5C). En parallèle de l'activation de Mec1, la protéine adaptatrice Rad9 est recrutée au site du dommage, où elle est phosphorylée par Mec1 et Tel1 (Emili, 1998; Weinert and Hartwell, 1988). Le complexe 9-1-1 est impliqué dans le recrutement des substrats de Mec1, dont Rad9 et Rad53. La protéine Dbp1 participe au recrutement de Rad9 et contribue ainsi à la transduction du signal entre les PIKK jusqu'à la kinase effectrice Rad53 (Granata et al., 2010). Une fois phosphorylée, Rad9 joue un rôle de protéine adaptatrice auprès de Rad53 en permettant son recrutement au niveau du site du dommage par interaction directe (Vialard, 1998) (Fig. 5D).

3.3.2. Les kinases de transduction du checkpoint de dommage à l'ADN

Après son recrutement par Rad9, la kinase effectrice Rad53 (Chk2 chez l'homme) est phosphorylée par Mec1, conduisant à son activation catalytique (Fiorani et al., 2008). Rad53 s'autophosphoryle ensuite, permettant son activation complète et robuste. Le complexe 9-1-1 est essentiel à l'hyperphosphorylation de Rad53 (Longhese et al., 1997; Pellicioli et al., 1999), et cet état d'hyperphosphorylation de Rad53 est spécifique de l'activation du *checkpoint* de dommage à l'ADN (Sanchez et al., 1999).

Une autre kinase effectrice est aussi activée par Mec1 : Chk1. L'activation de la paire de kinases Chk1 et Rad53 se fait à l'aide d'un éventail de protéines, dont Ddc1(Sanchez et al., 1999, 1996). Une fois activées, Rad53 et Chk1 ciblent plusieurs substrats permettant de contrôler l'arrêt du cycle cellulaire. Chez *S. cerevisiae*, les mutants *chk1* Δ ne présentent qu'une légère réduction du délai du cycle cellulaire après une cassure double-brin et le double mutant *chk1* Δ *rad53* Δ présente un phénotype similaire à celui de *rad53* Δ seul, c'est-à-dire un court arrêt en G2/M. Ces résultats suggèrent que Chk1 joue un rôle mineur dans la transduction du signal chez la levure bourgeonnante (Dotiwala et al., 2010, 2007; Waterman et al., 2020) (Fig. 5D).

3.3.3. Le rôle des effecteurs de l'arrêt du cycle cellulaire



Figure 6. Inhibition de la séparation des chromatides sœurs par l'action de Rad53 et Chk1 en réponse à un dommage à l'ADN.

l'arrêt Lors de en G2/M, la séparation des chromatides sœurs est empêchée : elles restent maintenues entre elles grâce à la sécurine Pds1 (Cohen-Fix and Koshland, 1997). Au sein d'une cellule non endommagée, Pds1 se lie à la séparase Esp1, ce qui inhibe son activité protéase. Au moment de la transition de la métaphase vers l'anaphase, Pds1 est ubiquitinylée par le complexe APC/C^{Cdc20} permettant sa dégradation par le protéasome (Cohen-Fix and Koshland, 1997; Shirayama et al., 1998; Wang et al., 2001; Yamamoto et al., 1996)

(Fig. 6). Lorsque Pds1 est dégradée, Esp1 est libérée et clive alors les anneaux de cohésine, libérant les chromatides sœurs. Dans le cas d'un dommage à l'ADN, l'ubiquitinylation de Pds1 est rendue impossible d'une part parce que Pds1 est phosphorylée par Chk1 et d'autre part parce que l'interaction entre Pds1 et Cdc20 est empêchée par Rad53 (Fig. 6). En conditions de dommages à l'ADN, Pds1 est donc stabilisée, ce qui contribue au maintien des chromatides sœurs ensemble (Cohen-Fix and Koshland, 1997). Ensemble, les phosphorylations de Cdc20 et de Pds1 permettent d'inhiber la progression du cycle cellulaire en gardant Esp1 inactive. Il a été montré qu'un mutant $\Delta pds1$ réduit le temps d'arrêt au *checkpoint* de 60%, tandis qu'un mutant $\Delta pds1 \Delta rad53$ abolit complètement l'arrêt au *checkpoint* (Dotiwala et al., 2010). L'hyperphosphorylation de Pds1 se fait de manière dépendante de Mec1, Rad9 et Chk1, et indépendante de Rad53 et fait partie des caractéristiques de l'activation du *checkpoint* de dommage à l'ADN (Cohen-Fix and Koshland, 1997; Sanchez et al., 1999).

3.3.4. L'expression de gènes spécifiques de la réponse au dommage à l'ADN

En réponse à un dommage à l'ADN, Mec1 et Tel1, *via* Rad53, modifient l'expression de plusieurs centaines de gènes impliqués dans la synthèse de nucléotides, la réparation et la progression du cycle cellulaire, en régulant un certain nombre de facteurs de transcription (Gasch et al., 2001; Jaehnig et al., 2013) (Fig. 7).

Le facteur de transcription Rfx1 subit une hyperphosphorylation inhibitrice médiée par Dun1, ce qui favorise l'expression des gènes RNR, mécanisme habituellement réservé à la phase S en conditions physiologiques. Ces gènes sont impliqués dans le complexe ribonucléotide réductase (RNR), dont l'expression est aussi régulée par le complexe de facteurs de transcription Swi4-Swi6-Mbp1 en réponse à un dommage à l'ADN (Gasch et al., 2001; Jaehnig et al., 2013) (Fig. 7). La RNR catalyse une étape clef de la synthèse de déoxynucléosides triphosphates (dNTP), mécanisme essentiel à la réplication et à la réparation de l'ADN (Niida et al., 2010). Dun1 est activée par Rad53 et permet l'établissement de la forme active du complexe RNR sur plusieurs plans. D'une part, Dun1 phosphoryle directement Sml1, induisant la dégradation de Sml1 et l'activation de la sous-unité Rnr1 de la RNR. D'autre part, Dun1 favorise la dégradation de Dif1 ce qui permet l'export des sous-unités Rnr2, 3 et 4 de la RNR vers le cytosol. Enfin, Dun1 régule positivement la transcription d'un ensemble de gènes induits par les dommages à l'ADN, dont Rnr3, en favorisant la phosphorylation et l'inactivation du répresseur de la transcription, Crt1. La présence de la sous-unité Rnr3 est spécifique au dommage à l'ADN (Elledge et al., 1993; Huang et al., 1998; Lanz et al., 2019). L'augmentation de l'expression de ces gènes favorise la synthèse d'ADN et la réparation (Guarino et al., 2014; Torrents, 2014). D'autres gènes impliqués dans la réparation sont également exprimés : RAD51 et RAD54 (Gasch et al., 2001). Ces gènes favorisent la réparation des cassures double-brin.

Le complexe de transcription Ndd1-Fkh2-Mcm1 est lui aussi régulé en réponse à un dommage à l'ADN. Son rôle dans l'expression des gènes mitotiques du cluster *CLB2*sera détaillé en partie 3.5 (Fig. 7).



Figure 7. Expression de gènes spécifiques de la réponse au dommage à l'ADN (adapté de Jaehnig et al., 2013).

3.3.5. Modifications de la chromatine participant à l'activation robuste du *checkpoint*

La chromatine joue un rôle essentiel dans l'organisation et la régulation de l'ADN. En parallèle des premières étapes de la réponse aux dommages à l'ADN, plusieurs modifications de la chromatine interviennent et participent à l'activation robuste du *checkpoint*.

Dès les 30 premières minutes qui suivent l'induction du dommage, les histones H2A situés à proximité de la cassure sont phosphorylées (γ-H2A) par Mec1 et Tel1 (Lee et al., 2014; Shroff et al., 2004) (Fig. 8). L'accumulation de γ-H2A fait partie des marqueurs de la présence de dommages à l'ADN et permet le recrutement d'un certain nombre de facteurs associés au traitement des dommages à l'ADN, dont Rad9 précédemment mentionné. La présence de γ-H2A modifie la structure de la chromatine autour du site du dommage, permettant d'activer certaines protéines du *checkpoint*, comme par exemple la protéine senseur Tel1 (Keogh et al., 2006). En l'absence de γ-H2A, le *checkpoint* est désactivé prématurément, indiquant que γ-H2A participe au maintien du *checkpoint* (Nakamura et al., 2004).

La présence d'un dommage à l'ADN induit aussi la méthylation de l'histone H3K79, ce qui pourrait favoriser le recrutement de Rad9 et de la protéine 53BP1 chez l'homme (Grenon et al., 2001; Humpal et al., 2009; Huyen et al., 2004). Les conséquences structurelles de la méthylation de H3K79 ne sont pas entièrement comprises dans l'état actuel des connaissances, mais il semblerait qu'elle favorise le relâchement de la chromatine, rendant accessibles des surfaces de liaisons entre l'ADN et les facteurs impliqués dans la réponse au dommage (Ljungman et al., 2017). Le complexe de remodelage de la chromatine RSC est lui aussi impliqué dans la réponse à un dommage ainsi qu'en adaptation puisque le défaut d'adaptation du mutant *cdc5-16* est dû à son incapacité à interagir avec le complexe RSC (Ratsima et al., 2016). En interagissant avec Mre11 et yKu80, le complexe RSC se lie au niveau de la cassure. Le complexe RSC pourrait être impliqué dans le recrutement de Mec1 et Tel1, la phosphorylation de H2A en γ -H2A, l'activation de Rad9 et Rad53 et le remodelage de la chromatine (Chambers and Downs, 2012; Liang and Wang, 2007).



Figure 8. Modifications des histones autour du site du dommage.

3.4. Similitudes et différences du *checkpoint* de dommage à l'ADN activé par des cassures double-brin ou par *cdc13-1*

Dans l'ensemble, le comportement des cellules dont l'ADN est endommagé par la déprotection des télomères est similaire à celui obtenu par la création d'une unique cassure double-brin par HO. Il est supposé que la déprotection des télomères déclenche le mécanisme de réponse aux dommages à l'ADN en raison de la ressemblance d'un télomère avec un côté d'une cassure double-brin (Dewar and Lydall, 2012). On peut cependant s'étonner qu'alors que deux cassures double-brin provoquent un arrêt permanent, les cellules parviennent à poursuivre leur division cellulaire après un arrêt provoqué par la déstabilisation de tous les télomères (Lee et al., 1998; Toczyski et al., 1997). Cependant, une seule étude semble avoir montré l'incapacité d'une cellule ayant deux cassures double-brin à s'adapter (Lee et al., 1998). Si ce résultat est fondé, peut-être pourrait-il s'expliquer par des différences dans les mécanismes de résections de ces deux dommages.

Des études sur la vitesse de résection de l'ADN au niveau des cassures double-brin et au niveau des télomères déprotégés montrent qu'elle est deux fois moins élevée dans le cas des cassures double-brin (3.5-4 kb/h) qu'au niveau des télomères déstabilisés (8 kb/h) (Chung et al., 2010; Ngo and Lydall, 2015). Cet écart suggère que les télomères seraient plus favorables à la résection que d'autres emplacements dans le génome et pourrait expliquer la différence de létalité du mutant de résection sgs1 exo1 rad9 dans les deux contextes de dommage : sgs1 exo1 rad9 est létal dans le cas d'une cassure double-brin par HO, alors qu'il est viable dans le contexte cdc13-1 puisque cette triple délétion annule l'essentialité de Cdc13 (Dewar and Lydall, 2012; Ngo and Lydall, 2015, 2010). Les activités nucléases recensées aux lieux des cassures double-brin et des télomères déprotégés semblent effectivement différer légèrement : le complexe MRX et sa protéine associée Sae2 initient la résection au niveau des cassures double-brin, alors qu'il n'est pas requis dans le cas de télomères déprotégés (Foster et al., 2006). Cette différence peut s'expliquer par la nature même du dommage : alors que les cassures double-brins présentent des extrémités franches, les télomères possèdent déjà une extrémité simple-brin sortante, permettant à Exo1 de résecter l'ADN sans besoin d'initiation préalable. Exo1 semble en effet être la principale nucléase au niveau des télomères déprotégés – sa délétion inhibant fortement la résection –, alors qu'elle ne suffit pas à elle seule pour initier la résection au niveau des cassures double-brin puisque

sa délétion ne provoque qu'un effet mineur sur l'étendue de la résection dans ce type de dommage (Dewar and Lydall, 2012; Maringele and Lydall, 2002; Mimitou and Symington, 2008). Le recrutement d'Exo1, ainsi que de Dna2-Sgs1, favorise la résection et est régulé par le complexe 9-1-1 dans les deux types de dommage, avec cependant une différence majeure : le complexe 9-1-1 semble stimuler la résection extensive des télomères déprotégés et inhiber au contraire la résection aux cassures double-brin (Ngo and Lydall, 2015). La différence d'activité d'Exo1, médiée par le complexe 9-1-1, ne semble pas en être la seule cause de cet écart, puisqu'il a aussi été observé que le recrutement de Rad9, également permis par le complexe 9-1-1, est plus important au niveau des cassures double-brin qu'aux télomères déprotégés (Ngo and Lydall, 2015). Cependant l'inhibition de la résection par Rad9 de manière dépendante de Mec1 et Rad53 est un mécanisme qui se produit aux deux types de dommages : après l'induction du dommage, Rad9, activée par Mec1, se lie à Rad53, permettant son activation et l'inhibition de la résection en empêchant l'accumulation d'Exo1 (Jia et al., 2004).

Dans l'ensemble, les mécanismes moléculaires de l'arrêt au *checkpoint* provoqué par une cassure double-brin ou par des télomères déprotégés est très similaire, ce qui permet d'utiliser le mutant *cdc13-1* comme modèle de cassures double-brin. Les télomères raccourcis naturellement peuvent aussi être à l'origine d'un arrêt au *checkpoint* : il s'agit de la sénescence, phénomène présenté en partie 3.2. Lorsque les télomères atteignent une taille critique, la cellule active l'arrêt en G2/M de manière similaire à une cassure double-brin (Teixeira, 2013).

3.5. Le rôle de Cdc5 dans le *checkpoint* de dommages à l'ADN 3.5.1. Le complexe MRX et sa protéine associée Sae2 interagissent au moins indirectement avec Cdc5

De nombreuses preuves d'interactions directes ou indirectes entre la famille des Plk et le complexe MRX ou son homologue MRN ont été rapportées. Par exemple, ce complexe permet le recrutement robuste de Polo chez *D. melanogaster* au niveau du site du dommage à l'ADN au cours de la mitose (Landmann et al., 2020). Chez l'homme, Plk1 favorise la réparation par jonction d'extrémités médiées par la microhomologie (MMEJ, une voie de réparation des cassures double-brin) *via* la phosphorylation de CtIP, l'orthologue de Sae2 (Makharashvili and Paull, 2015; Wang et al., 2018). Plk1 phosphoryle aussi Mre11, permettant sa phosphorylation ultérieure par Ck2. Ces phosphorylations inhibent le recrutement du complexe MRN au site du dommage à l'ADN et conduisent à l'extinction prématurée du *checkpoint* de dommage à l'ADN (Li et al., 2017). Chez *S. cerevisiae*, la surexpression de Cdc5 mène à l'hyperphosphorylation de Sae2 *via* l'interaction directe du PBD de Cdc5 avec Sae2 (Donnianni et al., 2010). Cependant l'interaction directe entre Sae2 et Cdc5 dans des conditions physiologiques n'a pas encore été prouvée. En ce qui concerne la sous-unité Xrs2 du complexe MRX, elle a été prédite comme substrat potentiel de Cdc5 (Snead et al., 2007).

En somme, alors que des interactions directes entre Plk1 et MRN – en particulier Mre11 – ont été montrées, l'interaction directe entre MRX et Cdc5 – en dehors de la protéine associée Sae2 – n'est pas encore clairement démontrée. Le recrutement du complexe MRX en réponse à un dommage à l'ADN, présenté en partie 3.3.1, et ses interactions potentielles avec Cdc5 suggèrent que le complexe MRX serait impliqué dans l'adaptation au dommage à l'ADN, bien que son rôle dans ce processus n'ait pas encore été étudié en détail. Nos recherches ont apporté de nouveaux éléments sur l'implication de MRX et Sae2 dans l'adaptation au dommage à l'ADN, résultats présentés en article 2.

3.5.2. Les interactions entre Cdc5 et Rad53 promeuvent l'adaptation

En conditions physiologiques, au moment de la sortie de mitose, Cdc5 phosphoryle Bfa1, inhibant ainsi le complexe Bfa1-Bub2, permettant la sortie de mitose (Geymonat et al., 2003; Hu and Elledge, 2002). En réponse à une déstabilisation des télomères, Cdc5 est phosphorylée et inhibée de manière dépendante de Rad53, ce qui a pour conséquence d'empêcher la phosphorylation de Bfa1 et donc de maintenir l'arrêt au *checkpoint* (Sanchez et al., 1999; Valerio-Santiago et al., 2013; Zhang et al., 2009).

Par ailleurs, Cdc5 semble désactiver Rad53. Lorsque *CDC5* est surexprimée dans des cellules *cdc13-1* cultivées à température restrictive, l'hyperphosphorylation de Rad53 est perdue, et ce, même en l'absence des phosphatases PP2C (*ptc2Δ ptc3Δ*), qui déphosphorylent Rad53 (voir partie 4.3.1). Dans ces conditions, les cellules parviennent à échapper à l'arrêt en G2/M (Vidanes et al., 2010). Ce résultat suggère que Cdc5 désactive Rad53, favorisant la régulation négative du *checkpoint* de dommage à l'ADN et l'enclenchement du processus d'adaptation. Rad53 et Cdc5 interagissent *in vivo* et *in vitro*, suggérant que l'inhibition de Rad53 par Cdc5 se produirait de manière directe (Vidanes et al., 2010).Par ailleurs, il a été montré que l'activité kinase de Cdc5 est essentielle à son effet sur l'état hyperphosphorylé de Rad53 (Vidanes et al., 2010).

Notons que malgré les preuves d'interactions entre Cdc5 et Rad53 (Vidanes et al., 2010; Zhang et al., 2009), les preuves expérimentales n'indiquent pas clairement que Rad53 phosphoryle Cdc5 de manière directe (Lanz, 2019).

3.5.3. La localisation de Cdc5 change au cours de l'arrêt en G2/M

Il a été montré (Rawal et al., 2016) qu'après 6h d'induction d'une cassure double-brin, Cdc5 est localisée au noyau, alors qu'à partir de 10-12h, le signal de Cdc5 est spécifiquement localisé aux SPB. Dans cette étude, Cdc5-ad semble être recrutée aux SPB prématurément par rapport à Cdc5, résultat qui suggère que non seulement le recrutement de Cdc5 aux SPB serait nécessaire au processus d'adaptation au dommage à l'ADN, mais qu'en plus le moment de ce recrutement déterminerait la possibilité d'adaptation (Rawal et al., 2016; Rincón and Monje-Casas, 2020). Nous reviendrons sur la localisation de Cdc5 en lien avec l'adaptation dans la discussion de ce manuscrit.

3.5.4. L'expression de CDC5 dépend de la phosphorylation de la protéine

Ndd1 par Cdc5

Ndd1 contrôle le niveau d'expression d'un cluster de gènes incluant un certain nombre de gènes impliqués dans le cycle cellulaire et qui permettent la transition de la phase M vers la phase G1. Parmi ces gènes se trouvent *CLB1, CLB2* – gènes des cyclines mitotiques –, *CDC20* ou encore *CDC5* (Spellman et al., 1998). La transcription de ce cluster de gènes est régulée par le complexe Mcm1-Fkh2-Ndd1 et le complexe de déacétylation



Figure 9. Régulation du cluster de gènes CLB2.

d'histones Sin3-Rpd3 (Loy et al., 1999). Mcm1 et Fkh2 ont la faculté de se lier au promoteur des gènes cibles. Fkh2 est un adaptateur qui permet soit le recrutement de Ndd1, activant ainsi la transcription en G2/M (Darieva et al., 2003; Koranda et al., 2000), soit le recrutement du complexe Sin3-Rpd3, réprimant la transcription en G1 (Linke et al., 2013). Rad53 régule le cofacteur de transcription Ndd1 par le biais de plusieurs sites de phosphorylations (Edenberg et al., 2014; Yelamanchi et al., 2014). Lorsque Rad53 phosphoryle Ndd1, l'interaction entre Ndd1 et Fkh2 est rendue impossible, limitant la transcription de certains gènes mitotiques du cluster CLB2 (déjà mentionné en 3.3.1.4), dont celle de CDC5 (Edenberg et al., 2014; Yelamanchi et al., 2014) (Fig. 9). Ndd1 est par ailleurs phosphorylée par Cdc5, au niveau de la sérine 85, ce qui a pour effet de promouvoir l'interaction de Ndd1 avec Fkh2 et donc l'expression des gènes du cluster décrit précédemment (Darieva et al., 2006) (Fig. 9). Comme CDC5 fait partie de ce cluster, la phosphorylation de Ndd1 par Cdc5 semble créer une boucle de rétroaction positive qui se déroule lors d'un cycle cellulaire normal. Le rôle de cette boucle dans l'adaptation reste cependant à étudier, mais des expériences préliminaires menées par l'équipe – expériences de microfluidiques sur les phosphomutants et phosphomimétiques *ndd1-S85A* et *ndd1-S85E* – n'ont pas révélé d'implication en adaptation.

En investiguant les régulations de Cdc5 en adaptation au dommage à l'ADN, nous avons mis en évidence l'implication de la régulation Rad53-Ndd1-Cdc5 dans l'adaptation, résultat qui sera présenté dans l'article 1 de cette thèse (Coutelier, Ilioaia, Le Peillet et al., 2021). Maintenant que nous avons étudié les mécanismes d'activation de l'arrêt au *checkpoint* de dommage à l'ADN, nous allons voir qu'il existe plusieurs manières d'éteindre sa signalisation (Fig.10).



Figure 10. Résumé graphique des mécanismes favorisant l'arrêt du cycle cellulaire après induction d'un dommage à l'ADN et des voies métaboliques possibles après l'arrêt.

3.6. L'extinction du *checkpoint* de dommage à l'ADN

3.6.1. Mécanisme général menant à la désactivation du *checkpoint* de dommage à l'ADN

Quelle que soit l'issue, le *checkpoint* de dommage à l'ADN finit par s'éteindre. La désactivation du *checkpoint* est cruciale pour la reprise de la division cellulaire et les mutants qui ne parviennent pas à désactiver correctement le *checkpoint* sont dits sensibles au dommage à l'ADN (Kim et al., 2011; Ohouo et al., 2013).

La désactivation du *checkpoint* après réparation du dommage est associée à un processus dit de restauration, ou *recovery* (voir la partie suivante sur les mécanismes de réparation). La désactivation du *checkpoint* de dommage à l'ADN en parallèle de la persistance du dommage concerne quant à lui le mécanisme d'adaptation au dommage à l'ADN (Fig.10).

Qu'il s'agisse d'un cas de figure ou de l'autre, la désactivation du checkpoint de dommage à l'ADN nécessite une cascade de déphosphorylation incluant l'action des phosphatases PP2C, PP1, PP4 et Wip1 (Campos and Clemente-Blanco, 2020; Coutelier et al., 2019; Hartwell and Kastan, 1994). Ces phosphatases éliminent les groupements phosphates activateurs sur des substrats clefs du checkpoint de dommage à l'ADN, dont MRX/MRN, γ-H2A, RPA, Rad53 et Chk1 (Campos and Clemente-Blanco, 2020). Comme vu en partie 3.3.1, l'arrêt du cycle cellulaire est principalement dû à l'action des kinases Chk1 et Rad53. Leur désactivation enclenche donc la suppression rapide de la signalisation de l'arrêt au checkpoint de dommage à l'ADN. Les protéines adaptatrices du checkpoint, telle que Rad9, ont, elles aussi, un rôle clef dans la régulation du checkpoint de dommage à l'ADN puisque leur dégradation empêche la survenue de nouvelles activations de kinases effectrices de l'arrêt du cycle cellulaire. Dans le cas où le *checkpoint* de dommage à l'ADN serait éteint, le facteur de réparation Slx4-Rtt107 entre en compétition avec Rad9 au niveau du dommage à l'ADN, provoquant une baisse de la signalisation du checkpoint en G2/M (Dibitetto et al., 2016; Millan-Zambrano et al., 2018; Ohouo et al., 2013). Par ailleurs, des processus de phosphorylations sont aussi impliqués dans l'extinction du checkpoint de dommage à l'ADN : 6h après l'induction d'un dommage à l'ADN, Mec1 s'autophosphoryle en S1964, délocalisant le complexe Mec1-Ddc2 du site du dommage lors de l'adaptation (Memisoglu et al., 2019).

Adaptation et *recovery* sont donc des mécanismes semblables qui aboutissent tous deux à la désactivation du *checkpoint* de dommages à l'ADN, et pourtant leurs conséquences sur l'intégrité du génome sont drastiquement différentes. Les parties suivantes adresseront séparément ces deux destins cellulaires.

3.6.2. La désactivation du *checkpoint* de dommage à l'ADN après réparation des cassures double-brin

Deux voies principales de réparation des cassures double-brins sont connues chez les eucaryotes : la réparation par jonction d'extrémités non homologues (*Non-Homologous End Joining*, NHEJ) et celle par recombinaison homologue (*Homologous Recombination*, HR). Les travaux présentés dans ce manuscrit concernant des dommages non réparables, la description des mécanismes de réparation n'entrera pas dans les détails.

3.6.2.1. La réparation par NHEJ

La réparation par NHEJ est une voie de réparation considérée comme sans erreur lorsqu'appliquée à une cassure double-brin générant des extrémités franches. Elle est active tout au long du cycle cellulaire, mais elle intervient principalement en phase G1, à un moment du cycle où la réparation par HR est réprimée. Lors de la réparation par NHEJ, les complexes KU et MRX interviennent dès la détection du dommage, en se liant à l'ADN au niveau du site de la lésion. Ensemble, ces deux complexes stabilisent les deux extrémités de la cassure, les préparant ainsi à être fusionnées entre elles par la ligase Dnl4 recrutée par le complexe KU. Cette ligation est facilitée par la sous-unité Lif1 du complexe de ligation *via* son partenaire de liaison Nej1. Le complexe de ligation se place entre les deux extrémités de la cassure et participe ainsi au maintien de leur proximité pendant le temps de leur ligation (Daley, 2005; Emerson and Bertuch, 2016).

3.6.2.2. La réparation par HR

La réparation par HR des cassures double-brin peut s'opérer dès lors qu'au moins une des extrémités de la cassure présente une homologie avec des séquences situées ailleurs dans le génome. Cette voie de réparation s'effectue au cours des phases S et G2 chez un haploïde. La réparation par HR est un mécanisme très conservé chez les eucaryotes, capable de synthétiser *de novo* l'ADN à partir d'une matrice intacte reconnue par homologie de séquence. Elle est réprimée dans les cellules haploïdes en G1, d'une part parce que la résection y est inhibée et d'autre part parce qu'au sein d'une cellule haploïde elle ne peut se faire que si une séquence homologue à la région cassée existe dans la cellule. Dans le cas d'un organisme diploïde en revanche, la réparation par HR peut se faire grâce à la présence de séquences homologues situées sur le chromosome homologue (Ranjha et al., 2018).

Comme vu au chapitre 3.3.1, l'ADN localisé autour du dommage est résecté par MRX et Sae2, puis par Exo1/Sgs1-Dna2, générant de l'ADN simple-brin ensuite recouvert par le complexe RPA. Ce complexe favorise le recrutement de Rad52, interaction qui produit un complexe Rad52-RPA / ADN simple-brin, capable de recruter une protéine clef de la réparation par HR : Rad51. Rad51 remplace les RPA présents sur l'ADN simple-brin, permet la reconnaissance de régions d'homologies et médie l'échange ATP-dépendant de brins d'ADN, une étape primordiale de la réparation par HR. La séquence homologue identifiée est utilisée comme matrice pour la synthèse d'un nouveau brin d'ADN au niveau de la cassure. La résection générée suite à la détection d'un dommage peut cependant finir par empêcher la HR dans le cas des cassures double-brin subtélomériques si la réparation ne s'est pas faite en un temps suffisamment court : la formation excessive d'ADN simple-brin limite en effet la recherche d'homologie et la recombinaison dans ces régions (Bordelet and Dubrana, 2019; Talhaoui et al., 2016).

*

Les mécanismes de réparation concernent un certain nombre de facteurs par ailleurs impliqués dans le *checkpoint* de dommages à l'ADN, mais aussi, comme nous le verrons, de facteurs impliqués dans l'adaptation à ces dommages. Ces similitudes suggèrent que l'arrêt permanent au *checkpoint* de dommage à l'ADN, la *recovery* et l'adaptation sont intimement liés, et que le destin cellulaire dépend de l'équilibre entre ces voies, hypothèse que nous allons rediscuter à la lumière des résultats qui seront présentés aux chapitres 1 et 2.

3.6.3. L'adaptation au dommage à l'ADN et la reprise du cycle cellulaire en présence de dommages persistants

L'adaptation au dommage à l'ADN est vue comme une dernière tentative de survie pour la cellule dans un contexte de dommage non réparable et qui pourrait présenter un avantage sélectif (Coutelier et al., 2018; Galgoczy and Toczyski, 2001; Roux et al., 2021). Mais en permettant aux cellules de poursuivre leur division cellulaire malgré la persistance du
dommage dans leur ADN, l'adaptation contribue à l'instabilité génomique (Coutelier et al., 2019; Hartwell and Kastan, 1994). Dans certains cas, l'adaptation peut effectivement permettre la survie sur le long terme de la cellule : nos propres expériences de laboratoire nous ont par exemple permis d'obtenir régulièrement des macro-colonies issues de cellules qui sont parvenues à s'adapter, phénomène qui suggère une stabilisation du génome, probablement grâce à une certaine forme de réparation du dommage (Coutelier, Ilioaia, Le Peillet et al., 2021; Galgoczy and Toczyski, 2001; Toczyski et al., 1997). Mais dans la grande majorité des cas, l'adaptation ne permet pas plus de quelques divisions cellulaires supplémentaires avant que la cellule ne meure, comme le montrent les comptages des corps cellulaires des microcolonies obtenues lors de nos expériences ou par d'autres équipes (Coutelier, Ilioaia, Le Peillet et al., 2021; Sandell and Zakian, 1993). Cette faible capacité de survie après un événement d'adaptation au dommage à l'ADN est probablement due à la cytotoxicité des dommages accumulés, à de l'aneuploïdie ou à une mauvaise ségrégation des chromatides (Kaye et al., 2004). La détection de mutants restaurant la capacité d'adaptation des cellules déficientes est rendue difficile précisément en raison du petit nombre de divisions qu'un événement d'adaptation peut permettre d'engendrer. Ce point sera abordé dans l'article 2 de cette thèse, dans lequel nous présentons un crible des mutants capables de restaurer l'adaptation dans le mutant déficient en adaptation *cdc5-ad*.

Les détails du mécanisme de l'adaptation au dommage à l'ADN sont détaillés dans la partie qui suit.

4. Mécanisme de l'adaptation au dommage à l'ADN et rôles de Cdc5 dans ce processus

Les dommages irréparables de l'ADN ne bloquent pas la cellule au *checkpoint* G2/M indéfiniment, qui finit par désactiver le *checkpoint* de dommage à l'ADN et procéder à la reprise du cycle cellulaire sans réparer le dommage, grâce au processus appelé adaptation au dommage à l'ADN (Sandell and Zakian, 1993). Il ne doit cependant pas être confondu avec le terme adaptation communément employé en biologie évolutive et qui fait référence à l'ajustement fonctionnel des êtres vivants à leur milieu.

4.1. La mise en évidence de l'adaptation au dommage à l'ADN

4.1.1. La mise en évidence chez *S. cerevisiae*

Chez *S. cerevisiae*, un dommage non réparé provoque un arrêt au *checkpoint* de dommage à l'ADN pendant au moins 4 à 6h. Après quoi, et toujours en l'absence de réparation, les cellules s'adaptent au dommage en désactivant le *checkpoint* de dommage à l'ADN (Lee et al., 1998; Sandell and Zakian, 1993; Toczyski et al., 1997).

Ce phénomène a été décrit pour la première fois (Sandell and Zakian, 1993) sur une souche de levure ayant subi une cassure HO non réparable qui a éliminé le télomère d'un chromosome surnuméraire. Le caractère surnuméraire de ce chromosome le rend non essentiel à la survie cellulaire, ce qui permet d'étudier l'effet de la délétion d'un télomère. Après 5 à 15h d'arrêt, la majorité des cellules avaient repris la progression de leur cycle cellulaire sans avoir réparé le chromosome endommagé (Sandell and Zakian, 1993). L'adaptation favorise ainsi l'instabilité génomique dans la descendance (Galgoczy and Toczyski, 2001).

L'adaptation permet de contourner l'arrêt en G2/M provoqué par les trois types de dommages précédemment décrits comme activant le *checkpoint* : les cassures double-brin, la déprotection des télomères et la sénescence (Coutelier et al., 2019; Paulovich et al., 1997; Sandell and Zakian, 1993).

4.1.2. L'adaptation est un phénomène conservé chez les organismes pluricellulaires

Certaines études suggèrent l'existence d'un mécanisme d'adaptation au dommage à l'ADN chez des eucaryotes autres que *S. cerevisiae*.

Par exemple, des extraits d'œufs de *X. laevis* ayant subi une irradiation par rayonnements gamma et ayant été traités par l'aphidicoline, inhibiteur de la réplication, finissent par désactiver la signalisation du *checkpoint* de dommage à l'ADN malgré la persistance de foyers γ –H2AX (Yoo et al., 2004). De plus, en réponse à l'activation du *checkpoint* en phase S, c'est l'orthologue de Cdc5 – principal acteur de l'adaptation chez *S. cerevisiae* –, Plx1, qui phosphoryle et inactive la claspine (orthologue de Mrc1). Une fois activée, la claspine est délocalisée de la chromatine, Chk1 est désactivée et la cellule reprend son cycle cellulaire malgré une réplication incomplète de l'ADN (Yoo et al., 2004).

Chez l'homme, des études rapportent des mécanismes de reprises du cycle cellulaire avec des dommages permanents, ainsi que d'interaction entre Plk1 et Chk1 similaires à ceux décrits entre les orthologues de S. cerevisiae (Rodriguez-Rodriguez et al., 2016; Syljuåsen et al., 2006). L'adaptation chez les cellules humaines a été mise en évidence en induisant un arrêt au checkpoint G2/M par irradiation infrarouge. Ces cellules ont maintenu l'arrêt environ 20h puis une partie d'entre elles a repris la division cellulaire. La persistance du dommage à l'ADN dans les cellules ayant pu se diviser est évaluée par la présence d'histones modifiés yH2AX (Syljuåsen et al., 2006). Au cours de la reprise de cycle cellulaire, Plk1 phosphorylerait et activerait la claspine, favorisant la déphosphorylation inhibitrice de Chk1. Par ailleurs, la dégradation de Plk1 est nécessaire à l'arrêt correct en G2, alors que son expression soutenue augmente la quantité de cellules en mitose (Verma et al., 2019). Ces phénomènes ressemblent à ceux observés chez S. cerevisiae, chez qui la surexpression de Cdc5 accélère et augmente le niveau d'adaptation (Vidanes et al., 2010). Les preuves d'existence de l'adaptation chez les mammifères en général ne sont cependant pas parfaites : par exemple, l'étude cherche à mettre en évidence l'adaptation dans un système qui permet difficilement de s'assurer que tout mécanisme de réparation est empêché, à la suite de dommages multiples par radiation (Syljuåsen et al., 2006). Distinguer l'adaptation de la *recovery* chez les mammifères est ardu pour plusieurs raisons : les mécanismes de réparation font intervenir plus de facteurs que chez la levure, et tous ne sont pas encore connus ; les systèmes d'induction des dommages sont moins bien contrôlés qu'en levure ; des mutants déficients en adaptation qui n'affectent pas la *recovery* restent à déterminer ; et Plk1 est nécessaire à la fois pour la *recovery* et l'adaptation (Lanz et al., 2019; Vugt and Medema, 2004).

4.2. Le mécanisme général de l'adaptation au dommage à l'ADN et l'implication de Cdc5 dans ce processus

4.2.1. L'extinction du signal du checkpoint pendant l'adaptation

Le mécanisme par lequel les cellules s'apprêtant à s'adapter parviennent à éteindre le *checkpoint* de dommage à l'ADN est encore en cours d'élucidation. De récentes études montrent que l'autophosphorylation de Mec1 en S1964 permet la désactivation du signal du *checkpoint*. Le mutant de phosphorylation *mec1-s1964a* présente un défaut d'adaptation, qui se traduit par le maintien de la forme hyperphosphorylée de Rad53 (Memisoglu et al., 2019). Pendant le temps de l'adaptation, la phosphorylation de Mec1 est retardée pendant plusieurs heures puis finit par apparaître, bien après que Mec1 a pu phosphoryler Ddc2, Rad9, Rad53 et l'histone H2A. Le mécanisme par lequel l'autophosphorylation de Mec1 est retardée reste en suspens (Waterman et al., 2020). Par ailleurs, Ddc2 est dégradée au moment de l'adaptation (Memisoglu et al., 2019). L'adaptation entraîne la déphosphorylation de Rad53 elle-même rendue possible grâce à la phosphorylation préliminaire de Rad53 par Cdc5, phénomène qui se produit 9 à 12h après l'induction du dommage (Lee et al., 1998; Vidanes et al., 2010). Mais l'adaptation peut aussi survenir alors que Rad53 est toujours hyperphosphorylée, comme décrit dans la partie 4.3. de cette introduction, et comme nous le mettrons nous-mêmes en évidence dans nos résultats, présentés dans l'article 1 (Coutelier, Ilioaia, Le Peillet et al., 2021).

4.2.2. L'importance de Cdc5 dans l'adaptation au dommage à l'ADN

La Polo-kinase Cdc5 a été identifiée comme étant un facteur clef de l'adaptation lors d'un crible réalisé sur les gènes impliqués dans l'adaptation en réponse à un dommage irréparable (Toczyski et al., 1997). Plusieurs résultats appuyant l'importance centrale de Cdc5 dans ce mécanisme sont détaillés ci-dessous.

Le rôle de Cdc5 en adaptation a été initialement démontré par l'étude du mutant ponctuel spécifiquement déficient en adaptation, *cdc5-ad* (mutation décrite en partie 1.2.1)

qui ne perturbe pas l'activité kinase de la protéine (Cheng et al., 1998; Rawal et al., 2016; Toczyski et al., 1997). Les cellules *cdc5-ad* subissant un dommage irréparable à l'ADN restent arrêtées de manière permanente au *checkpoint* G2/M. Dans le cas d'un dommage réparable induit par déstabilisation des télomères, les mutants *cdc5-ad* ne présentent pas de défaut de *recovery* (Jin and Wang, 2006; Vaze et al., 2002). Plusieurs hypothèses ont été proposées pour tenter d'expliquer le mécanisme par lequel *cdc5-ad* est déficient en adaptation : les mutants *cdc5-ad* ne parviennent pas à désactiver Rad53 (Pellicioli et al., 2001) ; ils ne sont pas capables d'activer la protéolyse dépendante de Clb2 d'APC/C (Charles et al., 1998) ; ils présentent un défaut de sortie de mitose (Jin and Wang, 2006; Rawal et al., 2016) ; la protéine mutante Cdc5ad est différemment localisée par rapport à Cdc5 sauvage en conditions de dommages (Rawal et al., 2016) (Fig. 11). Mais malgré ces hypothèses, le mécanisme expliquant l'incapacité des mutants *cdc5-ad* à s'adapter reste mal compris.

De nouvelles pistes de compréhension du mécanisme de l'adaptation sont apportées par un autre mutant déficient en adaptation : cdc5-16. Ce mutant présente trois mutations ponctuelles en C-terminal, W517F, H641A et K643M, l'empêchant d'interagir avec ses substrats via la reconnaissance canonique de phosphopeptide pS/pT par le PBD (Ratsima et al., 2016, 2011). Le mutant cdc5-16 n'est pas létal et parvient à effectuer la mitose avec une cinétique relativement normale, mais il présente en revanche un défaut dans le maintien de la ploïdie (Ratsima et al., 2011). Les cellules cdc5-16 sont capables d'activer le checkpoint de dommage à l'ADN de façon robuste par hyperphosphorylation de Rad53, mais cette hyperphosphorylation n'est que très transitoire par rapport à celle d'une souche sauvage. Le mutant cdc5-16 est donc moins spécifique de l'adaptation que cdc5-ad. En condition de dommage à l'ADN, la localisation de la protéine Cdc5-16 aux SPB est affectée pendant la mitose, ainsi que la capacité de son PBD à se lier à ses substrats et en particulier au complexe RSC, indiquant que le PBD serait une fonction essentielle de Cdc5 en adaptation aux dommages à l'ADN. Le défaut d'adaptation de cdc5-16 peut être corrigé en augmentant la concentration de Cdc5-16, ce qui laisse penser que son défaut en adaptation est dû à une diminution de sa capacité à interagir avec ses substrats et non à une incapacité totale (Ratsima et al., 2016). Nous nous sommes demandé s'il en était de même pour le mutant cdc5-ad et avons donc testé son effet dose-dépendant sur l'adaptation, et avons par ailleurs cherché à savoir si les mutants *cdc5-ad* et *cdc5-16* affectent les mêmes voies en adaptation, résultats qui seront présentés dans l'article 1 (Coutelier, Ilioaia, Le Peillet *et al.* 2021).

Une autre preuve de l'importance de l'activation de Cdc5 en adaptation est apportée par l'étude de la voie TORC1. Le complexe TORC1 (*Target Of Rapamycin Complex 1*) contrôle la croissance cellulaire en favorisant l'anabolisme et la biogenèse des ribosomes, et en inhibant l'autophagie. Le complexe TORC1 est activé lorsque les cellules poussent dans un milieu riche en nutriments, et est inhibé en condition de stress nutritionnel ou en présence de rapamycine (Wullschleger et al., 2006; Zheng et al., 1995). Il a été montré que TORC1 influence la transition G2/M en régulant la localisation de Cdc5 après induction d'une cassure doublebrin (Nakashima et al., 2008). L'inactivation de TORC1 favorise l'autophagie et provoque l'inhibition de Cdc5, empêchant l'adaptation dans les cellules en conditions de dommages irréparables (Klermund et al., 2014).

Par ailleurs, Cdc5 possède un effet dose-dépendant positif sur l'adaptation puisque sa surexpression accélère et augmente les niveaux d'adaptation. Le diploïde *CDC5/CDC5* s'adapte en effet plus vite et mieux que le diploïde *CDC5/cdc5Δ* (Vidanes et al., 2010). Par ailleurs, l'augmentation de l'expression de *CDC5* par induction d'un promoteur galactose accélère également l'adaptation (Vidanes et al., 2010). D'un point de vue mécanistique, la surexpression de Cdc5 inhibe la voie de signalisation dépendante de Mec1, conduisant à la déphosphorylation de Rad53, sans empêcher la génération de longs fragments d'ADN simplebrin, ni interférer avec la localisation des protéines du *checkpoint* au niveau du site du dommage (Donnianni et al., 2010; Melo et al., 2001).

Cdc5 est fortement phosphorylée en différents résidus en réponse à un dommage à l'ADN (Chang et al., 1998; Rodriguez-Rodriguez et al., 2016; Zhang et al., 2009). Le mutant *cdc5-T238A* présente un taux élevé de pertes de chromosomes et de réarrangements chromosomiques, preuves d'une stabilité génomique altérée (Rawal et al., 2016). Par ailleurs, le mutant *cdc5-T238A* présente une activité kinase fortement réduite, bien que la viabilité cellulaire ne soit pas altérée (Rawal et al., 2016; Rodriguez-Rodriguez et al., 2016). Le mutant *cdc5-T238A* affecte la dynamique de localisation de Cdc5 aux SPB et bloque la reprise du cycle cellulaire après induction d'une cassure double-brin irréparable. Le mutant *cdc5-T238A* confère donc un défaut d'adaptation au *checkpoint* de dommages à l'ADN, preuve de

l'importance de l'état de phosphorylation de Cdc5 et du rôle de son activité kinase en adaptation (Rawal et al., 2016; Rodriguez-Rodriguez et al., 2016).

L'ensemble de ces résultats montre que Cdc5 a une fonction dose-dépendante majeure en adaptation au dommage à l'ADN et que son état de phosphorylation est un paramètre important dans l'adaptation au dommage à l'ADN. Malgré son rôle central, Cdc5 est loin d'être le seul protagoniste de l'adaptation au dommage à l'ADN : de nombreuses autres protéines semblent fortement impliquées dans ce processus.

4.3. Description des nombreux facteurs impliqués dans l'adaptation au dommage à l'ADN

Ce chapitre présente une grande variété de mutants déficients en adaptation. Leur déficience est due à leur implication dans des phénomènes variés, preuve que l'adaptation implique plusieurs voies de signalisation et mécanismes (Fig. 11, Tableau 1).

4.3.1. L'état de phosphorylation de Rad53 joue un rôle dans la capacité des cellules à s'adapter

Les phosphatases de PP2C, Ptc2 et 3, permettent de déphosphoryler Rad53. Elles sont par ailleurs impliquées dans le *recovery*. Les mutants *ptc2* Δ et *ptc3* Δ maintiennent la forme hyperphosphorylée de Rad53, sont déficients en *recovery* et sont partiellement déficients en adaptation (Leroy et al., 2003; Vidanes et al., 2010; Waterman et al., 2020). Il a été montré que la surexpression de Cdc5 dans ces mutants de délétion réduit l'état de phosphorylation de Rad53 dans un contexte de dommage à l'ADN persistant, régulant à la baisse le *checkpoint* de dommage à l'ADN et restaurant partiellement la capacité d'adaptation de *ptc2* Δ et *ptc3* Δ (Vidanes et al., 2010). Le mécanisme proposé pour expliquer le défaut d'adaptation des mutants *ptc2* Δ et *ptc3* Δ concerne donc le rôle de Ptc2 et Ptc3 dans la régulation de la phosphorylation de Rad53 (Vidanes et al., 2010).

La phosphatase Ptc2 est par ailleurs elle-même phosphorylée par les sous-unités Ckb1 et Ckb2, qui constituent le complexe CKII, favorisant ensuite la déphosphorylation du domaine FHA (*Forkhead-Associated Domain*) de Rad53 par Ptc2. L'inactivation du domaine FHA permet l'extinction du *checkpoint* de dommage à l'ADN (Sun et al., 1998). La délétion de CKII empêche l'interaction de Ptc2 avec Rad53, maintenant la forme hyperphosphorylée de Rad53 et rendant les cellules déficientes en adaptation (Guillemain et al., 2007; Leroy et al., 2003; Toczyski et al., 1997).

Un autre mutant d'adaptation a été proposé comme déficient en adaptation en raison du maintien du signal du checkpoint et de l'état de phosphorylation de Rad53 (Vaze et al., 2002) : le mutant srs2^Δ. Srs2 est une hélicase essentielle à un certain nombre de mécanismes moléculaires telle que la réparation par HR. Srs2 permet par ailleurs de délocaliser Rad51 de l'ADN simple-brin - étape requise dans certaines voies de réparation - et d'activer Rad53 de manière complète en réponse à un dommage à l'ADN (Marini and Krejci, 2010). En ce qui concerne l'adaptation, le mutant srs2 Δ a un phénotype similaire à celui de rad51 Δ : pour ces deux mutants, le défaut d'adaptation est supprimé par la mutation *rad52* (Lee et al., 2003). Le défaut d'adaptation de srs2^Δ est de plus supprimé dans les mutants rad9^Δ et rad17^Δ (Vaze et al., 2002). Mais contrairement à rad51 Δ , le mutant srs2 Δ présente une déficience en recovery, défaut qui peut être restauré par la délétion de RAD51 (Lee et al., 2003). Il est proposé que la déficience en adaptation de ce mutant réside en son défaut à délocaliser certains complexes du checkpoint de dommage à l'ADN du site du dommage, à savoir Mec1-Ddc2 et/ou Rad17-Mec3-Ddc1, contribuant ainsi au maintien du signal du checkpoint et de l'état hyperphosphorylé de Rad53 (Vaze et al., 2002). Il a par la suite été montré que la phosphorylation de Srs2 - par un processus dépendant de Mec1, Dun1 et Rad53 - est requise dans le processus d'adaptation au dommage à l'ADN (Marini and Krejci, 2010).

L'incapacité à délocaliser le complexe Mec1-Ddc2 semble être la raison de la déficience en adaptation d'un autre mutant : *mec1-s1964a*, brièvement mentionné au chapitre 4.2.1. Ce mutant ponctuel, dont la sérine en position 1964 a été remplacée par une alanine, présente une activité kinase normale, maintient Rad53 sous sa forme hyperphosphorylée et induit un recrutement accru de Ddc2 au niveau du site du dommage (Memisoglu et al., 2019). La phosphorylation de Mec1 au niveau de sa sérine 1964 semble importante pour l'adaptation en permettant la délocalisation du complexe Mec1-Ddc2 du site du dommage et l'extinction subséquente du signal du *checkpoint* de dommage à l'ADN (Memisoglu et al., 2019).

Les mutants décrits jusqu'ici montrent que le niveau de phosphorylation de Rad53 semble impliqué dans l'adaptation au dommage à l'ADN. Or le niveau de phosphorylation d'une protéine peut être impacté par son état d'acétylation (Habibian and Ferguson, 2018). Il

se trouve que l'histone déacétylase Rpd3 joue un rôle dans le niveau d'acétylation de Rad53 (Tao et al., 2013). Rpd3 influence l'état de la chromatine, ce qui permet de réguler un ensemble de processus moléculaires telle que la transcription, l'autophagie ou encore la déacétylation de Rad53. Les mutants $rpd3\Delta$ présentent un défaut d'adaptation, mais aussi un niveau élevé d'acétylation de Rad53, augmentant l'activité kinase de celle-ci (Tao et al., 2013). En mutant les deux principaux sites d'acétylation de Rad53, il a été montré que l'activité de Rad53 est réduite et que le défaut d'adaptation de $rpd3\Delta$ est levé. L'ensemble de ces résultats semble indiquer que Rpd3 joue un rôle important dans la promotion de l'adaptation en déacétylant Rad53, conduisant à son inhibition (Tao et al., 2013).

Il existe beaucoup de mutants d'adaptation qui maintiennent Rad53 dans un état fortement activé. Nous en verrons d'autres dans les prochains paragraphes. Chez certains de ces mutants, et c'est le cas de ceux décrits ci-dessus, le lien entre le défaut d'adaptation et l'état de phosphorylation de Rad53 a été clairement mis en évidence, montrant que l'activité de Rad53 joue un rôle important dans l'adaptation au dommage à l'ADN (Fig. 11). D'autres mutants d'adaptation semblent en revanche déficients pour d'autres raisons.

4.3.2. Le niveau de résection semble impacter la capacité d'adaptation

Nombre de mutants déficients en adaptation présentent un défaut de résection. Le mutant *mec1-ad* est déficient en adaptation et entrave la résection intensive aux sites du dommage (Clerici et al., 2006). Ce mutant est généré par quatre substitutions : N310G, K697T, Y944F et Q961K (Clerici et al., 2006). Fait notable, lorsque la nucléase Exo1 est absente dans *mec1-ad*, les cellules retrouvent leur capacité à s'adapter, résultat qui montre un lien clair entre la résection et l'adaptation (Clerici, 2014). Par ailleurs, l'arrêt prolongé provoqué par *mec1-ad* est supprimé par la délétion de *TEL1* (Clerici et al., 2006), fait également observé chez d'autres mutants déficients en résection comme par exemple *sgs1*Δ, *dna2*Δ et *sae2*Δ (mutants détaillés dans les prochains paragraphes) (Clerici et al., 2006). L'ensemble de ces résultats semble indiquer que l'activation de la kinase Tel1 est responsable du défaut d'adaptation dans les mutants déficients en résection (Beyer and Weinert, 2014; Clerici et al., 2006).

Le mutant de délétion *sae2*Δ, chez qui la résection est altérée, est déficient en adaptation dans le contexte d'une cassure HO (Clerici et al., 2006), mais s'adapte dans le

contexte *cdc13-1* (Clerici et al., 2006; Ratsima et al., 2016). Il a été proposé (Clerici et al., 2006) que le défaut d'adaptation de *sae2* Δ est dû à un recrutement accru et persistant du complexe MRX au niveau du site du dommage. Par ailleurs, le mutant *sgs1-ss* supprime le défaut d'adaptation de *sae2* Δ (Bonetti, 2015). Le mutant *sgs1-ss* se lie aux extrémités du site du dommage et favorise une plus forte résection comparée à *SGS1* sauvage (Bonetti, 2015). Ces résultats suggèrent que la déficience en adaptation du mutant *sae2* Δ est causée par une résection trop faible.

Le défaut d'adaptation du mutant *sae2* Δ peut être partiellement corrigé par la délétion du complexe KU, qui restaure aussi la capacité d'adaptation du mutant *mre11-nd* (*nucléasedeficient*) (Mimitou, 2010). Les mutants *yku70* Δ et *yku80* Δ sont déficients en adaptation – mais pas en *recovery* (Vaze et al., 2002) –, phénotype qui semble être lié au changement dans la cinétique de la résection, qui se produit alors deux fois plus rapidement que chez *yKU70* et *yKU80* sauvages (Lee and Myung, 2008). Par ailleurs, le défaut d'adaptation des mutants *ku* peut être supprimé en délétant *MRE11*, résultat qui appuie l'hypothèse reliant les mutants *ku* à la résection, puisque *mre11* Δ ralentit la résection (Lee and Myung, 2008). Le défaut d'adaptation de *yku70* Δ peut aussi être corrigé par le mutant *rfa1-t11* (Lee et al., 1998), qui présente un défaut sévère dans la recombinaison homologue des cassures provoquées par HO (Umezu et al., 1998). Le fait que le double mutant *yku70* Δ *rfa1-t11* puisse s'adapter indique que le complexe RPA joue un rôle clef en adaptation et semble réguler la détection d'ADN simple-brin (Lee et al., 1998).

Des protéines impliquées dans la réparation et le *recovery* jouent aussi un rôle en adaptation au dommage à l'ADN. Par exemple, les cellules *rad51* Δ présentent un défaut modéré d'adaptation au dommage à l'ADN, sans que leurs mécanismes de résection ne soient impactés (Lee et al., 2003). Il a été montré que ce défaut d'adaptation survient lorsque Rad51 ne peut pas interagir avec Rad52. En effet, le mutant *rad51-K191A* – qui empêche la recombinaison et la liaison de Rad51 à l'ADN simple-brin au niveau du dommage – maintient son interaction avec Rad52 et ne présente pas de défaut d'adaptation (Lee et al., 2003). Par ailleurs, *rad52* Δ supprime le défaut d'adaptation de *rad51* Δ (Epum et al., 2020; Lee et al., 2003). Il a de plus été montré que – à l'instar de *yku70* Δ – le défaut d'adaptation de *rad51* Δ peut être partiellement corrigé par la mutation *rfa1-t11* (Lee et al., 2003). Beaucoup de mutants ont

été testés en combinaison de *rad51* Δ , et l'ensemble des résultats obtenus semble indiquer que la déficience en adaptation de *rad51* Δ dépend du *checkpoint* de dommage à l'ADN, mais *via* un autre mécanisme que ceux de *yku70* Δ , *rdh54* Δ (décrit au paragraphe suivant) et *cdc5ad* (Lee et al., 2003).

Rad51 interagit par ailleurs avec Rdh54/Tid1 (Dresser et al., 1997). En présence d'un dommage irréparable de l'ADN, le mutant rdh54 Δ ne présente pas non plus de défaut de recovery (Vaze et al., 2002) et provoque un arrêt en G2/M permanent semblable à celui du mutant yku70∆ (Lee et al., 2001), à la différence près que rdh54∆ n'affecte pas la vitesse de résection. De même que le mutant yku70∆ en revanche, et comme c'est le cas du mutant $rad51\Delta$, le défaut d'adaptation de $rdh54\Delta$ peut lui aussi être corrigé par la mutation rfa1-t11 (Lee et al., 2001). Par ailleurs, il a été montré que l'activité ATPase de Rdh54 est requise dans son rôle dans l'adaptation (Lee et al., 2001). Rdh54 est phosphorylée de manière dépendante de Mec1 et Rad53 en conditions de dommages (Ferrari 2013), mais ses ressemblances avec Cdc5 ne vont pas plus loin puisqu'il a été montré que leur rôle en adaptation se distingue clairement l'un de l'autre. Une des différences majeures est que le double mutant cdc5-ad rfa1-t11 ne s'adapte pas (Lee et al., 2001; Toczyski et al., 1997). Par ailleurs, comme Cdc5, Rdh54 favorise l'adaptation en sénescence (Coutelier et al., 2018). L'ensemble des données obtenues semble indiquer que le rôle de Rdh54 en adaptation est indépendant de son implication dans le processus de recombinaison, mais dépend plutôt de sa capacité à évaluer la quantité d'ADN simple-brin (Lee et al., 2001).

Le niveau de déficience du mutant $rdh54\Delta$ est comparable à celui du mutant $fun30\Delta$ qui prolonge de même l'hyperphosphorylation de Rad53. Le mutant $fun30\Delta$ se distingue cependant fortement du mutant $rdh54\Delta$ en ce qu'il impacte la résection : en effet, le mutant $fun30\Delta$ présente un taux de résection trois fois moindre que le sauvage (Eapen et al., 2012). Fun30 est un remodeleur de la chromatine, recruté aux cassures double-brin. Il est impliqué dans la régulation de la résection de manière dépendante de Exo1 et de Sgs1, probablement en interagissant directement avec les nucléosomes. Il est proposé que le rôle de Fun30 dans la promotion de la résection soit inhibé par la présence de γ -H2A et que le défaut d'adaptation de $fun30\Delta$ soit lié à son impact sur la résection (Eapen et al., 2012). Les délétions de *EXO1* et de *SGS1* seules dans le contexte *cdc13-1* ne présentent pas de défaut d'adaptation, mais leur délétion simultanée induit l'arrêt permanent au *checkpoint* G2/M (Markiewicz-Potoczny and Lydall, 2016; Zhu et al., 2008).

L'ensemble des résultats présentés ici semble indiquer un lien fort entre l'adaptation et la quantité d'ADN simple-brin : les mutants déficients en adaptation concernent à la fois des mutants provoquant une résection exacerbée, des mutants ayant une résection inhibée et des mutants ayant des défauts dans l'évaluation de la quantité d'ADN simple-brin. Ce lien entre résection et adaptation soutient l'idée que l'adaptation serait finement régulée par la quantité d'ADN simple-brin (Fig. 11).

4.3.3. La dynamique de séquestration et de dégradation des protéines mitotiques impacte l'adaptation

La délétion de composants du *Golgi-Associated Retrograde Protein complex* (GARP), tels que *VPS51* et *YPT6*, perturbe l'adaptation et la *recovery* (Eapen and Haber, 2013). Ce résultat suggère l'existence d'une transmission de signaux complexes entre le cytoplasme et le noyau en réponse à un dommage à l'ADN (Dotiwala et al., 2013). Les mutants de délétion *vps51* Δ et *ypt6* Δ font partie des mutants non canoniques dans leur déficience en adaptation puisque Rad53 y est déphosphorylée (Eapen and Haber, 2013). Ces mutants GARP présentent un défaut de localisation de la sécurine Pds1, empêchant sa dégradation dans la vacuole par la protéase Prb1, et excluent la séparase Esp1 du noyau qui ne peut alors plus dissocier la cohésine, favorisant l'arrêt du cycle cellulaire avant le début de l'anaphase (Ciosk et al., 1998; Eapen and Haber, 2013).

Par ailleurs, la surexpression de *atg13-8SA* (un allèle dominant et actif de *ATG13*) empêche également l'adaptation et la *recovery* (Eapen and Haber, 2013). *ATG13* est impliquée dans la voie *cytoplasm-to-vacuole targeting* (Cvt), dont la suractivation augmente l'autophagie. Les mutants du GARP et la surexpression de *atg13-8SA* affectent l'adaptation selon un mécanisme qu'ils ont en commun avec l'inhibition de la voie TORC1 : ils favorisent l'autophagie et perturbent la dynamique des gènes mitotiques (Dotiwala et al., 2013; Eapen and Haber, 2013).

Les similitudes provoquées par les perturbations des voies TORC1, GARP et Cvt suggèrent que l'autophagie joue un rôle important dans la *recovery* mais aussi dans l'adaptation au dommage à l'ADN, et que les dommages à l'ADN induisent de profonds changements dans la dynamique de séquestration ou de dégradation des protéines cytoplasmiques telles que Pds1 et Esp1, impactant fortement l'adaptation (Fig. 11).

4.3.4. Les modifications d'histones influencent l'adaptation

Nous allons ici aborder le rôle de deux histones mettant en lumière le lien entre le réarrangement de la chromatine et l'adaptation : les histones H2A et H2B (Fig. 11).

En réponse à un dommage à l'ADN, la phosphorylation des histones H2A situés à proximité du dommage est favorisée par à la sous-unité Ino80 d'un complexe remodeleur de la chromatine INO80 (Papamichos-Chronakis et al., 2006; Shen et al., 2000). Le mutant *ino80* est déficient en adaptation en raison de son incapacité à supprimer certains variants d'histones H2A du site du dommage, empêchant l'extinction du *checkpoint* de dommage à l'ADN (Eapen et al., 2012).

L'histone H2B subit lui aussi une modification dépendante de la réponse au dommage à l'ADN : il est ubiquitinylé sur la lysine en position 123 par le complexe Rad6-Bre1, et favorise la méthylation de l'histone H3 (Nakanishi et al., 2009). En plus de l'implication de ce mécanisme dans la réponse au dommage à l'ADN, il a été montré que cette ubiquitinylation joue un rôle dans les cancers (Wang et al., 2013). Le mutant de substitution N123R sur l'histone H2B empêche cette ubiquitinylation et déclenche une adaptation précoce malgré un taux de résection élevé, preuve supplémentaire que la résection n'est pas l'unique signal responsable de l'adaptation (Waterman et al., 2020). H2B semble donc jouer un rôle en adaptation en rapport avec son implication dans le réarrangement de la chromatine par méthylation des histones.

* *

L'ensemble de ces données montre la diversité des mécanismes moléculaires impliqués dans l'adaptation : l'état de phosphorylation de Rad53 ; le contrôle de la quantité d'ADN simple-brin ; l'autophagie et la dynamique de séquestration et de dégradation des protéines mitotiques ; la modification des histones H2A et H2B (Fig. 11, Tableau 1). Nos travaux participent à l'élargissement des connaissances sur la multiplicité des voies Page | 84 métaboliques impliquées dans l'adaptation, résultats qui seront abordés dans les articles 1 et 2.



Figure 11. Diversité des voies impactant l'adaptation : l'hyperphosphorylation de Rad53, le niveau de résection et l'évaluation de la quantité d'ADN simple-brin, l'autophagie et la dynamique de séquestration des protéines (TORC1, GARP, Cvt), les modifications d'histones et l'action de Cdc5.

L'inhibition de l'adaptation au dommage à l'ADN empêche les cellules endommagées de se diviser et de générer de l'instabilité génomique chez les cellules filles. Chez l'homme, le mécanisme d'adaptation au dommage à l'ADN semble jouer un rôle important dans l'émergence et la propagation des cancers, et Plk1 semble fortement impliquée dans ces processus. L'implication de Plk1 dans les cancers humains est détaillée dans la partie suivante.
 Tableau 1. Récapitulatif des mutants d'adaptation et du mécanisme sous-jacent

Mutants d'adaptation	Mécanismes par lesquels ces mutants sont déficients	Références
ptc2∆	Défaut de déphosphorylation de Rad53	Vidanes 2009
ptc3∆ ckb2∆	Défaut de déphosphorylation de Rad53 par Ptc2	Sun 1998, Toczyski 1997, Leroy 2003
srs2∆	Défaut de délocalisation de Mec1-Ddc2 et/ou Rad17- Mec3-Rad53	Vaze 2002
rad51∆	Défaut d'interaction avec Rad52, empêchant la délocalisation du complexe RPA	Lee 2003
mec1-s1964a	Défaut de délocalisation du complexe Mec1-Ddc2 du site du dommage, empêchant l'extinction du <i>checkpoint</i>	Memisoglu 2019
rpd3∆	Défaut de déacétylation de Rad53	Tao 2013
mec1-ad	Suractivité de la résection	Clerici 2006, Veyer 2014
sgs1∆	Défaut de résection	(Eapen et al. <i>,</i> 2012)
dna2∆	Défaut de résection	Zhu 2008
sae2∆	Défaut de résection	Clerici 2006, Ratsima 2016, Bonetti 2015
yku70∆	Suractivité de la résection Défaut de recrutement du complexe RPA	Lee 1998, Lee 2008
yku80Δ		
rdh54∆	Défaut d'évaluation de la quantité d'ADN simple-brin	Lee 2011
fun30∆	Défaut de résection	Eapen 2012
vps51∆	Défaut de dégradation de la sabésina	Ciosk 1998,
ypt6∆	Defaut de degradation de la conesine	Eapen 2013
surexpression d' <i>atg13-8SA</i>	Suractivation de l'autophagie Perturbation de la dynamique des gènes mitotiques	Eapen 2013
ino80∆	Défaut de déphosphorylation d'H2A, empêchant la désactivation du <i>checkpoint</i>	Eapen 2012
mre11-nd	Défaut d'activité nucléase	Mimitou 2010

5. L'adaptation est un mécanisme qui semble impliqué dans l'émergence des cancers

Il est intéressant de remarquer que l'orthologue humain de Cdc5, Plk1, est surexprimé dans plusieurs types de cancers et cette surexpression est associée à de mauvais pronostics de survie des patients (Liu et al., 2017). Plusieurs études montrent l'existence d'interactions entre Plk1 et la protéine suppressive de tumeurs p53 (Iliaki et al., 2021). p53 est perturbée dans plus de 50% des cancers humains, dans lesquels sa fonction de protection des cellules contre les lésions de l'ADN et le stress cellulaire n'est plus assurée (Vazquez et al., 2008; Whibley et al., 2009). La protéine p53 est activée en réponse à un dommage à l'ADN et promeut l'arrêt du cycle cellulaire et, si nécessaire, l'apoptose.

Lorsque le dommage à l'ADN est réparé, des interactions complexes entre p53 et Plk1 permettent l'activation de Plk1, favorisant la sortie du *checkpoint* de dommage à l'ADN et la *recovery* (Iliaki et al., 2021; Liu et al., 2017). Plk1 joue en effet un rôle essentiel dans la *recovery*, qu'elle promeut *via* plusieurs voies. L'une d'elles passe par la phosphorylation de la claspine par Plk1. La claspine contrôle l'activation de Chk1 par ATR. En induisant la dégradation de la claspine au protéasome, Plk1 promeut l'avancée du cycle cellulaire. Plk1 favorise également la reprise du cycle cellulaire *via* Gtse, en permettant la dégradation Gtse1-dépendante de p53 au moment de la désactivation du *checkpoint* de dommages à l'ADN, mécanisme nécessaire à la *recovery*. Plk1 peut aussi promouvoir la dégradation de p53 au protéasome de manière indirecte, *via* la protéine de liaison de la topoisomérase-1 (TOPORS), phosphorylée par Plk1. L'ensemble de ces mécanismes de dégradation induits par Plk1 lui permet de réguler l'entrée en mitose (Iliaki et al., 2021).

Mais lorsque le dommage n'est pas réparable, Plk1 permet la reprise du cycle cellulaire malgré la persistance du dommage, rendant Plk1 actrice de la prolifération de cellules précancéreuses (Iliaki et al., 2021; Liu et al., 2017). Lorsque la machinerie cellulaire parvient à maintenir l'intégrité du génome, Plk1 est inhibée par p53 en présence d'un dommage non réparé, favorisant l'apoptose de la cellule endommagée. Des études ont montré que l'inhibition de Plk1 dans des cellules dépourvues de p53 réduit l'apparition de tumeurs et il semblerait que ces mêmes cellules, lorsque soumises à un stress, soient très sensibles aux inhibiteurs de Plk1. Or comme nous l'avons mentionné plus haut, l'inhibition de Plk1 dans les

cellules cancéreuses est altérée, et Plk1 se retrouve au contraire surexprimée. Cette surexpression provoque la régulation négative de p53, notamment en raison de la liaison Plk1p53 qui empêche p53 d'induire l'apoptose (Liu et al., 2017).

Malgré l'activité oncogène de Plk1, cette protéine joue un rôle ambivalent dans les cancers, car elle peut aussi agir en tant que suppresseur de tumeurs dans certaines circonstances (de Cárcer et al., 2018). Par exemple, la surexpression de Plk1 a été montrée comme étant corrélée avec un taux de survie plus important des patients atteints du cancer du sein. De plus, toujours dans les cas de cancers du sein, Plk1 semble réguler l'expression de gènes suppresseurs de tumeurs et œstrogène-dépendants (Iliaki et al., 2021).

*

L'ensemble de ces résultats suggère que Plk1 agit globalement en faveur de la formation de tumeurs et que son inhibition pourrait apporter une réponse nouvelle à la lutte contre le cancer. Mais l'inhibition de Plk1 lors de traitements anticancéreux doit prendre en compte ses rôles potentiellement suppresseurs de tumeurs et le risque de compromettre des fonctions essentielles au sein du cycle cellulaire. De plus, les inhibiteurs de Plk1 doivent être suffisamment spécifiques pour ne pas cibler en même temps les autres Plk, qui ont non seulement des spécificités différentes, mais qui peuvent en plus parfois présenter des fonctions opposées à celles de Plk1. Comme les kinases présentent des structures et des séquences très semblables, en particulier au niveau de leur site actif, il est complexe de développer des inhibiteurs spécifiques de Plk1. Cibler les PBD pourrait permettre d'y parvenir, puisqu'il s'agit d'un domaine propre aux Plk et qui diffère d'une Plk à une autre (Archambault et al., 2015).

Plusieurs inhibiteurs de Plk1 sont déjà l'objet d'essais cliniques : certains ciblent en effet le PBD, d'autres le domaine de liaison à l'ATP par exemple (Gutteridge et al., 2016). Récemment, les tests cliniques ont concerné des inhibiteurs ciblant le traitement du cancer colorectal et du cancer de la prostate (Cerrito and Grassilli, 2021; Ramos et al., 2019). Néanmoins la plupart des molécules prometteuses testées jusqu'ici se sont avérées décevantes en raison de la faible réponse thérapeutique et d'une toxicité importante. Certains inhibiteurs de Plk1 ont provoqué des effets secondaires graves, concernant par exemple des

défauts d'assemblage du fuseau mitotique et de la stabilité chromosomique, menant à l'augmentation des anomalies chromosomiques et de la tumorigenèse (Iliaki et al., 2021).

Déceler les substrats de Cdc5 et les autres protéines impliquées dans l'adaptation au *checkpoint* de dommage à l'ADN chez *S. cerevisiae*, pourrait donc permettre de grandes avancées en recherche en oncologie, en plus d'alimenter le socle des connaissances fondamentales sur le mécanisme biologique de l'adaptation au dommage à l'ADN.

* * *

Cette introduction nous a permis d'embrasser la multitude des fonctions assurées par Cdc5 au cours d'un cycle cellulaire normal et en réponse à un dommage à l'ADN. Elle nous a aussi permis de comprendre la complexité de l'adaptation au dommage à l'ADN. Plusieurs inconnues et éléments intrigants ont été relevés en regard des connaissances actuelles.

Cdc5 est une protéine essentielle à l'adaptation au dommage à l'ADN, et pourtant sa quantité diminue au cours de ce processus. Le mécanisme de dégradation actuellement connu de Cdc5 a été élucidé dans un contexte cellulaire de surexpression de Cdc5 avec un arrêt artificiel en G1. Il n'a pas été investigué en réponse à l'arrêt en G2/M jusqu'à nos travaux, qui ont révélé une dégradation spécifique de Cdc5 et du mutant Cdc5-ad en réponse à un dommage à l'ADN persistant (articles 1 & 2). La mutation cdc5-ad est intrigante : alors qu'elle n'est générée que par la substitution ponctuelle d'un seul acide aminé, elle confère une déficience forte en adaptation avec une haute spécificité, puisqu'elle ne semble présenter aucun autre défaut dans les multiples fonctions de Cdc5 au cours du cycle cellulaire et notamment pas de défaut de recovery. Aujourd'hui encore, le mécanisme par leguel cdc5-ad empêche l'adaptation n'est toujours pas connu. Plusieurs régulations de Cdc5 ont été recensées comme jouant un rôle dans l'adaptation au dommage à l'ADN, tels que son effet dose-dépendant et son état de phosphorylation. Nous avons donc poussé les recherches plus loin en étudiant l'effet dose-dépendant de Cdc5-ad sur l'adaptation et en déterminant les mécanismes de régulations transcriptionnelles et post-traductionnelles de Cdc5 et de Cdc5ad spécifique de la réponse à un dommage à l'ADN persistant (voir article 1). Nous avons aussi mené des études génétiques à grande échelle qui ont contribué à l'avancée des connaissances sur le défaut d'adaptation de *cdc5-ad* en révélant des mutations capables de restaurer sa capacité d'adaptation. Cette approche génétique a de plus permis de caractériser la létalité synthétique de cdc5-ad en regard de plusieurs gènes (voir article 2). En somme, nos différents travaux apportent un nouveau regard sur la complexité de l'adaptation et la grande variété des processus impliqués.

Il semblerait que les mécanismes de progression du cycle cellulaire et ceux de réponse au dommage à l'ADN soient intimement liés dans l'adaptation au dommage à l'ADN. Les voies métaboliques spécifiques de l'adaptation trouvent leurs substrats parmi les protéines impliquées dans le cycle cellulaire, comme c'est par exemple le cas de Cdc5, et dans les processus de réparation des dommages à l'ADN. Mes travaux de thèse convergent vers la problématique suivante :

Comment la coordination de deux systèmes, le cycle cellulaire et le checkpoint de dommage à l'ADN, permet l'adaptation au dommage à l'ADN ?

Nous aborderons dans l'article 1 notre étude des régulations transcriptionnelles et post-traductionnelles de Cdc5 et de Cdc5-ad en réponse à une dysfonction télomérique, et dans l'article 2 une analyse globale des gènes et voies métaboliques potentiellement impliqués dans l'adaptation au dommage à l'ADN. L'ensemble de nos résultats sera ensuite discuté en fin de manuscrit.

Résultats

0

٥h

e Le Voille

0000000

0

Ø

R

0

10

0

e.

Résultats

0

0

0

0

0

90

99

0

 δ

لعل

200

V N

Article 1 : Cdc5 est régulée à plusieurs niveaux, transcriptionnellement et post-traductionnellement, en réponse à un dommage à l'ADN provoqué par déstabilisation des télomères.

Cdc5 est une protéine impliquée dans une myriade de processus essentiels à la survie de la cellule. Elle est régulée sur de multiples niveaux, comprenant sa localisation, des modulations de son expression et des modifications post-traductionnelles. Son rôle majeur dans l'adaptation a été démontré, et pourtant le mécanisme permettant à Cdc5 de jouer ce rôle reste en suspens.

Nous avons émis l'hypothèse que Cdc5 est régulée de manière spécifique en réponse à un dommage à l'ADN, lui permettant de contourner l'arrêt au *checkpoint* G2/M. Nous avons donc étudié et comparé les régulations transcriptionnelles et post-traductionnelles de Cdc5 et de Cdc5-ad dans le contexte d'un dommage à l'ADN persistant, provoqué par le mutant thermosensible *cdc13-1*. Nos travaux ont révélé que l'expression des gènes *CDC5* et *cdc5-ad* est négativement régulée en réponse à un dommage *via* l'action de Mec1, Rad53 et Ndd1. Nous avons aussi mis en évidence que la phosphorylation de certains sites de Cdc5 et de Cdc5ad affecte l'adaptation. L'ensemble de nos résultats nous a permis de proposer un modèle de régulation de l'adaptation par Cdc5 grâce à l'activation de plusieurs voies métaboliques, montrant la complexité des régulations de Cdc5 lors d'un événement d'adaptation.

Ces travaux ont été démarrés avant mon arrivée au laboratoire, par Héloïse Coutelier qui était alors en thèse avec Zhou Xu et Teresa Teixeira. J'ai ensuite pris la relève des hypothèses qui avaient été soulevées alors, et ai travaillé aux côtés d'Oana Ilioaia tout au long de ce projet pour tester de nouvelles pistes de recherches et finalement mener ces travaux à leur terme. Ma principale contribution sur cette étude concerne l'effet du niveau protéique de Cdc5 et de Cdc5-ad sur l'adaptation, que j'ai évalué dans différentes conditions : surexpression, altération de l'inhibition de l'expression par Ndd1 et Rad53, inhibition de la dégradation, etc.

Title: The Polo kinase Cdc5 is regulated at multiple levels in the adaptation response to telomere dysfunction

Short title: Regulation of Cdc5 in adaptation

Authors: Héloïse Coutelier^{1,2,*}, Oana Ilioaia^{2,*}, Jeanne Le Peillet^{2,*}, Marion Hamon³, Damien D'Amours⁴, Maria Teresa Teixeira¹, Zhou Xu².

Affiliations:

¹Sorbonne Université, PSL, CNRS, UMR8226, Institut de Biologie Physico-Chimique, Laboratoire de Biologie Moléculaire et Cellulaire des Eucaryotes, F-75005 Paris, France

²Sorbonne Université, CNRS, UMR7238, Institut de Biologie Paris-Seine, Laboratory of Computational and Quantitative Biology, 75005 Paris, France

³Sorbonne Université, PSL, CNRS, FR550, Institut de Biologie Physico-Chimique, F-75005 Paris, France

⁴Ottawa Institute of Systems Biology, Department of Cellular and Molecular Medicine, University of Ottawa, Roger Guindon Hall, 451 Smyth Road, Ottawa, ON K1H 8M5, Canada

*These authors contributed equally to the work.

Abstract:

Telomere dysfunction activates the DNA damage checkpoint to induce a cell cycle arrest. After an extended period of time, however, cells can bypass the arrest and undergo cell division despite the persistence of the initial damage, a process called adaptation to DNA damage. The Polo kinase Cdc5 in *Saccharomyces cerevisiae* is essential for adaptation and for many other cell cycle processes. How the regulation of Cdc5 in response to telomere dysfunction relates to adaptation is not clear. Here, we report that Cdc5 protein level decreases after telomere dysfunction in a Mec1-, Rad53- and Ndd1-dependent manner. This regulation of Cdc5 is important to maintain long-term cell cycle arrest but not for the initial checkpoint arrest. We find that both Cdc5 and the adaptation-deficient mutant protein Cdc5-ad are heavily phosphorylated and several phosphorylation sites modulate adaptation efficiency. The PP2A phosphatases are involved in Cdc5-ad phosphorylation status and contribute to adaptation mechanisms. We finally propose that Cdc5 orchestrates multiple cell cycle pathways to promote adaptation.

Keywords:

Adaptation to DNA damage, Polo kinase Cdc5, PP2A, DNA damage checkpoint, Telomere

Introduction

In response to DNA damage, cells ensure genome stability by repairing the initial injury. The DNA damage checkpoint (DDC) detects and processes the damage, and arrests the cell cycle to provide time for repair. The coordination between the cell cycle and the repair pathways ensured by the DDC is essential to prevent chromosome segregation with unrepaired damage. When the cell fails to repair the damage, a process called adaptation to DNA damage allows the bypass of the checkpoint arrest and completion of mitosis despite the presence of unrepaired DNA damage, thus inducing genome instability (Galgoczy & Toczyski, 2001, Lee, Moore et al., 1998, Sandell & Zakian, 1993, Toczyski, Galgoczy et al., 1997). In unicellular eukaryotes, adaptation may be viewed as a survival strategy for cells experiencing unrepairable damage that can be asymmetrically segregated into daughter cells or be dealt with in the next cell cycle (Coutelier, Xu et al., 2018, Galgoczy & Toczyski, 2001, Kaye, Melo et al., 2004, Roux, Salort et al., 2021). In mammals though, adaptation may contribute to tumor emergence and progression by evading checkpoint control and promoting genome instability (Gutteridge, Ndiaye et al., 2016, Strebhardt & Ullrich, 2006). While the mechanisms and factors involved in the DDC and repair pathways have been studied for decades, our understanding of adaptation to DNA damage is more limited.

In the model organism *Saccharomyces cerevisiae*, a double-strand break (DSB) is signaled by the phosphatidylinositol-3'-kinase-like kinases (PIKK) Tel1 and Mec1. Mec1 phosphorylates the adaptor protein Rad9 and the kinases Rad53 and Chk1, which are recruited to Rad9. The full activation of Rad53 requires an additional autohyperphosphorylation step. Both Rad53

and Chk1 activation promote the stability of securin Pds1 to prevent chromosome segregation (Agarwal, Tang et al., 2003, Cohen-Fix & Koshland, 1997, Sanchez, Bachant et al., 1999). Phosphorylated Rad53 inhibits the mitotic exit network (MEN) by targeting the Polo kinase Cdc5 (Cheng, Hunke et al., 1998, Sanchez et al., 1999) and triggers a transcriptional response, which includes the direct inhibition of the transcriptional activator Ndd1, controlling the expression of the CLB2 cluster of mitotic genes (Edenberg, Vashisht et al., 2014, Gasch, Huang et al., 2001, Jaehnig, Kuo et al., 2013, Spellman, Sherlock et al., 1998, Yelamanchi, Veis et al., 2014). When no repair is possible, cells stay arrested for 4 to 16 hrs but then undergo adaptation to DNA damage and alleviate the DDC arrest by returning Rad53 and Chk1 to their unphosphorylated state (Lee, Pellicioli et al., 2000, Pellicioli, Lee et al., 2001), while maintaining the upstream part of the DDC largely intact (Donnianni, Ferrari et al., 2010, Melo, Cohen et al., 2001, Vidanes, Sweeney et al., 2010). Besides DSBs, telomere dysfunction is also perceived by the cell as a persistent DNA damage, and has been widely used as a model to study the DDC and adaptation. Telomere dysfunction can be induced by the conditional loss of Cdc13, an essential factor for telomere protection, which is achieved by placing the cdc13-1 mutant at restrictive temperature to generate resected telomeres and activate the DDC (Garvik, Carson et al., 1995, Toczyski et al., 1997).

Cdc5 is an essential kinase of the cell cycle regulating a variety of processes in mitosis and cytokinesis (Botchkarev & Haber, 2018). Cdc5's expression starts at S phase and increases in the later phases of the cell cycle until cytokinesis (Charles, Jaspersen et al., 1998, Cheng et al., 1998, Shirayama, Zachariae et al., 1998), consistent with *CDC5* belonging to the cell cycle regulated *CLB2* cluster of genes, whose coordinated expression strongly depends on the

Jeanne Le Peillet

transcription factor complex consisting of Mcm1, Fkh2 and Ndd1 (coactivator) or Isw2 (corepressor) (Koranda, Schleiffer et al., 2000, Sherriff, Kent et al., 2007, Spellman et al., 1998, Zhu, Spellman et al., 2000). Phosphorylation by the cyclin-dependent kinase 1 (Cdk1) is required to stabilize Cdc5 (Crasta, Lim et al., 2008, Simpson-Lavy & Brandeis, 2011). After mitosis, Cdc5 is ubiquitinated by the anaphase promoting complex (APC) associated with Cdh1 and targeted for proteasomal degradation (Charles et al., 1998). The kinase activity of Cdc5 depends on phosphorylation by Cdk1 and potentially other kinases at several sites, including amino acids T70, T238 and T242 (Mortensen, Haas et al., 2005, Rawal, Riccardo et al., 2016, Rodriguez-Rodriguez, Moyano et al., 2016). Among the several mutants of adaptation that have been identified over the past two and a half decades (Harrison & Haber, 2006, Serrano & D'Amours, 2014), a point mutant allele of CDC5, called cdc5-ad (for "adaptation-defective"; L251W), is specific for adaptation and does not seem to affect most other functions of Cdc5 in a normal cell cycle (Charles et al., 1998, Rawal et al., 2016, Toczyski et al., 1997). Besides, overexpression of Cdc5 accelerates adaptation, suggesting that Cdc5 plays a promoting role in adaptation (Donnianni et al., 2010, Hu, Wang et al., 2001, Sanchez et al., 1999, Vidanes et al., 2010). However, despite its central role in adaptation, how Cdc5 is regulated in response to DNA damage is not well characterized. In studies on global gene expression in response to alkylating agent methyl methane sulfonate (MMS) treatment and gamma irradiation, CDC5 transcripts were found to be decreased in a MEC1- and RAD53-dependent manner (Edenberg et al., 2014, Gasch et al., 2001, Jaehnig et al., 2013). In contrast, Cdc5's protein level and kinase activity in response to MMS or telomere dysfunction have not been conclusively established as reports differed in their experimental conditions and conclusions (Charles et al., 1998, Cheng et al., 1998, Hu et al., 2001, Maas, Miller et al., 2006, Ratsima, Serrano et al., 2016, Rawal et al., 2016, Vidanes et al., 2010, Zhang, Nirantar et al., 2009).

Here, we investigate the regulation of Cdc5 and the adaptation-defective mutant Cdc5-ad in response to telomere dysfunction. We find that the DDC induces a Mec1/Rad53- and Ndd1-dependent downregulation of Cdc5 expression, which is critical to prevent cells from adapting prematurely. We also identify phosphorylation sites of Cdc5/Cdc5-ad that are involved in the adaptation response to telomere dysfunction. We finally propose that Cdc5 acts in multiple pathways to control adaptation, which might explain the complexity of Cdc5's regulation in response to telomere dysfunction.

Results

Cdc5 protein level decreases in response to telomere dysfunction

To understand how Cdc5 is regulated in response to DNA damage, we induced telomere deprotection by incubating *cdc13-1* cells at the restrictive temperature of 32°C and analyzed C-terminally 3xHA-tagged Cdc5 proteins by western blot at different time points (Fig. 1A). We observed that the amount of Cdc5 decreased from 3 hrs onward compared to time point 0. This result was confirmed in a strain with an untagged Cdc5, using an anti-Cdc5 antibody for western blot (Supplementary Fig. S1A). As a control, we confirmed that incubating wild-type *CDC13* cells at 32°C did not lead to a decrease in Cdc5 quantity (Supplementary Fig. 1B). Cdc5 was degraded by the proteasome as evidenced by its stabilization in the presence of the proteasome inhibitor MG132 in the culture media (Supplementary Fig. S1C). The previously identified APC/C-Cdh1-dependent ubiquitinylation motifs, KEN box and destruction box 1 (Arnold, Hockner et al., 2015, Charles et al., 1998), as well as Cdh1 the activator of APC/C, did not appear to be involved in this degradation (Supplementary Fig. S1D-F).

We compared the kinetics of Cdc5 degradation with the kinetics of adaptation in the same strain. To achieve a time-resolved detection of adaptation events, we developed a microfluidics-based assay to monitor cells over 24 hrs in time-lapse microscopy with the acquisition of one image every 10 minutes (Fig. 1B-C). Exponentially growing *cdc13-1* cells were loaded into a microfluidic plate as a low-density monolayer in microchambers, set in an incubator at 32°C under the microscope. The chambers were fed with a constant flow of rich media (20 μ L/hr for 0.036 μ L chambers). Multiple fields of view representing > 150 cells for

each condition or strain were monitored in an automated manner. The cells arrested in G2/M within 2-3 hrs (Fig. 1B-C). Similar to the standard microcolony assay used to assess adaptation (Toczyski, 2006), we used cell rebudding as an indication that an adaptation event occurred. Only the adaptation of an initially arrested cell was counted as one event and we did not count the subsequent cell divisions of adapted cells. In the *CDC5 cdc13-1* strain, the cumulative fraction of adaptation events followed a sigmoid shape with a plateau at 77.0 ± 5.9% (mean ± SD) reached at 16-18 hrs and half of the adaptation events observed at t_{50} = 9.36 ± 0.30 hrs (mean ± SD) (Fig. 1C). This measurement was consistent with the adaptation percentage obtained by microcolony assay (mean ± SD = 75.7 ± 10.2%) (Fig. 1D), where arrested cells were plated at low density and microcolonies containing more than 3 cell bodies were counted after 24 hrs at 32°C (Toczyski, 2006) (Fig. 1E).

The amount of Cdc5 protein in response to telomere dysfunction was inversely correlated to the kinetics of adaptation events, which was surprising since Cdc5 activity is essential for adaptation. We wondered whether this observation could be explained by the increasing fraction of adapted cells entering the next G1 and degrading Cdc5. To test this hypothesis, we performed the same experiment in the adaptation-deficient *cdc5-ad* mutant, which stays blocked in G2/M. We confirmed that this permanent arrest was checkpoint-dependent since cells could divide and form microcolonies in the checkpoint-deficient mutants $\Delta rad9$ and *mec1-21* (Desany, Alcasabas et al., 1998, Sanchez, Desany et al., 1996) (Supplementary Fig. S1G). Using our microfluidics assay, we found that virtually no *cdc5-ad* cell underwent adaptation (mean \pm SD = 0.6 \pm 0.6%) (Fig. 1C). However, the amount of Cdc5-ad proteins also decreased in response to telomere dysfunction, suggesting that the decrease of Cdc5 protein

level was not due to cells entering the next G1, and potentially occurred in G2/M (Fig. 1F). Consistently, we found that in *cdc13-1* cells arrested at 32°C in the presence of nocodazole or concomitantly with a depletion of Cdc20, both of which prevent cycling past G2/M, Cdc5 also decreased in quantity at 3 and 6 hours (see below Fig. 3B for nocodazole and Supplementary Fig. S3A for depletion of Cdc20).



Figure 1. Adaptation response to telomere dysfunction at the cellular and protein level. **(A)** Representative western blot of Cdc5 in a time course experiment after induction of telomere dysfunction by incubating *cdc13-1* cells at 32°C. Pgk1 is shown as a loading control. **(B)** Sequential microscopy images of *CDC5* and *cdc5-ad* cells monitored in microfluidics chambers, used for the analysis shown in (C). **(C)** Cumulative curves of the fraction of adapted cells as a function of time after induction of telomere dysfunction, obtained from microfluidic analysis of adaptation events at the single cell level, in *CDC5* and *cdc5-ad* cells. Three independent experiments for each strain are shown in continuous line, dashed line and dots. **(D)** Microcolony assay measuring the fraction of microcolonies formed by *CDC5* and *cdc5-ad* cells at 3 and 24 hrs. Data are presented as means \pm SD of N = 3 independent experiments. n \ge 150 cells for each condition. **(E)** Representative pictures of isolated G2/M cells at 3 hrs and unadapted cells (*cdc5-ad*) or microcolonies of \ge 3 cell bodies (*CDC5*) at 24°C, after telomere dysfunction. Used to

perform microcolony assays. **(F)** Representative western blot of Cdc5-ad in a time course experiment after induction of telomere dysfunction by incubating *cdc13-1* cells at 32°C. Pgk1 is shown as a loading control.

Rad53 inhibits CDC5 transcription through Ndd1 phosphorylation

CDC5 belongs to the *CLB2* cluster of genes and their expression depends on the transcription factor Fkh2/Mcm1 associated with the coactivator Ndd1 (Spellman et al., 1998). After DDC activation, Ndd1 is phosphorylated by Rad53 and no longer binds Fkh2/Mcm1, thereby limiting the expression of some of these genes (Edenberg et al., 2014, Yelamanchi et al., 2014). While not all genes in the *CLB2* cluster are repressed in response to DNA damage, the amount of *CDC5* mRNAs was found to be decreased (Edenberg et al., 2014, Gasch et al., 2001, Jaehnig et al., 2013). We therefore asked whether the decrease of Cdc5 at the protein level could reflect a repression of *CDC5* transcription through Rad53-dependent phosphorylation of Ndd1.

We thus introduced in our strains a second copy of wild-type *NDD1* or mutant *NDD1-CD-10A* allele (called "*NDD1-10A*" hereafter) expressed from *NDD1*'s native promoter, in which 10 Rad53-dependent phosphorylation sites are mutated (Yelamanchi et al., 2014). We chose to keep the endogenous *NDD1* gene to cover for potential pleiotropic phenotypes of the *NDD1-10A* mutant in cell growth for instance. Since Ndd1 is expected to be excluded from promoters in response to telomere dysfunction, keeping the endogenous *NDD1* gene should not prevent the assessment of the dominant effects of Ndd1-10A recruitment. We then monitored *CDC5* or *cdc5-ad* expression at the mRNA level by reverse transcription quantitative PCR (RT-qPCR) and at the protein level by western blot in these strains after inducing telomere deprotection (Fig. 2A-B and Supplementary Fig. S2A). While *CDC5* and *cdc5-ad* transcript levels decreased Page | 106

over time in the *NDD1* strains, they were at least maintained in the *NDD1-10A* strains, a result consistent with a previous study (Edenberg et al., 2014). Cdc5 and Cdc5-ad protein levels were higher in *NDD1-10A* strains compared to the *NDD1* strains, but also displayed a gradual decrease (Fig. 2A-B), suggesting an active degradation mechanism in response to telomere dysfunction. Thus, Rad53-dependent repression of *CDC5* and *cdc5-ad* transcription directly translates into a decrease in protein level, which is partially offset in the *NDD1-10A* strains.



Figure 2. Ndd1 regulates Cdc5 protein level and adaptation kinetics but overexpression of Cdc5-ad does not rescue adaptation defect. **(A)** Representative western blot of Cdc5 and Rad53 in a time course experiment after induction of telomere dysfunction by incubating *cdc13-1* cells at 32°C, in the indicated strains. Pgk1 is shown as a loading control. The presence of the endogenous *NDD1* gene is omitted in the genotype notation for simplicity, for panels (A-D). **(B)** Quantification of the western blot signal for Cdc5 or Cdc5-ad normalized over Pgk1 in 3 independent experiments for the indicated strains
incubated at 32°C for 0, 3 and 6 hrs. Student's t-test statistical significance for *p*-value < 0.05 is indicated with "*". (C) Cumulative curves of the fraction of adapted cells as a function of time after induction of telomere dysfunction, in the indicated strains. Three independent experiments for each strain are shown in continuous line, dashed line and dots. (D) Distribution of the timing of the adaptation events for the indicated strains, using data shown in (C). (E) Microcolony assay measuring the fraction of microcolonies formed in the indicated strains at 3 and 24 hrs, with or without galactose-induced overexpression of Cdc5/Cdc5-ad. Data are presented as means \pm SD of N = 3 independent experiments. n \geq 150 cells for each condition. (F) Microcolony assay with the thermosensitive allele *cdc5-1* compared to wild-type. Data are presented as means \pm SD of N = 3 independent experiments. n \geq 150 cells for each condition.

The Rad53-Ndd1 signalling pathway regulates the kinetics of adaptation

The role of Cdc5 in adaptation is dose-dependent and overexpression of Cdc5 accelerates adaptation (Donnianni et al., 2010, Dotiwala, Haase et al., 2007, Hu et al., 2001, Vidanes et al., 2010), but this property was previously tested with constitutive expression of CDC5 at different levels (e.g. gene copy number or galactose-inducible promoter). We therefore wondered whether adaptation would also be accelerated in the NDD1-10A mutant where Cdc5 was not overexpressed but maintained closer to its initial level. Adding a second copy of wild-type NDD1 in the CDC5 cdc13-1 strain affected the final percentage of adapted cells (mean \pm SD = 39.8 \pm 12.9%), but not the kinetics (t_{50} = 9.43 \pm 0.57 hrs, mean \pm SD) (Fig. 2C). When CDC5 cdc13-1 cells expressed NDD1-10A as a dominant second copy, adaptation was dramatically accelerated (t_{50} = 4.10 ± 0.06 hrs, mean ± SD) and the total fraction of adapted cells also increased (mean \pm SD = 92.3 \pm 2.0%) (Fig. 2C). Importantly, we observed that NDD1-10A cells arrested in G2/M within the first 2 hrs, indicating that the checkpoint arrest was functional, consistent with Rad53 being hyperphosphorylated upon induction of telomere deprotection in the NDD1-10A mutant (Fig. 2A). Interestingly, at 6 hrs, ~90% of NDD1-10A cells already adapted but Rad53 was not dephosphorylated, in contrast to the normal expectation after adaptation (Lee et al., 2000, Pellicioli et al., 2001). This observation suggests that one important step in adaptation driven by Rad53 dephosphorylation might be to allow the Ndd1-dependent activation of the *CLB2* cluster. Alternatively, the *NDD1-10A* mutant possibly allowed adaptation and the bypass of the DDC in a way that might differ from canonical adaptation.

We were also interested in the shape of the adaptation curve in the *NDD1-10A* mutant, which was much steeper than in the *NDD1* control strain when the first cells started to adapt. We thus plotted the distribution of adaptation events over time and confirmed that the distribution in the *NDD1-10A* mutant was narrower and with a positive skew (Fig. 2D). These results are consistent with the idea that the inhibition of the Ndd1-dependent transcription in response to DDC activation, including the downregulation of *CDC5*, strongly contributed to restrain adaptation and to its timing heterogeneity. However, another checkpoint-dependent mutant.

Strikingly, the *NDD1-10A* allele largely rescued the adaptation defect of *cdc5-ad* whereas a second copy of wild-type *NDD1* did not (fraction of adapted cells at 24 hrs: mean \pm SD = 77.8 \pm 2.7% vs 3.1 \pm 1.2%, respectively) (Fig. 2C). Adaptation in *cdc5-ad NDD1-10A* cells was slightly slower (t_{50} = 5.74 \pm 0.39 hrs, mean \pm SD) and appeared slightly less efficient than in *CDC5 NDD1-10A* cells (fraction of adapted cells at 24 hrs: mean \pm SD = 77.8 \pm 2.7% vs 92.7 \pm 1.9%, respectively), but still accelerated even compared to the *CDC5 NDD1* strain.

We conclude that phosphorylation of Ndd1 by Rad53 in response to telomere dysfunction slows down adaptation kinetics, likely by downregulating Cdc5, and contributes to the adaptation-defect of the *cdc5-ad* mutant. Ndd1 phosphorylation is not required for the initial checkpoint arrest, but is important for its maintenance after 2 hrs.

The transcriptional regulation of the *CLB2* cluster is essential to prevent adaptation in *cdc5-ad*

Since the kinase activity of Cdc5-ad is not impaired (Charles et al., 1998, Rawal et al., 2016), the relative increase of Cdc5-ad protein level in the NDD1-10A mutant might be sufficient to allow adaptation. Alternatively, the checkpoint arrest might be bypassed in the NDD1-10A mutant by relieving the global transcriptional inhibition of the CLB2 cluster of genes, regardless of the *cdc5-ad* allele. To distinguish between these two possibilities, we tested whether overexpression of Cdc5-ad alone would be sufficient to rescue *cdc5-ad*'s adaptation defect. Since CDC5 is an essential gene, we examined adaptation in diploid strains in which expression of only one copy of Cdc5 or Cdc5-ad is under the control of a galactose-inducible (and glucose-repressible) promoter and tagged with 3xHA. Upon galactose addition, the 3xHAtagged Cdc5 and Cdc5-ad were clearly overexpressed within an hour at both permissive and restrictive temperatures (Supplementary Fig. S2B). We then performed microcolony assays to assess the adaptation ability of these strains, by spreading the cells on galactose-containing plates to induce Cdc5 or Cdc5-ad overexpression. We observed that overexpressing Cdc5 increased adaptation efficiency (Fig. 2E), likely by accelerating its kinetics as previously described (Vidanes et al., 2010). However, overexpressing Cdc5-ad was not sufficient to recover adaptation capacity (Fig. 2E). To confirm this result in a haploid setting, we expressed CDC5 or cdc5-ad from a 2µ plasmid and found that while the expression of CDC5 rescued cdc5-Page | 110

Article 1

ad's adaptation defect as expected, the expression of *cdc5-ad* did not (Supplementary Fig. S2C). Thus, the adaptation defect of *cdc5-ad* was not simply due to a decreased expression and the Ndd1-dependent regulation of the *CLB2* cluster globally was important to prevent adaptation in the *cdc5-ad* mutant. In contrast to the overexpression of *CDC5*, the temperature-sensitive mutant *cdc5-1*, which shows decreased protein level and activity at restrictive temperature (Cheng et al., 1998, Park, Song et al., 2003) resulting in a strong growth defect even at 32°C (Chen & Weinreich, 2010), failed to adapt to telomere dysfunction (Fig. 2F), reinforcing the notion that adaptation is dose- and kinase-activity-dependent.

Cdc5-ad is hyperphosphorylated in a Mec1- and Tel1-independent manner

In addition to the transcriptional repression and degradation of Cdc5 and Cdc5-ad in response to telomere dysfunction, we observed that Cdc5-ad migrated as two forms in western blot (Fig. 1F). To test whether the slow migrating band corresponds to a phosphorylated form of Cdc5-ad, we treated the samples with λ -phosphatase before electrophoresis and found that the slow migrating band appearing at 3 hrs was no longer present (Fig. 3A). Interestingly, both Cdc5 and the fast-migrating band of Cdc5-ad also displayed a slight shift in migration when treated with λ -phosphatase, suggesting that these forms were also phosphorylated. Since Cdc5 and Cdc5-ad seemed to be more phosphorylated after telomere dysfunction, we tested whether their phosphorylation depended on the DDC and particularly on Mec1 and Tel1. To do so, we induced telomere dysfunction in the hypomorph mutant *mec1-21* in the presence of nocodazole to prevent cycling beyond G2/M due to checkpoint deficiency. We found by western blot that in the *mec1-21* mutant, Rad53 was no longer hyperphosphorylated, as expected in this checkpoint-deficient mutant, but Cdc5-ad still migrated as two bands (Fig. 3B). Because interference with microtubule polymerization by nocodazole can induce spindle assembly checkpoint (SAC), we also verified the presence of the double band of Cdc5-ad in *mec1-21* mutant using *CDC20* under the control of a galactose-inducible promoter as a strategy to maintain cells arrested in G2 by depletion of Cdc20 in glucose (Supplementary Fig. S3A). Deletion of *TEL1* also did not affect the migration of Cdc5-ad as two bands after telomere dysfunction (Supplementary Fig. S3B). Thus, Cdc5-ad-specific phosphorylation did not depend on the Mec1 or the Tel1 branches of the DDC, when mutated separately. However, these two mutations had different effects on Cdc5 or Cdc5-ad levels upon telomere dysfunction. Consistent with our results regarding the transcriptional regulation of *CDC5* and *cdc5-ad* by Rad53 and Ndd1, *mec1-21* cells behaved like the *NDD1-10A* mutant with respect to Cdc5 and Cdc5-ad levels, while *TEL1* deletion mutant did not, presumably because the contribution of Tel1 to the DDC signaling is minor compared to Mec1.



Figure 3. Cdc5-ad is phosphorylated in response to telomere dysfunction in a Mec1- and Tel1-independent and PP2Adependent manner (see also Supplementary Fig. S3A). **(A)** Representative western blot of Cdc5 or Cdc5-ad from *cdc13-1* cells incubated at 32°C for the indicated amount of time. Samples were treated (+) or not (-) with λ -phosphatase (PPase). **(B)** Representative western blot of Cdc5 or Cdc5-ad and Rad53 in response to telomere dysfunction in a wild-type *MEC1* or *mec1-*21 mutant strain, incubated at 32°C for the indicated amounts of time, in the presence of nocodazole. **(C)** Representative

western blot of Cdc5 or Cdc5-ad in a wild-type *CDC55* or $\Delta cdc55$ mutant strain. An asterisk indicates the hyperphosphorylated band of Cdc5-ad. **(D)** λ -phosphatase (PPase) assay with samples from the indicated strains incubated at 32°C for 6 hrs. **(E)** Microcolony assay measuring the fraction of microcolonies formed at 3 and 24 hrs in the indicated strains. Data are presented as means ± SD of N = 3 independent experiments. n ≥ 150 cells for each condition. **(F)** Representative western blot of Cdc5 or Cdc5-ad in a wild-type *RTS1* or $\Delta rts1$ mutant strain. An asterisk indicates the hyperphosphorylated band of Cdc5-ad. **(G)** Microcolony assay measuring the fraction of microcolonies formed at 3 and 24 hrs in the indicated strains. Data are presented as means ± SD of N = 3 independent experiments. n ≥ 150 cells for each condition. **(H)** Microcolony assay measuring the fraction of microcolonies formed in the indicated strains at 3 and 24 hrs, with either an empty 2µ plasmid (pRS42H) or one expressing *CDC5* under its endogenous promoter. Data are presented as means ± SD of N = 3 independent experiments. n ≥ 150 cells for each condition N = 3 independent experiments. n ≥ 150 cells for each condition. These experiments were performed together with the ones presented in Supplementary Fig. S2C and the two control conditions, noted here *RTS1* 2µ-empty and *RTS1* 2µm-*CDC5*, are therefore shared between the two graphs.

PP2A phosphatases affect adaptation in multiple ways

Since Cdc5 and Cdc5-ad were phosphorylated, particularly in response to telomere dysfunction and more so for Cdc5-ad, we wondered whether phosphatases regulate adaptation. In a recently published time-resolved phosphoproteomic analysis of mitosis (Touati, Hofbauer et al., 2019), residues T70, T238 and T242 in Cdc5 were found to be more phosphorylated in a PP2A^{Rts1} phosphatase mutant ($\Delta rts1$) in G2. But dephosphorylation of these residues after mitosis was not delayed, indicating that other phosphatases acted on them. In a PP2A^{Cdc55} phosphatase mutant ($\Delta cdc55$), dephosphorylation of residue S2 of Cdc5 was delayed in mitosis. To investigate the potential role of *RTS1* and *CDC55* in adaptation, we deleted these genes in our strains and assessed their adaptation phenotype.

Deletion of *CDC55* decreased the overall amount of Cdc5 and Cdc5-ad (Fig. 3C). Surprisingly, the hyperphosphorylated form of Cdc5-ad was no longer present in $\Delta cdc55$ as confirmed by a

Jeanne Le Peillet

 λ -phosphatase assay (Fig. 3D), suggesting an indirect effect of PP2A^{Cdc55} on Cdc5-ad phosphorylation. In a microcolony assay, we found that the absence of *CDC55* slightly improved the adaptation level in *CDC5 cdc13-1* cells incubated at restrictive temperature (Fig. 3E). This result suggested that Cdc55 counteracted adaptation and that adaptation might normally involve the inhibition or the bypass of Cdc55's function(s). In the *cdc5-ad cdc13-1* strain, however, deletion of *CDC55* did not rescue the adaptation defect, indicating that the adaptation function affected in *cdc5-ad* is independent of Cdc55.

Strikingly, *RTS1* deletion inhibited adaptation as strongly as the *cdc5-ad* mutant (Fig. 3G). The double mutant *Arts1 cdc5-ad* was undistinguishable from either *Arts1* and *cdc5-ad* with respect to adaptation. In the microcolony experiments, *Arts1 cdc13-1* cells robustly arrested in G2/M after 3 hrs at 32°C, suggesting that the DDC was fully functional. Furthermore, Δrts1 cells were proficient in recovery as they grew as well as RTS1 cells in an assay where cells were subjected to a transient telomere dysfunction (for 10 hrs) before returning to a permissive temperature (Supplementary Fig. S3C). The adaptation defect of *Arts1* was not specific to telomere dysfunction, since we found by microcolony assay that in response to a single persistent DSB induced by the I-Scel endonuclease, *Arts1* cells were also adaptation deficient (Supplementary Fig. S3D). Therefore, Δrts1 is a new bona fide adaptation mutant. We examined Cdc5 and Cdc5-ad proteins in the *Arts1* mutant by western blot and found that both proteins started with a similar level but decreased in quantity faster than in a wild-type RTS1 background (Fig. 3F). To test whether Δrts1's adaptation deficiency was due to an exacerbated decrease of Cdc5 quantity, we expressed CDC5 in a 2μ plasmid in the $\Delta rts1$ strain. While the 2µ-borne CDC5 was sufficient to rescue cdc5-ad's adaptation deficiency (Supplementary Fig. S2C), it did not increase $\Delta rts1$'s adaptation level (Fig. 3H), suggesting that *RTS1* might be required for adaptation in a *CDC5*-independent manner. Interestingly, in the $\Delta rts1$ mutant, Cdc5-ad did not show a hyperphosphorylated band (Fig. 3D and F), indicating that Rts1 is important for Cdc5-ad's phosphorylation. As for PP2A^{Cdc55}, since PP2A^{Rts1} is a phosphatase, the effect on Cdc5-ad's phosphorylation must be indirect. We conclude that both phosphatases are involved in adaptation and that the hyperphosphorylation of Cdc5-ad is not essential to prevent adaptation.

Phosphorylation of specific residues in Cdc5 modulates adaptation

To identify the phosphorylated residues in Cdc5 and Cdc5-ad, we immunoprecipitated Cdc5-3HA and Cdc5-ad-3HA in a *cdc13-1* mutant incubated at restrictive temperature for 0 or 3 hrs, using an anti-HA antibody, and performed mass spectrometry. Although hyperphosphorylation of Cdc5-ad was not essential for adaptation defect, the identification and study of the phosphorylated residues in Cdc5-ad might still be informative. Since the 3-hr samples had less Cdc5 and Cdc5-ad proteins (Fig. 1A and F), we took advantage of the NDD1-10A mutant, in which background both proteins were more abundant at this time point, to perform the experiment. The immunoprecipitated samples were separated by SDS polyacrylamide gel electrophoresis and silver stained (Supplementary Fig. S4A and B). The bands corresponding to Cdc5 and Cdc5-ad were cut from the gel. Proteins were extracted, trypsinized and analyzed by LC MS/MS. Fig. 4A and B summarize the phosphosites that we detected in two independent experiments.



Figure 4. Phosphorylation of Cdc5 modulates adaptation. **(A)** Schematic representation of Cdc5 and its domains (kinase and Polo box domains PB1 and PB2) with the detected phosphorylation sites mapped (cyan vertical lines). **(B)** Summary table of the putative phosphorylation sites identified by mass spectrometry for each condition. For T601/S602 and T654/Y655, peptide analysis did not allow discrimination between the two putative phosphorylation sites. **(C)** Microcolony assay measuring the fraction of microcolonies formed at 3 and 24 hrs in strains carrying mutations to alanines at the residues S2, S214, S419, S479 and T484. Data are presented as means \pm SD of N \geq 3 independent experiments. n \geq 150 cells for each condition. **(D)** Microcolony assay measuring the fraction of microcolonies formed the fraction of microcolonies formed at 3 and 24. S479A-T484A and all 5 sites mutated into alanines ("5A"). Data are presented as means \pm SD of N \geq 3 independent experiments. **(E)** Microcolony assay

measuring the fraction of microcolonies formed at 3 and 24 hrs in *CDC5* and *cdc5-ad* strains carrying the phosphomimetic mutations S214E and S479E. Data are presented as means \pm SD of N \geq 3 independent experiments. n \geq 150 cells for each condition.

We found that Cdc5 and Cdc5-ad were heavily phosphorylated *in vivo*, in particular in DDCarrested cells. Among the 19 phosphosites we detected in at least one experiment, 14 have not been described before in the literature, to our knowledge. The phosphosites mapped to all defined domains of Cdc5, including the N-terminus, the kinase domain and the Polo-box domain (PBD) (Fig. 4A).

We were particularly interested in residues that were differentially phosphorylated between Cdc5 and Cdc5-ad or between time points 0 and 3 hrs. We therefore focused on residues S2, S214, S419 (a minimal Cdk1 site), S479, and T484. We mutated each of these residues to alanine by Cas9-mediated mutagenesis and assessed the adaptation phenotype of the resulting mutant strains. The *cdc5-S214A* and *cdc5-S479A* mutants showed significantly increased adaptation level compared to wild-type without affecting protein level (Supplementary Fig. S4D), suggesting that phosphorylation of these sites inhibited adaptation (Fig. 4C). Other phosphosite mutants did not significantly alter adaptation level (Fig. 4C). Analysis of the double mutant *cdc5-S214A-S479A* showed that, while it still adapted better than the wild-type *CDC5*, it did not further increase adaptation and showed rather less efficient adaptation compared to each individual mutant (Fig. 4D and Supplementary Fig. S4D). Because of the proximity of residues S479 and T484, we tested the effect of their combined mutation. Interestingly, the double mutant S479A T484A had an adaptation level comparable to the single T484A mutant, which was significantly lower than the high adaptation efficiency Page | 118

of S479A. Phosphorylation at S479 and T484 therefore appeared to have opposite effects. While all 5 residues were phosphorylated in *cdc5-ad*, their combined mutation into alanines was not sufficient to alter the double-band migration profile in western blot (Supplementary Fig. S4C) and did not restore adaptation in the *cdc5-ad* mutant (Fig. 4D), although it was not necessarily expected since the hyperphosphorylated form of Cdc5-ad is not essential for its adaptation defect. Since S214A and S479A were the two single mutations that affected adaptation level in the *CDC5* strain, we asked whether phosphomimetic mutations of these sites would have the opposite effect. Indeed, the *cdc5-S479E* strain showed a significantly decreased adaptation level, as low as *cdc5-ad-S479E*, without affecting protein level (Supplementary Fig. S4D), indicating that it is an adaptation mutant of *CDC5* (Fig. 4E). The adaptation level of *cdc5-S214E* was not significantly different from *cdc5-S479E*, suggesting that it might also be slightly impaired for adaptation (Fig. 4E and Supplementary Fig. S4D). However, the difference between *cdc5-S214E* and wild-type *CDC5* was not significant, although the p-value from the two-sided t-test was only 0.059.

Overall, our results suggested that phosphorylation of single residues such as S214 and S479 inhibits adaptation. The combination with the phosphorylation status of other residues revealed a complex phosphorylation pattern modulating adaptation efficiency or timing. However, the adaptation deficiency of *cdc5-ad* did not solely depend on these phosphorylated residues.

Cdc5's functions in different pathways are important for adaptation

Since Cdc5 regulates multiple late cell cycle events, any of these could potentially be involved in Cdc5's role in adaptation. For instance, the deletion of *BFA1*, the gene encoding the mitotic exit substrate of Cdc5, rescues the adaptation defect of *cdc5-ad* (Rawal et al., 2016). Cdc5's interaction with other substrates, such as the RSC complex implicated in the "Cdc-Fourteen Early Anaphase Release" (FEAR) pathway (Rossio, Galati et al., 2010), is also important for adaptation, as evidenced by the adaptation defect of the *cdc5-16* mutant, which is mutated at 3 amino acids in the PBD domain, preventing its canonical interaction with primed substrates, including the RSC complex (Ratsima et al., 2016). We therefore asked whether these two *CDC5* mutants, *cdc5-ad* and *cdc5-16*, had the same underlying molecular defect in adaptation or whether they are affected in distinct pathways. We tested their genetic interaction by introducing these two alleles in diploid *cdc13-1/cdc13-1* cells and assessed the adaptation efficiency of this strain by microcolony assay (Fig. 5A). As a control, we also combined the mutations of *cdc5-16* with the point mutation (L251W) of *cdc5-ad* to generate the *cdc5-ad-16* mutant.

A wild-type copy of *CDC5* was sufficient to rescue the adaptation defect of *cdc5-ad* and *cdc5-16*. Strikingly, *cdc5-ad* and *cdc5-16* were able to complement each other's adaptation deficiency as the heterozygous *cdc5-ad/cdc5-16* was adaptation proficient (Fig. 5A). In contrast, the *cdc5-ad-16/cdc5-ad-16* mutant was as adaptation-deficient as *cdc5-ad/cdc5-ad*. We conclude that *cdc5-ad* and *cdc5-16* are affected in adaptation in different pathways or at least at different steps of the same pathway.



Figure 5. (A) Mutant alleles *cdc5-16* and *cdc5-ad* complement each other in adaptation. Microcolony assay measuring the fraction of microcolonies formed at 3 and 24 hrs in the indicated mutants. Data are presented as means \pm SD of N = 3 independent experiments. n \geq 150 cells for each condition. **(B)** Model recapitulating the network of regulation of Cdc5 involved in adaptation to DNA damage. The DDR and its Mec1-Rad53 branch target a number of late cell cycle processes and factors (pink shaded boxes), including Ndd1, to ensure robust arrest. In response to telomere dysfunction, Cdc5 is regulated at multiple levels, by Ndd1, by degradation and by phosphorylation/dephosphorylation. The role of PP2A^{Cdc55/Rts1} phosphatases in regulating Cdc5 phosphorylation is depicted with a dashed line as it is indirect. In turn, Cdc5 targets many of the processes "locked" by the DDR (pink shaded boxes), as exemplified by mutant alleles *cdc5-16* and *cdc5-ad* deficient in specific pathways (alleles in blue with blue crosses to indicate deficiency), thus coordinating cell cycle restart. Cdc5 localization in metaphase and anaphase is shown in green.

Discussion

Regulation of Cdc5 protein level in response to telomere dysfunction

Cdc5 was identified among the downstream targets of the DDC and proposed to be inhibited to prevent anaphase entry and mitotic exit in response to DNA damage (Sanchez et al., 1999). While a Rad53- and Ndd1-dependent inhibition of *CDC5* transcription was reported previously (Edenberg et al., 2014, Gasch et al., 2001, Jaehnig et al., 2013), how Cdc5 protein levels are regulated in response to telomere dysfunction has not been clearly established, especially as a function of time. Indeed, the temporal dimension of Cdc5 regulation is particularly important with respect to adaptation, which occurs late after the initial damage (4-16 hours) but depends on Cdc5 activity.

Here, we find that Cdc5 protein level decreases progressively in G2/M arrested cells after telomere dysfunction in a Mec1-, Rad53- and Ndd1-dependent manner, as a result of the transcriptional repression of *CDC5* and proteasome-dependent degradation (Fig. 5B). Incidentally, after telomere dysfunction, the previously described APC/C-Cdh1-dependent ubiquitinylation of Cdc5 KEN box and destruction box 1 (Arnold et al., 2015, Charles et al., 1998) is not involved. In a normal cell cycle, APC/C-Cdh1 starts to be active at the end of anaphase and in telophase and would not mediate Cdc5 degradation at the metaphase to anaphase transition. However, it was reported that Cdh1 is maintained in an active state in G2/M by the DDC in *cdc13-1* cells at restrictive temperature to prevent chromosome segregation (Zhang et al., 2009). The question of the mechanisms underlying Cdc5 degradation in this context thus remains to be investigated.

Jeanne Le Peillet

Article 1

Cdc5 being essential for adaptation, it might be surprising to observe that Cdc5 degradation after telomere dysfunction follows a kinetics that is inversely correlated to that of adaptation. One possibility would be that late cell cycle events are normally executed with an excess of Cdc5 proteins, consistently with the fact that a kinase mutant (cdc5-77) with less than 2% of wild-type activity is still viable (Ratsima, Ladouceur et al., 2011). This excess ensures a robust cell cycle progression but might be incompatible with checkpoint arrest. The decrease in Cdc5 quantity after telomere dysfunction would then be an essential step to enforce cell cycle control by the DDC. The low amount of Cdc5 might still be enough to trigger adaptation though, even after a long delay of 8-12 hrs. Cdc5's activity in these conditions would then be finely controlled by other mechanisms such as posttranslational modifications, as our phosphosite mutagenesis results suggest. In this model, alterations of Cdc5 levels would tip the balance of Cdc5's fine-tuned activity, thus explaining the many results correlating adaptation efficiency with the total amount of Cdc5, as we see in NDD1-10A, $\Delta rts1$, and in strains overexpressing Cdc5, or as described previously (Donnianni et al., 2010, Dotiwala et al., 2007, Hu et al., 2001, Vidanes et al., 2010). An exception to this rule would be the *Acdc55* mutant in which adaptation is promoted while Cdc5 level is lower than in wild-type cells. In this case, the role of Cdc55 in preventing sister chromatid separation and inhibiting mitotic exit in the presence of DNA damage (Liang & Wang, 2007, Tang & Wang, 2006) might explain the slightly more efficient adaptation of the $\triangle cdc55$ mutant.

Alternatively, adaptation might be triggered by a transient burst of Cdc5 activity or quantity at the single cell level. Such a transient increase in activity or quantity would not be detected by measuring the total amount of Cdc5 at the population level, given the variability of adaptation timing at the single cell level. The transient and heterogeneous behaviour of Cdc5 expression would be consistent with the positive feedback regulation of Cdc5 on Ndd1 (Fig. 5B), whereby Cdc5 phosphorylates Ndd1 on residue S85 to promote its binding to the promoter of the *CLB2* cluster of genes, thus stimulating its own expression (Darieva, Bulmer et al., 2006). Since Rad53 phosphorylates both Ndd1 and Cdc5, and Cdc5 can in turn phosphorylate Rad53 and Ndd1 (Darieva et al., 2006, Edenberg et al., 2014, Vidanes et al., 2010, Yelamanchi et al., 2014, Zhang et al., 2009), the dynamic output of this genetic network is complex but might have been harnessed to control adaptation timing and heterogeneity.

A third possibility would be that the DDR simultaneously promotes Cdc5's activity toward substrates relevant for adaptation and triggers its downregulation and degradation. Additionally, Cdc5 might function early after the initial damage when its level is still high but its actual effect on adaptation might take several hours, potentially due to signal transduction through one or several pathways and to mechanisms that temporarily block adaptation progression (see below). There would then be a large delay between Cdc5's peak activity after DNA damage and adaptation timing. This scenario would also be compatible with the observations correlating Cdc5 dosage with adaptation rate and efficiency.

Post-translational modifications of Cdc5

Phosphorylation of Cdc5 and of Polo kinases in general is important for their kinase activity (Cheng et al., 1998, Hamanaka, Smith et al., 1995, Li, Wang et al., 2019, Mortensen et al., 2005, Qian, Yu et al., 1998, Rawal et al., 2016, Rodriguez-Rodriguez et al., 2016, Tavares, Glover et al., 1996). Additionally, Cdc5 is specifically phosphorylated in response to DNA damage in a Mec1- and Rad53-dependent manner (Cheng et al., 1998, Zhang et al., 2009). We also find that Cdc5 is phosphorylated after telomere dysfunction but most strikingly, we report that in this context Cdc5-ad migrates as two bands with distinct electrophoretic mobility. We note that, although it is induced by telomere deprotection, the slow migrating form of Cdc5-ad does not depend on Mec1 and Tel1 and is not directly due to the cells being in G2/M since a previous study showed that Cdc5-ad does not display an electrophoretic mobility shift during the cell cycle (Rawal et al., 2016).

Adaptation assays performed in mutants of individual sites (S214 and S479) indicate that their phosphorylation limits adaptation. We thus suggest that in addition to the downregulation of protein level, phosphorylation of Cdc5 might constitute another layer of regulation to prevent premature adaptation (Fig. 5B). However, combinatorial phosphorylation pattern of Cdc5 can be more complex since we evidence opposing effects of different phosphorylated sites, using combined mutants of two or more residues. None of the mutations we tested or their combinations rescued, even partially, the adaptation defect of *cdc5-ad*. Even the mutation of 5 selected residues did not affect the adaptation phenotype of *cdc5-ad* or the electrophoretic migration pattern of Cdc5-ad. The function and regulation of Cdc5-ad's hyperphosphorylation, although not essential for adaptation defect, remain to be investigated. We speculate that other phosphorylations of Cdc5 that were not covered by the peptides detected by MS might also participate in adaptation regulation.

Since the dynamics of dephosphorylation of Cdc5 residues were recently shown to be slightly altered in PP2A phosphatases mutants (Touati et al., 2019), we asked whether these phosphatases played a role in the electrophoretic mobility of Cdc5 and Cdc5-ad and in adaptation. Remarkably, both *Acdc55* and *Arts1* affect Cdc5/Cdc5-ad abundance and phosphorylation, and adaptation, but in very different ways. *Arts1* cells display a strong adaptation defect unrelated to Cdc5 protein level, without affecting recovery after transient telomere dysfunction. Importantly, the adaptation defect of *Arts1* mutant was observed in response to both telomere dysfunction and a single DSB, indicating that the $\Delta rts1$ mutant has a general adaptation deficiency rather than a damage-specific phenotype. In contrast, *Acdc55* cells adapt slightly more efficiently, probably because cells must bypass the functions of Cdc55 in inhibiting Cdc14 nucleolar release in the FEAR pathway and in preventing chromosome segregation (Clift, Bizzari et al., 2009, Queralt, Lehane et al., 2006, Yaakov, Thorn et al., 2012) (Fig. 5B). Since Δcdc55 cdc5-ad cells do not adapt, we infer that cdc5-ad is not defective in FEAR and chromosome segregation after DNA damage or at least not only in these two pathways. Strikingly, the slow migrating form of Cdc5-ad is not present in the absence of CDC55 or RTS1, suggesting an indirect regulation of Cdc5-ad phosphorylation by PP2A phosphatases, again showing the complexity of the post-translational regulation of Cdc5.

Multiple Cdc5-dependent pathways control adaptation

Cdc5 is involved in many cell cycle related processes (Botchkarev & Haber, 2018). Their coordination is important not only for a normal cell cycle but also during adaptation to ensure correct cell division despite persistent damage. Which of them is the limiting one or the first

to be unblocked in adaptation and whether multiple Cdc5-dependent processes need to be overcome for adaptation remain unclear.

In the first studies characterizing the DDC status during adaptation, Rad53 phosphorylation and kinase activity were shown to mirror cell cycle arrest, and adaptation correlated well with the return of Rad53 to an unphosphorylated state (Lee et al., 2000, Pellicioli et al., 2001). Consistently, in adaptation mutants including *cdc5-ad*, Rad53 activation persisted for as long as 24 hours (Pellicioli et al., 2001). Since then, two adaptation defective mutants of CDC5, cdc5-16 and cdc5-T238A, have illustrated an uncoupling between Rad53 status and adaptation (Ratsima et al., 2016, Rawal et al., 2016). In both cases (particularly obvious in cdc5-16 cells), Rad53 returns to an unphosphorylated state while the cells stay arrested for much longer. Here, on the other hand, we find that in the NDD1-10A mutant, most cells have adapted within 4-6 hours of telomere deprotection while Rad53 is still hyperphosphorylated. Rad53 dephosphorylation is therefore neither necessary nor sufficient for adaptation, although in a wild-type context, it is likely the most straightforward way for the cell to alleviate the checkpoint arrest during adaptation. A direct phosphorylation of Rad53 by Cdc5 might contribute to checkpoint deactivation (Schleker, Shimada et al., 2010, Vidanes et al., 2010). While we suggest that Rad53 phosphorylation can be uncoupled from adaptation, the DDR does target a number of cell cycle progression steps to ensure a robust arrest (Fig. 5B). We propose that they constitute "locking mechanisms" that need to be bypassed for adaptation to occur. Based on our results and on insights from literature, we develop below the idea that Cdc5 appears to target many of them to orchestrate adaptation (Fig. 5B).

The initial checkpoint arrest does not require a functional Ndd1-dependent regulation of the *CLB2* cluster, as it is still present in the *NDD1-10A* mutant, and represents a first locking mechanism. The effect of the *NDD1-10A* mutant also demonstrates that, downstream of Rad53 activation, the transcriptional regulation of the *CLB2* cluster of genes is important for the long-term maintenance of the checkpoint arrest after 2-3 hours and therefore represents another locking mechanism for adaptation.

We also suggest that Cdc55 restrains adaptation through its functions in the FEAR network and in preventing chromosome segregation (Fig. 5B) (Queralt et al., 2006, Yaakov et al., 2012), both of which antagonize Cdc5's role in these processes. As noted before, the adaptation defect of *cdc5-ad* is independent of Cdc55 and must be caused by yet another locking mechanism, possibly the failure to activate MEN (Fig. 5B) (Rawal et al., 2016). Additionally, we show that two adaptation mutants of *CDC5, cdc5-ad* and *cdc5-16,* can complement each other, demonstrating that multiple pathways controlled by Cdc5 are blocked simultaneously during checkpoint arrest and that Cdc5 needs to act on them all.

In conclusion, our work shows that multiple levels of regulation of Cdc5 in response to telomere dysfunction are critical for long-term checkpoint arrest, which requires blocking several processes involved in cell cycle progression. Conversely, restarting all of them in a coordinated manner during adaptation is a complicated task for the cell. It is therefore remarkable that Cdc5 is involved in many of these processes, if not all, supporting the idea that Cdc5 orchestrates, during adaptation, the multiple late cell cycle events leading to mitosis.

Page | 128

Material and Methods

Yeast strains and plasmids

All strains are from the W303 background (*ura3-1 trp1-1 leu2-3,112 his3-11,15 can1-100*) corrected for *RAD5* and *ADE2* (Supplementary Table 1). Most contain the *cdc13-1* allele and were grown at the permissive temperature of 23°C in YPD (yeast extract, peptone, dextrose) media and at 32°C to induce telomere dysfunction. Overexpression and deletion strains were created using PCR-based methods as described in (Longtine, McKenzie et al., 1998). Point mutations were performed using Cas9-mediated gene targeting as described in (Anand, Beach et al., 2017). To ectopically express *CDC5* or *cdc5-ad* from a 2µ plasmid, the genomic coding sequence and 500 bp of the 5' and 3' UTR were amplified by colony PCR and cloned into the *Sacl-BamHI* sites of 2µ plasmid pRS42H.

Microcolony assay

Microcolony assays were performed using the *cdc13-1* mutant to assess adaptation, as described in (Toczyski, 2006). Briefly, telomere dysfunction was induced in exponentially growing cells by incubation at 32°C for 3 hrs. 100 μ L of a culture at OD_{600 nm} = 0.1 were then plated on a prewarmed plate. Plates were visualized on a dissection microscope (MSM System 400, Singer Instruments) immediately at 3 hrs and at 24 hrs. At each position, the number of cell bodies were counted and microcolonies were defined as comprising \geq 3 cell bodies. Two-sided t-tests were used to assess statistical significance with a 0.05 threshold for the p-value.

SDS-PAGE and western blot analysis

Aliquots of 5 × 10⁷ cells were harvested by centrifugation. The pellets were lysed in 0.2 M NaOH on ice for 10 min and proteins were precipitated by the addition of 50 µL of 50% trichloroacetic acid. The samples were centrifuged at 16,100 g for 10 min at 4°C and the pellets were resuspended in 4× Laemmli buffer and heated for 5 min at 95°C. Samples were separated in a denaturing 7.5% 37.5:1 polyacrylamide gel, and proteins were transferred to a nitrocellulose membrane (Amersham Protran 0.45 NC, GE Healthcare). The membranes were stained with Ponceau Red and immunoblotted with anti-Rad53 antibody (EL7.E1, Abcam), which recognizes both the unphosphorylated and phosphorylated forms of Rad53, anti-Cdc5 antibodies (11H12 and 4F10, Medimabs), anti-HA antibody (3F10, Roche), and anti-Pgk1 antibody (22C5D8, Abcam). Blots were then incubated with a horseradish peroxidase-coupled secondary antibody, and the signal was detected using ECL reagent (Amersham, GE Healthcare). All western blots were independently replicated in the laboratory.

Immunoprecipitation

Immunoprecipitation was performed as in (Cohen, Amiott et al., 2011) with minor modifications. After growth in the different conditions described in the results, ~10⁹ cells were harvested, washed in Milli-Q water and resuspended in lysis buffer (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, 0.6% Triton X-100, 10% glycerol, protease inhibitors (cOmplete Mini EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail, Roche) and phosphatase inhibitors (Phosphatase Inhibitor Cocktail Set II, Millipore). Cells were lysed with glass beads in a cooled FastPrep (MP Biomedicals). Cell lysates were cleared by centrifugation at 13 000 g for 30 min and supernatants were incubated for 30 min with 2.5 μ g/sample anti-HA antibodies (clone 3F10, Roche) bound to 50 μ L/sample

(or 1.5 mg/sample) protein G-coated magnetic beads (Dynabeads Protein G, Invitrogen). The subsequent steps of immunoprecipitation and washes were performed according to the manufacturer's instructions. The immunoprecipates were eluted in 2x Laemmli buffer.

Mass spectrometry analysis

After separation by SDS-PAGE, proteins were fixed and revealed by silver nitrate staining according to the protocol described in (Rabilloud, 2012). Bands of interest were excised and prepared for trypsin digestion. Briefly, proteins were destained with a freshly prepared solution containing 15 mM potassium ferricyanide and 50 mM sodium thiosulfate. Proteins were reduced by 10 mM dithiotreitol in 50 mM ammonium bicarbonate (AMBIC) for 30 min at 56°C and further alkylated by incubation in the dark with 50 mM iodoacetamide in 50 mM AMBIC. Then, protein samples were digested overnight at 37°C with 125 ng modified porcine trypsin (Trypsin Gold, Promega). Peptides were extracted under acidic conditions and dried out using a speedvac concentrator. Then, peptide mixtures were resuspended in 10 μ L of solvant A (0.1% (v/v) formic acid in 3% (v/v) acetonitrile) and frozen at -20 °C until use.

Mass spectrometry analyses were performed on a Q-Exactive Plus hybrid quadripole-orbitrap mass spectrometer (Thermo Fisher, San José, CA, USA) coupled to an Easy 1000 reverse phase nano-flow LC system (Proxeon) using the Easy nano-electrospray ion source (Thermo Fisher). Five microliters of peptide mixture were loaded onto an Acclaim PepMap[™] precolumn (75 µm x 2 cm, 3 µm, 100 Å; Thermo Scientific) equilibrated in solvent A and separated at a constant flow rate of 250 nl/min on a PepMap[™] RSLC C18 Easy-Spray column (75 µm x 50 cm, 2 µm, 100 Å; Thermo Scientific) with a 90 min gradient (0 to 20% B solvent (0.1% (v/v) formic acid in acetonitrile) in 70 min and 20 to 37% B solvent in 20 min). Data acquisition was performed in positive and data-dependent modes. Full scan MS spectra (mass range m/z 400-1800) were acquired in profile mode with a resolution of 70,000 (at m/z 200) and MS/MS spectra were acquired in centroid mode at a resolution of 17,500 (at m/z 200). All other parameters were kept as described in (Perez-Perez, Mauries et al., 2017).

Protein identification was performed with the MASCOT software (version 4; Matrix Science, London, UK) via the Proteome discoverer software (version 2.2; Thermo Scientific) with *S. cerevisiae* UniprotKB protein database. The search parameters were set as followed: two missed cleavages allowed cysteine carbamidomethylation as fixed modifications and methionine oxidation, N Ter protein acetylation and phosphorylation on serine, tyrosine and threonine as variable modifications with a peptide mass tolerance of 10 ppm. FDR (False discovery rate) for protein identification was fixed at 0.01.

RNA extraction and quantitative reverse-transcriptase PCR (RT-qPCR)

 5×10^7 cells were harvested, washed in Milli-Q water and frozen. Frozen cell pellets were incubated in presence of lyticase for 30 min at 30°C to generate spheroplasts. Total RNA was extracted using the RNeasy mini kit (Qiagen) and following the manufacturer's instructions. To eliminate genomic DNA contamination, an additional DNase treatment was performed using Turbo DNA-free kit (Invitrogen). The extracted RNA was quantified and quality controlled using a NanoDrop One spectrophotometer (ThermoFischer Scientific). 600 ng of total RNA was reverse-transcribed into cDNA in a 20 µL reaction using the SuperScript II Reverse Transcriptase kit (ThermoFischer Scientific). Real-time PCR was performed using Fast SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems) on CFX96 Real-Time System instrument (Bio-Rad). The PCR program consisted of one hold at 95°C for 10 min, followed by 40 cycles of 15s at 95°C and 30s at 57°C. Quantification of the qPCR data was performed using the $\Delta\Delta$ Ct method (Livak & Schmittgen, 2001) using *ACT1* transcript as a reference. Primers for *CDC5*: 5′-TGGCAATATCCGACGGAGG-3′ (forward) and 5′-GGATATCCTGGGATCTCGC-3′ (reverse). Primers for *ACT1*: 5′-CTGGTATGTGTAAAGCCGGT-3′ (forward) and 5′-ACGTAGGAGTCTTTTTGACCCA-3′ (reverse), corresponding to p32 and p33, respectively, from (Mozdy & Cech, 2006).

Time-lapse microscopy

Exponentially growing cells at $OD_{600 nm} = 0.2$ were injected into the microfluidics chambers of a CellASIC plate (Y04C-02 plate for haploid cells, CellASIC ONIX2 Microfluidic System, Millipore), through the inlet wells. A constant flow of rich media (20 µL/hr for 0.036 µL chambers) fed the chambers, which were kept at the constant temperature of 32°C. Cells in the microfluidic device were imaged using a fully motorized Axio Observer Z1 inverted microscope (Zeiss) with a 100× immersion objective, a Hamamatsu Orca R2 camera, and constant focus maintained with focus stabilization hardware (Definite focus, Zeiss). The temperature was maintained at 32°C with a controlled heating unit and an incubation chamber. Images were acquired every 10 min using ZEN software (Zeiss). All aspects of image acquisition were fully automated and controlled, including temperature, focus, stage position, and time-lapse imaging.

Data availability

Strains and plasmids are available upon request. The authors affirm that all data necessary for confirming the conclusions of the article are present within the article, figures, and tables.

Acknowledgements/Funding

We are grateful to Jiri Veis, Gustav Ammerer, Jim Haber and Karine Dubrana for providing plasmids and yeast strains. We thank Sandra Touati for helpful discussions and for sharing unpublished data, and Leticia Berkate for her technical help.

Research in DD's laboratory is funded by a Foundation grant from CIHR (FDN–167265). DD and the University of Ottawa are also funded by the Canada Research Chair in Chromatin Dynamics and Genome Architecture. Work in MTT's laboratory is supported by the "Fondation de la Recherche Medicale" ("Équipe FRM EQU202003010428"), by the French National Research Agency (ANR) as part of the "Investissements d'Avenir" Program (LabEx Dynamo ANR-11-LABX-0011-01) and ANR-16-CE12-0026, and The French National Cancer Institute (INCa_15192). H.C. was supported by a doctoral grant from the Paris Sciences et Lettres (PSL) Idex program implemented by the ANR (ANR-10-IDEX-0001-02 PSL). Research in ZX's laboratory is supported by the ANR grant "AlgaTelo" (ANR-17-CE20-0002-01), Ville de Paris (Programme Émergence(s)), the Émergence grant of Sorbonne Université, Ligue Contre le Cancer (Subvention Recherche Scientifique 2022) and Fondation ARC contre le cancer (ARCPJA202160003865). The Proteomic Platform of the IBPC (PPI) was supported by LABEX DYNAMO (ANR-LABX-011) and EQUIPEX (CACSICE ANR-11-EQPX-0008).

Author contributions

Conceptualization: DD, MTT, ZX. Formal Analysis: HC, OI, JLP, MH, ZX. Investigation: HC, OI, JLP, MH. Supervision: MTT, ZX. Resources: DD, MTT, ZX. Writing – original draft: ZX. Writing – review & editing: all authors.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

Agarwal R, Tang Z, Yu H, Cohen-Fix O (2003) Two distinct pathways for inhibiting pds1 ubiquitination in response to DNA damage. *J Biol Chem* 278: 45027-33

Anand R, Beach A, Li K, Haber J (2017) Rad51-mediated double-strand break repair and mismatch correction of divergent substrates. *Nature* 544: 377-380

Arnold L, Hockner S, Seufert W (2015) Insights into the cellular mechanism of the yeast ubiquitin ligase APC/C-Cdh1 from the analysis of in vivo degrons. *Mol Biol Cell* 26: 843-58

Botchkarev VV, Jr., Haber JE (2018) Functions and regulation of the Polo-like kinase Cdc5 in the absence and presence of DNA damage. *Curr Genet* 64: 87-96

Charles JF, Jaspersen SL, Tinker-Kulberg RL, Hwang L, Szidon A, Morgan DO (1998) The Polo-related kinase Cdc5 activates and is destroyed by the mitotic cyclin destruction machinery in S. cerevisiae. *Curr Biol* 8: 497-507

Chen YC, Weinreich M (2010) Dbf4 regulates the Cdc5 Polo-like kinase through a distinct non-canonical binding interaction. *J Biol Chem* 285: 41244-54

Cheng L, Hunke L, Hardy CF (1998) Cell cycle regulation of the Saccharomyces cerevisiae polo-like kinase cdc5p. *Mol Cell Biol* 18: 7360-70

Clift D, Bizzari F, Marston AL (2009) Shugoshin prevents cohesin cleavage by PP2A(Cdc55)-dependent inhibition of separase. *Genes Dev* 23: 766-80

Cohen MM, Amiott EA, Day AR, Leboucher GP, Pryce EN, Glickman MH, McCaffery JM, Shaw JM, Weissman AM (2011) Sequential requirements for the GTPase domain of the mitofusin Fzo1 and the ubiquitin ligase SCFMdm30 in mitochondrial outer membrane fusion. *J Cell Sci* 124: 1403-10

Cohen-Fix O, Koshland D (1997) The anaphase inhibitor of Saccharomyces cerevisiae Pds1p is a target of the DNA damage checkpoint pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 14361-6

Coutelier H, Xu Z, Morisse MC, Lhuillier-Akakpo M, Pelet S, Charvin G, Dubrana K, Teixeira MT (2018) Adaptation to DNA damage checkpoint in senescent telomerase-negative cells promotes genome instability. *Genes Dev* 32: 1499-1513

Crasta K, Lim HH, Giddings TH, Jr., Winey M, Surana U (2008) Inactivation of Cdh1 by synergistic action of Cdk1 and polo kinase is necessary for proper assembly of the mitotic spindle. *Nat Cell Biol* 10: 665-75

Darieva Z, Bulmer R, Pic-Taylor A, Doris KS, Geymonat M, Sedgwick SG, Morgan BA, Sharrocks AD (2006) Polo kinase controls cell-cycle-dependent transcription by targeting a coactivator protein. *Nature* 444: 494-8

Desany BA, Alcasabas AA, Bachant JB, Elledge SJ (1998) Recovery from DNA replicational stress is the essential function of the S-phase checkpoint pathway. *Genes Dev* 12: 2956-70

Donnianni RA, Ferrari M, Lazzaro F, Clerici M, Tamilselvan Nachimuthu B, Plevani P, Muzi-Falconi M, Pellicioli A (2010) Elevated levels of the polo kinase Cdc5 override the Mec1/ATR checkpoint in budding yeast by acting at different steps of the signaling pathway. *PLoS Genet* 6: e1000763

Dotiwala F, Haase J, Arbel-Eden A, Bloom K, Haber JE (2007) The yeast DNA damage checkpoint proteins control a cytoplasmic response to DNA damage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 11358-63

Edenberg ER, Vashisht A, Benanti JA, Wohlschlegel J, Toczyski DP (2014) Rad53 downregulates mitotic gene transcription by inhibiting the transcriptional activator Ndd1. *Mol Cell Biol* 34: 725-38

Galgoczy DJ, Toczyski DP (2001) Checkpoint adaptation precedes spontaneous and damage-induced genomic instability in yeast. *Mol Cell Biol* 21: 1710-8

Garvik B, Carson M, Hartwell L (1995) Single-stranded DNA arising at telomeres in cdc13 mutants may constitute a specific signal for the RAD9 checkpoint. *Molecular and Cellular Biology* 15: 6128-38

Gasch AP, Huang M, Metzner S, Botstein D, Elledge SJ, Brown PO (2001) Genomic expression responses to DNAdamaging agents and the regulatory role of the yeast ATR homolog Mec1p. *Mol Biol Cell* 12: 2987-3003

Gutteridge RE, Ndiaye MA, Liu X, Ahmad N (2016) Plk1 Inhibitors in Cancer Therapy: From Laboratory to Clinics. *Mol Cancer Ther* 15: 1427-35

Hamanaka R, Smith MR, O'Connor PM, Maloid S, Mihalic K, Spivak JL, Longo DL, Ferris DK (1995) Polo-like kinase is a cell cycle-regulated kinase activated during mitosis. *J Biol Chem* 270: 21086-91

Harrison JC, Haber JE (2006) Surviving the Breakup: The DNA Damage Checkpoint. Annu Rev Genet 40: 209-35

Hu F, Wang Y, Liu D, Li Y, Qin J, Elledge SJ (2001) Regulation of the Bub2/Bfa1 GAP complex by Cdc5 and cell cycle checkpoints. *Cell* 107: 655-65

Jaehnig EJ, Kuo D, Hombauer H, Ideker TG, Kolodner RD (2013) Checkpoint kinases regulate a global network of transcription factors in response to DNA damage. *Cell Rep* 4: 174-88

Kaye JA, Melo JA, Cheung SK, Vaze MB, Haber JE, Toczyski DP (2004) DNA breaks promote genomic instability by impeding proper chromosome segregation. *Curr Biol* 14: 2096-106

Koranda M, Schleiffer A, Endler L, Ammerer G (2000) Forkhead-like transcription factors recruit Ndd1 to the chromatin of G2/M-specific promoters. *Nature* 406: 94-8

Lee SE, Moore JK, Holmes A, Umezu K, Kolodner RD, Haber JE (1998) Saccharomyces Ku70, mre11/rad50 and RPA proteins regulate adaptation to G2/M arrest after DNA damage. *Cell* 94: 399-409.

Lee SE, Pellicioli A, Demeter J, Vaze MP, Gasch AP, Malkova A, Brown PO, Botstein D, Stearns T, Foiani M, Haber JE (2000) Arrest, adaptation, and recovery following a chromosome double-strand break in Saccharomyces cerevisiae. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 65: 303-14

Li W, Wang HY, Zhao X, Duan H, Cheng B, Liu Y, Zhao M, Shu W, Mei Y, Wen Z, Tang M, Guo L, Li G, Chen Q, Liu X, Du HN (2019) A methylation-phosphorylation switch determines Plk1 kinase activity and function in DNA damage repair. *Sci Adv* 5: eaau7566

Liang F, Wang Y (2007) DNA damage checkpoints inhibit mitotic exit by two different mechanisms. *Mol Cell Biol* 27: 5067-78

Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25: 402-8

Longtine MS, McKenzie AI, Demarini DJ, Shah NG, Wach A, Brachat A, Philippsen P, Pringle JR (1998) Additional modules for versatile and economical PCR-based gene deletion and modification in Saccharomyces cerevisiae. *Yeast* 14: 953-61

Maas NL, Miller KM, DeFazio LG, Toczyski DP (2006) Cell cycle and checkpoint regulation of histone H3 K56 acetylation by Hst3 and Hst4. *Mol Cell* 23: 109-19

Melo JA, Cohen J, Toczyski DP (2001) Two checkpoint complexes are independently recruited to sites of DNA damage in vivo. *Genes Dev* 15: 2809-21

Mortensen EM, Haas W, Gygi M, Gygi SP, Kellogg DR (2005) Cdc28-dependent regulation of the Cdc5/Polo kinase. *Curr Biol* 15: 2033-7

Mozdy AD, Cech TR (2006) Low abundance of telomerase in yeast: implications for telomerase haploinsufficiency. *RNA* 12: 1721-37

Park CJ, Song S, Lee PR, Shou W, Deshaies RJ, Lee KS (2003) Loss of CDC5 function in Saccharomyces cerevisiae leads to defects in Swe1p regulation and Bfa1p/Bub2p-independent cytokinesis. *Genetics* 163: 21-33

Pellicioli A, Lee SE, Lucca C, Foiani M, Haber JE (2001) Regulation of Saccharomyces Rad53 checkpoint kinase during adaptation from DNA damage-induced G2/M arrest. *Mol Cell* 7: 293-300.

Perez-Perez ME, Mauries A, Maes A, Tourasse NJ, Hamon M, Lemaire SD, Marchand CH (2017) The Deep Thioredoxome in Chlamydomonas reinhardtii: New Insights into Redox Regulation. *Mol Plant* 10: 1107-1125

Qian Y, Yu Y, Cheng X, Luo J, Xie H, Shen B (1998) Molecular events after antisense inhibition of hMSH2 in a HeLa cell line. *Mutat Res* 418: 61-71

Queralt E, Lehane C, Novak B, Uhlmann F (2006) Downregulation of PP2A(Cdc55) phosphatase by separase initiates mitotic exit in budding yeast. *Cell* 125: 719-32

Rabilloud T (2012) Silver staining of 2D electrophoresis gels. Methods Mol Biol 893: 61-73

Ratsima H, Ladouceur AM, Pascariu M, Sauve V, Salloum Z, Maddox PS, D'Amours D (2011) Independent modulation of the kinase and polo-box activities of Cdc5 protein unravels unique roles in the maintenance of genome stability. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108: E914-23

Ratsima H, Serrano D, Pascariu M, D'Amours D (2016) Centrosome-Dependent Bypass of the DNA Damage Checkpoint by the Polo Kinase Cdc5. *Cell Rep* 14: 1422-34

Rawal CC, Riccardo S, Pesenti C, Ferrari M, Marini F, Pellicioli A (2016) Reduced kinase activity of polo kinase Cdc5 affects chromosome stability and DNA damage response in S. cerevisiae. *Cell Cycle* 15: 2906-2919

Rodriguez-Rodriguez JA, Moyano Y, Jativa S, Queralt E (2016) Mitotic Exit Function of Polo-like Kinase Cdc5 Is Dependent on Sequential Activation by Cdk1. *Cell Rep* 15: 2050-62

Rossio V, Galati E, Ferrari M, Pellicioli A, Sutani T, Shirahige K, Lucchini G, Piatti S (2010) The RSC chromatinremodeling complex influences mitotic exit and adaptation to the spindle assembly checkpoint by controlling the Cdc14 phosphatase. *J Cell Biol* 191: 981-97

Roux P, Salort D, Xu Z (2021) Adaptation to DNA damage as a bet-hedging mechanism in a fluctuating environment. *R Soc Open Sci* 8: 210460

Sanchez Y, Bachant J, Wang H, Hu F, Liu D, Tetzlaff M, Elledge SJ (1999) Control of the DNA damage checkpoint by chk1 and rad53 protein kinases through distinct mechanisms. *Science* 286: 1166-71

Sanchez Y, Desany BA, Jones WJ, Liu Q, Wang B, Elledge SJ (1996) Regulation of RAD53 by the ATM-like kinases MEC1 and TEL1 in yeast cell cycle checkpoint pathways. *Science* 271: 357-60

Sandell LL, Zakian VA (1993) Loss of a yeast telomere: arrest, recovery, and chromosome loss. Cell 75: 729-39

Schleker T, Shimada K, Sack R, Pike BL, Gasser SM (2010) Cell cycle-dependent phosphorylation of Rad53 kinase by Cdc5 and Cdc28 modulates checkpoint adaptation. *Cell Cycle* 9: 350-63

Serrano D, D'Amours D (2014) When genome integrity and cell cycle decisions collide: roles of polo kinases in cellular adaptation to DNA damage. *Systems and synthetic biology* 8: 195-203

Sherriff JA, Kent NA, Mellor J (2007) The Isw2 chromatin-remodeling ATPase cooperates with the Fkh2 transcription factor to repress transcription of the B-type cyclin gene CLB2. *Mol Cell Biol* 27: 2848-60

Shirayama M, Zachariae W, Ciosk R, Nasmyth K (1998) The Polo-like kinase Cdc5p and the WD-repeat protein Cdc20p/fizzy are regulators and substrates of the anaphase promoting complex in Saccharomyces cerevisiae. *EMBO J* 17: 1336-49.

Simpson-Lavy KJ, Brandeis M (2011) Phosphorylation of Cdc5 regulates its accumulation. Cell Div 6: 23

Spellman PT, Sherlock G, Zhang MQ, Iyer VR, Anders K, Eisen MB, Brown PO, Botstein D, Futcher B (1998) Comprehensive identification of cell cycle-regulated genes of the yeast Saccharomyces cerevisiae by microarray hybridization. *Mol Biol Cell* 9: 3273-97

Strebhardt K, Ullrich A (2006) Targeting polo-like kinase 1 for cancer therapy. Nat Rev Cancer 6: 321-30

Tang X, Wang Y (2006) Pds1/Esp1-dependent and -independent sister chromatid separation in mutants defective for protein phosphatase 2A. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 16290-5

Tavares AA, Glover DM, Sunkel CE (1996) The conserved mitotic kinase polo is regulated by phosphorylation and has preferred microtubule-associated substrates in Drosophila embryo extracts. *EMBO J* 15: 4873-83

Toczyski DP (2006) Methods for studying adaptation to the DNA damage checkpoint in yeast. *Methods Enzymol* 409: 150-65

Toczyski DP, Galgoczy DJ, Hartwell LH (1997) CDC5 and CKII control adaptation to the yeast DNA damage checkpoint. *Cell* 90: 1097-106

Touati SA, Hofbauer L, Jones AW, Snijders AP, Kelly G, Uhlmann F (2019) Cdc14 and PP2A Phosphatases Cooperate to Shape Phosphoproteome Dynamics during Mitotic Exit. *Cell Rep* 29: 2105-2119 e4

Vidanes GM, Sweeney FD, Galicia S, Cheung S, Doyle JP, Durocher D, Toczyski DP (2010) CDC5 inhibits the hyperphosphorylation of the checkpoint kinase Rad53, leading to checkpoint adaptation. *PLoS Biol* 8: e1000286

Yaakov G, Thorn K, Morgan DO (2012) Separase biosensor reveals that cohesin cleavage timing depends on phosphatase PP2A(Cdc55) regulation. *Dev Cell* 23: 124-36

Yelamanchi SK, Veis J, Anrather D, Klug H, Ammerer G (2014) Genotoxic stress prevents Ndd1-dependent transcriptional activation of G2/M-specific genes in Saccharomyces cerevisiae. *Mol Cell Biol* 34: 711-24

Zhang T, Nirantar S, Lim HH, Sinha I, Surana U (2009) DNA damage checkpoint maintains CDH1 in an active state to inhibit anaphase progression. *Dev Cell* 17: 541-51

Zhu G, Spellman PT, Volpe T, Brown PO, Botstein D, Davis TN, Futcher B (2000) Two yeast forkhead genes regulate the cell cycle and pseudohyphal growth. *Nature* 406: 90-4

Strain	Genotype
уТ973 ^{1,3}	MATa cdc5::CDC5-3HA-TRP1
yT851 ¹	MATa cdc5::CDC5-3HA-TRP1 cdc13-1
yT853 ¹	MATa CDC5 cdc13-1
уТ855 ¹	MATa cdc5::cdc5-ad-3HA-TRP1 cdc13-1
yT1404 ¹	MATa cdc5::cdc5-ad cdc13-1
yZX055 ²	MATa/a CDC5/cdc5::HIS3MX6-pGAL1-3HA-CDC5 cdc13-1/cdc13-1
yZX056 ²	MATa/a cdc5::cdc5-ad/cdc5::HIS3MX6-pGAL1-3HA-cdc5-ad cdc13-1/cdc13-1
yZX157 ¹	MATa mec1::mec1-21 cdc5::CDC5-3HA-TRP1 cdc13-1
yZX159 ¹	MATa mec1::mec1-21 cdc5::cdc5-ad-3HA-TRP1 cdc13-1
yZX060 ¹	MATa rts1::LEU2 cdc5::CDC5-3HA-TRP1 cdc13-1
yZX063 ¹	MATa rts1::LEU2 cdc5::cdc5-ad-3HA-TRP1 cdc13-1
yZX034 ¹	MATa cdc55::LEU2 cdc5::CDC5-3HA-TRP1 cdc13-1
yZX036 ¹	MATa cdc55::LEU2 cdc5::cdc5-ad-3HA-TRP1 cdc13-1
yZX196 ¹	MATa tel1::LEU2 cdc5::CDC5-3HA-TRP1 cdc13-1
yZX194 ¹	MATa tel1::LEU2 cdc5::cdc5-ad-3HA-TRP1 cdc13-1
yT1320 ¹	MATa leu2::NDD1-3HA-LEU2 cdc5::CDC5-3HA-TRP1 cdc13-1
yT1322 ¹	MATa leu2::ndd1-CD-10A-3HA-LEU2 cdc5::CDC5-3HA-TRP1 cdc13-1
yT1324 ¹	MATa leu2::NDD1-3HA-LEU2 cdc5::cdc5-ad-3HA-TRP1 cdc13-1
yT1326 ¹	MATa leu2::ndd1-CD-10A-3HA-LEU2 cdc5::cdc5-ad-3HA-TRP1 cdc13-1
yT1120 ^{2,3}	MATa CDC5 cdc13-1
yT1124 ^{2,3}	MATa cdc5::cdc5-ad-3HA-TRP1 cdc13-1
yT1122 ^{2,3}	MATa cdc5::cdc5-16-HIS3MX6 cdc13-1
yT1115 ^{2,3}	MAT a/a CDC5/CDC5 cdc13-1/cdc13-1
yT1119 ^{2,3}	MAT a/a cdc5::cdc5-16-HIS3MX6/cdc5::cdc5-16-HIS3MX6 cdc13-1/cdc13-1
yT1113 ^{2,3}	MAT a/a CDC5/cdc5::cdc5-16-HIS3MX6 cdc13-1/cdc13-1
yT1130 ^{2,3}	MATa/u cdc5::cdc5-ad-3HA-TRP1/cdc5::cdc5-16-HIS3MX6 cdc13-1/cdc13-1
yT1126 ²	MATa/a cdc5::cdc5-ad-3HA-TRP1/cdc5::cdc5-ad-3HA-TRP1 cdc13-1/cdc13-1
yT1128 ^{2,3}	MATa/a CDC5/cdc5::cdc5-ad-3HA-TRP1 cdc13-1/cdc13-1
yT1231 ^{2,3}	MAT a/u cdc5::cdc5-ad-16-HIS3MX6/cdc5::cdc5-ad-16-HIS3MX6 cdc13-1/cdc13-1
yZX090 ¹	MATa cdc5::cdc5-S214A-3HA-TRP1 cdc13-1
yZX139 ¹	MATa cdc5::cdc5-ad-S214A-3HA-TRP1 cdc13-1
yZX064 ¹	MATa cdc5::cdc5-S2A-3HA-TRP1 cdc13-1
yZX067	MATa cdc5::cdc5-ad-S2A-3HA-TRP1 cdc13-1
yZX095 1	MATa cdc5::cdc5-S419A-3HA-TRP1 cdc13-1
yZX097 ¹	MATa cdc5::cdc5-ad-S419A-3HA-TRP1 cdc13-1
yZX094 1	MATa cdc5::cdc5-S479A-3HA-TRP1 cdc13-1
yZX092	MATa cdc5::cdc5-ad-S479A-3HA-TRP1 cdc13-1
yZX046	MATa cdc5::cdc5-T484A-3HA-TRP1 cdc13-1
yZX048	MATa cdc5::cdc5-ad-T484A-3HA-TRP1 cdc13-1
yZX190 '	MATa cdc5::cdc5-S214A-S479A-3HA-TRP1 cdc13-1
yZX187	MATa cdc5::cdc5-ad-S214A-S479A-3HA-TRP1 cdc13-1
yZX192 '	MATa cdc5::cdc5-S479A-T484A-3HA-TRP1 cdc13-1
yZX189	MATa cdc5::cdc5-ad-S479A-T484A-3HA-TRP1 cdc13-1
yZX141	MATa cdc5::cdc5-S2A-S214A-S419A-S479A-T484A-3HA-TRP1 cdc13-1
yZX142	MATa cdc5::cdc5-ad-S2A-S214A-S419A-S479A-T484A-3HA-TRP1 cdc13-1
yZX244	MATa cdc5::cdc5-S214E-3HA-TRP1 cdc13-1
yZX246	MATa cdc5::cdc5-ad-S214E-3HA-TRP1 cdc13-1
yZX248	MAIa cdc5::cdc5-S479E-3HA-IHP1 cdc13-1
yZX250	MATa cdc5::cdc5-ad-S479E-3HA-TRP1 cdc13-1
yZX252	MATa cdc5::cdc5-ad-3HA-THP1 cdc13-1 KanMX6-pGAL1-3HA-CDC20
yZX258	MATa mec1::mec1-21 cdc5::cdc5-ad-3HA-TRP1 cdc13-1 KanMX6-pGAL1-3HA-CDC20
yZX114	MATE STATULEUZ COCTO-T
y∠x0/8 '	MAT a Caco::Caco-K35A-E36A-3HA Cac13-1
yZX081	MATA COCS.:COC5-AD-K35A-E36A-3HA COC13-1
yZX131	MATE a COUD-COUD-K35A-E36A-H1/A-L2UA-3MA COC13-1
yZX133	
yKD516	мата iyszuras-iscei(ixx) rap1::GFP-наP1-LEU2 nmLΔ::HPH trp1::pGaFIScei-THP1 ura3-1::KanMX
yZX310	
yZX317	MATA COCS.:UDUS-3HA-THP1 COC13-1 FOOD AUGULEU2
yZX319	MATE
yz X323	MATa cac5-1 cac13-1

"istrains that carry TLC1 under a doxycycline-repressible pTefO2 promoter which provides for active telomerase in the absence of doxycycline (see Xu et al., 2015). All others have wild-type TLC1.

²strains that carry the fluorescent reporter construct ura3-1::caURA3-pRPS20-FHAIdomain-mCherry used to confirm checkpoint activation in microscopy experiments (see Coutelier et al., 2018).

³strains that carry the fluorescent nuclear marker hta2::HTA2-ECFP-KANMX6 (see Coutelier et al., 2018).

All strains are from the W303 background (ura3-1 trp1-1 leu2-3,112 his3-11,15 can1-100) corrected for RAD5 and ADE2 (Supplementary Table 1).

Supplementary Table 1. Yeast strains used in this study.



Supplementary Figure S1. (A) Representative western blot of untagged Cdc5 in the *cdc13-1* mutant incubated for the indicated times at 32°C. Pgk1 is shown as a loading control. (B) Representative western blot of Cdc5 in the wild-type *CDC13* strain subjected to a temperature of 32°C for the indicated times. (C) Representative western blot of Cdc5 and Cdc5-ad in the *cdc13-1* mutant incubated for the indicated times at 32°C, with or without MG132. (D) Representative western blot of Cdc5 and Cdc5-ad in the *cdc13-1* mutant incubated for the indicated times at 32°C, with or without MG132. (D) Representative western blot of Cdc5 and Cdc5-ad, with or without additional K35A E36A mutations in the KEN box. The strains all contain the *cdc13-1* allele and were incubated for the indicated times at 32°C. (E) Representative western blot of Cdc5 and Cdc5-ad, with or without additional K35A E36A mutations in the KEN box and R17A L20A in the destruction box 1. The strains all contain the *cdc13-1* allele and were incubated for the indicated times at 32°C. (F) Representative western blot of Cdc5, in *cdc13-1* or *cdc13-1 cdh1* strains. The strains were incubated for the indicated times at 32°C. (G) Microcolony assay measuring the fraction of microcolonies formed in the indicated strains at 3, 6 and 24 hrs. Data are presented as means ± SD of N = 3 independent experiments. n ≥ 150 cells for each condition. Statistical significance for *p*-value < 0.05 is indicated with "*" when compared to *CDC5* and with "Δ" when compared to *cdc5-ad*, for the corresponding time point.



Supplementary Figure S2. (A) Quantification of *CDC5* mRNA level normalized to *ACT1* measured by RT-qPCR and presented as fold increase over time point 0, in the indicated strains incubated at 32°C for 0, 3 and 6 hrs. The $\Delta\Delta$ Ct method was used for quantification of 3 independent experiments and the mean and lower/higher ranges for SD, as well as statistical significance from a t-test (*: *p*-value < 0.05), were calculated at the Ct level before log transformation. (B) Representative western blot of Cdc5 with or without overexpression in the indicated *cdc13-1* diploid and haploid strains. Pgk1 is shown as a loading control. (C) Microcolony assay measuring the fraction of microcolonies formed in the indicated strains at 3 and 24 hrs, with either an empty 2µ plasmid (pRS42H) or one expressing *CDC5* or *cdc5-ad* under their endogenous promoter, as indicated. Data are presented as means ± SD of N = 3 independent experiments. n ≥ 150 cells for each condition. These experiments were performed together with the ones presented in Fig. 3H and the two control conditions, *CDC5* 2µ-empty and *CDC5* 2µm-*CDC5*, are therefore shared between the two graphs.



Supplementary Figure S3. (A) Representative western blot of Cdc5-ad in response to telomere dysfunction in a wild-type *MEC1* or *mec1-21* mutant strain, incubated at 32°C for the indicated amounts of time and simultaneously arrested in G2 by depletion of Cdc20. (B) Representative western blot of Cdc5 and Cdc5-ad in the *cdc13-1 TEL1* or *Δtel1* strains, incubated for the indicated times at 32°C, in the presence of nocodazole. The increase in Cdc5 protein level at 6 hrs compared to 3hrs in the *Δtel1* strain is reproducible. (C) Recovery assay in *cdc13-1 RTS1* or *Δrts1* strains. Ten-fold serial dilutions of cells were incubated at 32°C for 10 hrs to induce transient telomere dysfunction and allowed to recover at 23°C afterwards, or continuously grown at 23°C as a control. (D) Microcolony assay measuring the fraction of microcolonies formed in the indicated strains at 3 and 24 hrs, first incubated in liquid galactose medium for 3 hrs before plating on galactose-containing solid media to induce a single DSB by I-Scel expression. Data are presented as means ± SD of N = 3 independent experiments. n ≥ 150 cells for each condition.



Supplementary Figure S4. (A) Silver-nitrate-stained gel showing immunoprecipitation products from *ndd1-10A cdc13-1* strains incubated for the indicated amounts of time at 32°C, which were then cut out for mass spectroscopy analysis. (B) Western blot of the immunoprecipitated Cdc5 and Cdc5-ad from *ndd1-10A cdc13-1* strains incubated at 32°C for the indicated amount of time. (C) Representative western blot of Cdc5 and Cdc5-ad, with or without additional mutation of all 5 phosphosites into alanines ("5A"), in the *cdc13-1* strain, incubated for the indicated times at 32°C. (D) Representative western blot showing the expression level of wild-type Cdc5 and indicated mutants.
Article 2 : Mise en évidence de nouvelles voies impliquées dans l'adaptation au dommage à l'ADN

L'étude des régulations de Cdc5 et de Cdc5-ad en réponse à un dommage à l'ADN nous a permis d'élucider un certain nombre de voies métaboliques impliquées dans l'adaptation. Mais nous ne connaissons pas en détails les facteurs qui contribuent à l'adaptation aux côtés du facteur clef Cdc5. C'est pour ces raisons que j'ai mis au point et conduit un crible génétique à l'échelle du génome entier sur *cdc5-ad cdc13-1* en conditions de dommage. Le mutant *cdc5ad* est spécifiquement déficient en adaptation et ne semble pas présenter d'autres défauts pour les multiples fonctions de Cdc5 dans le cycle cellulaire. En conditions de dommages, les cellules *cdc5-ad* sont arrêtées de manière permanente au *checkpoint* G2/M. Notre crible vise donc à identifier des mutations capables de contourner le défaut d'adaptation. Cette étude a mis en lumière l'implication de nombreuses voies métaboliques dans l'adaptation au dommage à l'ADN. Par ailleurs, ce crible nous a aussi permis d'évaluer la létalité synthétique de *cdc5-ad* avec d'autres gènes en condition physiologique sans dommage.

Ces travaux n'ont pas encore été publiés. Certaines analyses pourraient être poussées plus loin et des vérifications expérimentales pourraient être ajoutées, permettant de faire avancer les hypothèses mécanistiques sur les voies métaboliques impliquées dans l'adaptation au dommage à l'ADN.

L'analyse de *Gene Ontology* présentée dans ce papier a été menée par Salomé Nashed, sous la supervision de Mathilde Garcia.

Uncovering new pathways implicated in adaptation to DNA damage

Jeanne Le Peillet¹, Salomé Nashed¹, Mathilde Garcia¹, Zhou Xu¹

¹Sorbonne Université, CNRS, UMR7238, Institut de Biologie Paris-Seine, Laboratory of Computational and Quantitative Biology, 75005 Paris, France.

Abstract

In response to DNA damage, cells activate the DNA damage checkpoint, thus arresting the cell cycle and providing time for repair. When the damage persists, cells eventually turn off the checkpoint by a process known as adaptation to DNA damage. We know very little about the precise way in which specific factors are involved in adaptation, a process that seems to implicate several pathways. One factor that strongly impacts adaptation is the Polo kinase Cdc5, as a single mutation in its gene, *cdc5-ad*, completely blocks adaptation. In this study, we performed several saturated transposon genetic screens, specially designed for studying adaptation to DNA damage and identifying mutants restoring the adaptation defect of cdc5ad after inducing persistent telomere uncapping. We confirmed some genes suspected to play a role in adaptation and pointed to new ones potentially implicated in adaptation and interacting with Cdc5. Based on our results, we propose new mechanisms explaining adaptation deficiency of the *cdc5-ad* mutant. Adaptation to DNA damage seems to strongly depend on the regulation of the cohesin, the MRX and the APC/C complexes, and on the transcription of the CLB2 cluster of genes. We also reported new insights on Cdc5's degradation pathway specific to DNA damage response, implicating the APC/C subunit Cdc16, Mnd2 and Uba1. Our analysis also suggests an implication of Vhs2, Rad6, and Cytochrome C in adaptation to DNA damage, demonstrating the great diversity of pathways and mechanisms involved in adaptation.

Introduction

When the DNA of a cell is damaged, safeguards mechanisms detect the injury and trigger checkpoint activation. The DNA damage checkpoint stops the cell-cycle process and provides time during which the cell can repair the damage. In *Saccharomyces cerevisiae*, in response to a double-strand break (DSB), the DNA damage checkpoint activation consists in detecting the damage through sensor kinases Mec1 and Tel1, which then activate the effector kinase Rad53 with the assistance of numerous adaptator and mediator proteins including Rad9 (Waterman et al., 2020). Tel1 is activated by the Mre11-Rad50-Xrs2 complex (MRX), which recognizes the DSB and initiates signaling and repair. The MRX complex, associated with Sae2, cleaves the 5' extremity of the DSB site and initiates resection (Casari et al., 2019). Then long-range resection is taken over by Exo1 and Dna2-Sgs1, promoting homologous recombination (HR) over nonhomologous end-joining (NHEJ), two major pathways for DNA damage repair (Ensminger, 2020; Waterman et al., 2020).

The repair of the damage turns the checkpoint off. But some damages are not repairable in specific contexts. In that case, cells stay arrested for 4 to 16 hrs before eventually resuming their cell cycle despite the persistence of the damage. This process is called adaptation to DNA damage (Lee et al., 1998; Sandell and Zakian, 1993; Toczyski et al., 1997). Among the cells that adapted, a few manage to survive for more cell cycles, while accumulating mutations (Coutelier et al., 2018; Galgoczy and Toczyski, 2001; Toczyski et al., 1997). The Polo-kinase Cdc5 plays a central role in the adaptation to DNA damage process. CDC5 belongs to the CLB2 cluster of genes, the transcription of which is regulated by the Mcm1-Fkh2-Ndd1 complex (Edenberg et al., 2014; Spellman, 1998; Yelamanchi et al., 2014). When Cdc5 is overexpressed in the context of unrepairable damage, cells can adapt more efficiently and rapidly (Donnianni et al., 2010; Vidanes et al., 2010), while a point mutant of CDC5, called cdc5-ad (for "adaptation-defective"; L251W), is specifically deficient in adaptation to DNA damage (Toczyski et al., 1997). But strikingly, despite its essential role in allowing cells to adapt, the protein level of Cdc5 decreases over time after damage induction, reaching very low levels 6 hrs after the DNA damage checkpoint arrest (Coutelier et al., 2021), which raises the question of the role of Cdc5 degradation processes in the adaptation mechanism.

In an unperturbed cell cycle, Cdc5 is degraded in G1 by APC/C^{Cdh1}-dependent ubiquitinylation and targeted for proteasomal degradation, through the recognition of the D-boxes and the

KEN-box (Arnold et al., 2015; Charles et al., 1998; Lowery et al., 2005). But interestingly, degradation of Cdc5 after induction of DNA damage seems to occur through another pathway (Coutelier et al., 2021). The APC/C complex consists of two sub-complexes, SC8 - which contains the core subunits of APC/C and plays roles in the structure of the complex and its functions in catalysis and substrate recognition – and the tricopeptide repeat 5 (TPR5) – which contains the TPR subunits required for the metaphase/anaphase transition, as well as accessory subunits, and appear to be involved in the degradation of proteins that inhibit chromatid segregation (Barford, 2011; Goebl and Yanagida, 1991; Thornton, 2006; Zachariae, 1996). These sub-complexes are required for anaphase/metaphase transition, inhibition of chromatid separation, securing degradation, negative regulation of APC/C and ubiquitin ligase (Goebl and Yanagida, 1991; Penkner et al., 2005; Surana et al., 1993; Zachariae, 1996). Cdc16 is a subunit of the TPR5 complex and is one of the predominantly phosphorylated proteins of the APC/C complex whose phosphorylation by Cdc28 reduces the activity of APC/C^{Cdc20} (Rudner and Murray, 2000). In vitro, Cdc5 phosphorylates Cdc16 (Harkness, 2018; Rudner and Murray, 2000). In vivo, APC/C activity is reduced in a cdc5-1 mutant due to decreased phosphorylation of APC/C (Charles et al., 1998; Rudner and Murray, 2000). Furthermore, the metaphase arrest due to Cdc5 overexpression can be overcome by the cdc16-1 mutant which reduces APC/C activity (Charles 1998). Cdc5 thus appears to be a positive regulator of APC/C, while also being its substrate upon Cdc5 degradation.

Cdc5's many functions within the cell cycle have been well studied, but very little is known about its specific role or substrates in adaptation to DNA damage. Here we provide a genomewide study of genes involved in adaptation, in the context of damage induced by telomere uncapping using the thermosensitive allele *cdc13-1* in the adaptation-deficient mutant *cdc5-ad* (Garvik et al., 1995; Toczyski et al., 1997). In this study, we aimed to uncover suppressor genes of *cdc5-ad* adaptation deficiency. To do so, we adjusted the SAturated Transposition Analysis in Yeast method (SATAY) (Michel et al., 2017) to look for mutations capable of restoring the adaptation defect of the *cdc5-ad* mutant. Our approach confirmed some putative genes interacting with Cdc5 in adaptation to DNA damage, but also uncovered new genes that seem to be strongly implicated in this process. In particular, the regulation of several complexes (cohesin, MRX, APC/C) and of the cluster of genes *CLB2* seem to play major roles in adaptation to DNA damage.

Results

Adjustments of SATAY for studying adaptation do DNA damage

The Saturated Transposons Analysis in Yeast (SATAY) (Michel et al., 2017) is a genetic screening method based on the use of a transposon capable of randomly inserting itself once into the genome. It consists in inducing transposition in a large population of cells to saturate the genome with transposons, which means that at the population level, all regions of the genome will have introduced a transposon at a density of one transposon every 30-50 bp. SATAY allows the generation of libraries of hundreds of thousands of different clones by random transposon insertions. Transposons inserted into essential genes will not be detected by sequencing since the cell bearing such a transposon will die. SATAY has already been used to uncover essential gene sets under given conditions, genome-wide gene interactions, and drug targets (Michel et al., 2019, 2017). This approach shows not only which gene is important but also, in many cases, which domain of the gene appears to be involved. Since mutant libraries based on transposon insertion screens can be grown in different environments, we have adapted SATAY to look for genes potentially involved in adaptation to DNA damage. To do so, we used an adaptation-deficient strain cdc5-ad cdc13-1 transformed with the transposition plasmid pBK625 (see Material and methods). After completing the standard protocol to generate the library of transposed cells, we added a 2-days step to perform an adaptation assay (Fig. 1). To do so, we separated the total population of cells into three subpopulations, one collected immediately while the other two were incubated at the restrictive temperature of 32°C, thus uncapping the telomeres and arresting the cells at the G2/M checkpoint. Then, one of the two remaining samples was harvested after 3 hrs and the other after 24 hrs. Genomic DNA was then prepared from the three samples (time points 0, 3 and 24 hrs), digested by restriction enzymes, circularized, and PCR-amplified to select transposon-containing fragments. These amplicons were sequenced by Illumina sequencing and then mapped to the genome.

At 3 hrs, nearly all cells were arrested - except those whose transposon insertion suppressed the checkpoint signaling pathway. The additional 21 hrs of induction allowed mutants that had bypassed the checkpoint arrest to divide. Thus, our screens aimed to detect genes whose mutation by transposon insertion allowed *cdc5-ad cdc13-1* cells arrested in G2/M to bypass

Jeanne Le Peillet

this arrest. Cells with such a mutation divide, and this phenomenon is detectable in sequencing by looking at the number of reads locating the insertion of a transposon at a specific genomic region (*e.g.* a gene): the higher the number of reads corresponding to a transposon insertion site, the higher the number of the corresponding mutant cells in the culture medium, indicating that the initially mutated cell had been able to divide.



Figure 1. Outline of the experimental procedure based on SATAY and specifically designed for sturying adaptation to DNA damage. In orange is the transposon MiniDs. In dark blue is the DNA. Each step is numbered in the order they were processed. Step 1: Induction of the transposon insertion in a unique and permanent site within the genome. Step 2: Induction of the DNA damage by incubating the *cdc13-1* strains at 32°C and collecting cells at different timings (T0, T3 and T24) to perform adaptation assay. Step: Genomic DNA extraction using QiaGene protocole, followed by DNA purification (see Materials and Methods). Step 4: Digestions using Mbol and Hin1II, both enzymes were frequent cutters, which also cut into the transposon. Step 5: Intramolecular ligation circularising DNA fragments. Step 6: PCR amplifying the transposition insertion sites. Step 7: Illumina sequencing step after DNA purification.

Technical validation of the screen

Distribution of transposon insertions on the genome

In total, we performed three experiments, two of which displayed time points 0, 3 and 24 hrs, and one of which displayed only time points 3 and 24 hrs for a total of 8 datasets. On average, 386,557 independent transposons were mapped on the genome. The 8 experiments displayed a high saturation rate of transposon insertions, with an average of 1 transposon every 32 base pairs and an average median of reads per transposon of 12 (Table 1). No large area of the genome was devoid of transposons (Fig. 2A).

We also detected a preference in transposon insertion sites for centromeric regions (Fig. 2A), due to the transposon excised from a centromeric plasmid and that centromeres physically

cluster together in the Rabl configuration (Taddei and Gasser, 2012), thus promoting transposon insertion in these regions, as previously observed (Michel et al., 2017).

Besides, autocorrelation analysis of transposon insertion sites revealed a periodicity of ~160 bp corresponding to an insertion preference for the inter-nucleosomal region (Fig. 2B), as observed previously (Michel et al., 2017).

Experiment	Time	Total number of reads	Total number of transposons	Transposon density (nb of transposons per base)	Number of transposons in common between 3 and 24 hrs	Common transposon density between 3 hrs and 24 hrs	Median of reads per transposon
#1	0 hrs	14936811	385837	1/31			10
	3 hrs	15982378	473004	1/25			9
	24 hrs	14024182	270116	1/44	143022	1/84	12
#2	3 hrs	17899113	517599	1/23			9
	24 hrs	15858363	309509	1/39	126316	1/95	13
#3	0 hrs	26334196	350988	1/34			17
	3 hrs	22876619	325782	1/37			13
	24 hrs	30095309	459624	1/26	165387	1/73	11

Table 1. Statistics of the libraries of our 8 datasets.

Discrimination of genes annotated as essential

The distribution of transposons per gene showed a very clear difference between coding DNA sequences (CDS) that are not annotated as essential (22.75, mean of the medians from our 8 experiments) and the genes annotated as essential (5.25) (Fig. 2C and Supp. Fig. S1A-C). This drastic difference was not due to gene length, since the average length of genes annotated as essential (~1586 bp) is greater than that of genes annotated as non-essential (~1282 bp, average length of all CDS: ~1345 bp).

We wanted to compare the essentiality of genes between our data and those of Michel and colleagues. Therefore, we looked at the genes with a number of transposons characteristic to

genes annotated as essential, meaning below the threshold that best discriminated essential genes from non-essential genes according to their distribution curve of the number of transposons inserted per gene. The threshold was specific to each dataset: for Michel and colleagues, the threshold was 4 transposons per gene, 3 for experiment #1 T0, and 5 for experiment #2 T0. Each dataset and the corresponding threshold were then normalized by the total number of transposons inserted, and the deviation of the number of transposons per gene from the normalized threshold was evaluated. Genes with a number of transposons fewer than 5 points away from this deviation were considered essential, and those with a number of transposons 5 points above this deviation were considered non-essential. Between these two limits was a zone of uncertainty concerning gene essentiality. With these criteria, we found 881 genes concerning Michel and colleagues' dataset, as well as 1079 and 573 genes for our experiments 1 and 2 respectively. We found 666 genes in common between Michel and colleagues' dataset and at least one of our two experiments. This result indicated that 76% of the essential genes found in Michel and colleagues' data were equally essential in our experiments, meaning that we mostly found the same essential genes (Supp. Fig. S1D).

In addition, we analyzed in our data a list of essential genes previously established based on the tolerance of these genes to C-terminal, N-terminal or mixed truncations (Michel et al., 2017). We therefore assessed transposon insertion sites in these sets of genes, and we obtained similar results for our eight data sets (Supp. Fig. S2A)



Figure 2. (A) Profile of the transposon density across the whole genome, taking the example of experiment 1 time point 3 hrs. The dashed lines indicate the centromere of each chromosome. (B) Autocorrelation analysis of transposon density. Transposon insertion densities were calculated from the time 3 hrs experiment dataset by averaging the number of transposons inserted in an 800 bp sliding window. The y-axis gives the correlation value between transposon density and itself shifted by the value on the x-axis. Circles indicate local maxima, revealing a periodicity of ~160 bp. (C) Histogram of the number of transposons found in every CDS, taking the example of experiment 1, time point 3 hrs (other examples are displayed in Supp. Fig. 1). The vertical dash line is the median of the distribution. Genes are categorized as all CDS (dark green) and essential (green).

Genetic interaction with cdc5-ad and cdc13-1 in unchallenged conditions

cdc5-ad was found to be synthetic lethal with 57 genes

The *cdc13-1* mutant has been reported to be proficient in telomere capping at permissive temperature (Garvik et al., 1995). However, the literature does not report a defect in *cdc5-ad* in functions other than adaptation to DNA damage and it does not seem that the correct operation of *cdc5-ad* has been analyzed on all its functions. Although no particular phenotype has been observed for *cdc5-ad* in the absence of damage, there may be fragility in some of its functions. Our screen was not specifically designed to study synthetic lethality, but we had

two replicates for time 0 hr, *i.e.* in the absence of any DNA damage, giving us the opportunity to study synthetic lethality.

We compared the essential genes in our experiments at time point 0 hr with the wild-type dataset from (Michel et al., 2017). The threshold chosen was the same as previously described. To study the synthetic lethality of *cdc5-ad*, we considered genes that were non-essential in the Michel and colleagues' dataset, but essential in our two experiments. We obtained a list of 57 genes fitting these conditions (Supp. Table S1).

Twenty genes related to the Cytochrome C, ATP synthase, ribosome biology, or cell death regulation appeared in this list, among which 18 are mitochondrial genes that cannot be interpreted robustly due to the volatility of the copy number of these genes. The two remaining genes code for Rrp7, one of the 2 subunits of the Rrp7-Utp22 complex essential for the formation of the 40S subunit of the ribosome, and Tim11, a subunit of ATP synthase. Apart from these genes, a gene involved in the regulation of cell proliferation was revealed in our screen, *TPM1*, which encodes for Tropomyosin-1, known to be a tumor suppressor in humans (Wang et al., 2019). Besides, *TAF12* also appeared in our analysis and is involved in oncogene processes as well in humans, but also chromosome instability in yeast (Duffy et al., 2016).

In addition, one of the genes from the *CLB2* cluster, *CHS2*, could be considered synthetic lethal with *cdc5-ad cdc13-1* because the number of inserted transposons shows a deviation from the threshold within the grey area: -5 points for experiment 1 and -3 points for experiment 2. Apart from *CHS2*, 2 other genes of the *CLB2* cluster were found to be synthetically lethal in at least 1 of our 2 replicates: *CLB2* (threshold deviation -14 for experiment 2, +45 for experiment 1 and +12 for Michel's team data) and *MOB1* (threshold deviation +38 for experiment 1, -14 for experiment 2 and +24 for Michel's team data).

Interestingly, the Y' element ATP-dependent helicase protein 1 copy 4 (*YRF1-4*) was part of this list. This gene belongs to the YRF1 family of DNA helicases involved in telomere maintenance (Yamada et al., 1998).

Taken together, these results showed that the *cdc5-ad* mutant seemed synthetic lethal with some genes, but that half of them have no known function, while another important part was found to concern mitochondrial genes or processes that do not seem to be specific to *cdc5-ad*. Two genes however were of interest, *TAF12* and *TPM1*, because of their roles in genomic

instability and uncontrolled cell division. Furthermore, quite unexpectedly, a gene might be more related to *cdc13-1*, *YRF1-4*, as it is involved in telomere maintenance. The *cdc13-1* mutant might therefore not be completely free of defects at permissive temperature as it was expected to be.

The lethality of 126 genes appeared to be suppressed in cdc5-ad cdc13-1

We also looked at genes with the opposite behavior, meaning genes displaying fewer transposons in Michel's dataset than the threshold previously described, but more in our experiments. This analysis highlighted 126 genes whose lethality is suppressed in the *cdc5-ad cdc13-1* mutant (Supp. Table S1).

A large number of genes in this list function in general metabolic pathways and might not be specifically related to the *cdc5-ad cdc13-1* mutations. Among them, 11 genes involved in amino acid synthesis were found (*AAT2, ARO7, DYS1, ILV1, LYS9, MET17*, the *SSY1-PTR3-SSY5* genes which encode for the plasma membrane SPS complex, and *TYR1*), 4 in nucleic acid synthesis (*ADE4, ADE57, ADE6, ADE8*), 20 in mitochondrial processes (*ACO1, ACP1, ADH1, ARH1,* the ATPase encoded by *CDC48* and its adaptor encoded by *DOA1, DML1, FAD1, FAS1, IBA57, ISD11, JAC1, MAK5, MRPL49, NAN1, PET9, PPT2, PSD1, RIB7, SAM50*), 4 in ATP synthase (ATP1, 2, 12 and 18), 11 genes implicated in Golgi processes (*BRO1, DID2, DOP1, OCH1, EXO70, PSD2, SEC7, TRP120, VPS4, 20, 24, 25, 33*), and 5 in tRNA modifications (*TAD2-TAD3, TRM5, 2* out of the 5 genes encoding for EKC/KEOPS complex: *KAE1* and *PCC1*). Besides, 4 genes implicated in transcription regulation (*MOT1, TUP1, PDC2, RAP1*), 2 in mRNA regulation (*CFT1, PFS2*), 3 in transcription regulation and structure (*INO2, RTP1, SRB5*), and 1 in DNA replication initiation recognition (*ORC1*) were found.

On the other hand, several genes were of interest because of their involvement in processes potentially related to Cdc5 activity. Among them, 2 genes involved in DSBs processes (*PRI2*, *RAD6*), 1 in chromatin regulation (*RSC4*, of the RSC complex), 2 genes implicated in cell cycle progression (*CAK1* which encodes a cyclin-dependent kinase-activating kinase and phosphorylates and activates Cdc28, allowing cell cycle progression; *CDC40*, important for G1/S transition and required for DNA synthesis during mitosis and meiosis), and 5 genes involved, to some extent, in chromatid cohesion (*SMC1*, *SMC3*, *NSE1*, *CBF2*, *TOP3*). Smc1 and Smc3 are 2 of the 5 cohesin subunits and physically interact with Cdc5. This Cdc5-cohesin

physical association has been reported as facilitating DNA damage response (Mishra et al., 2016a; Pakchuen et al., 2016). Nse1 is a subunit of the *SMC5-SMC6* complex involved in chromosome segregation (Farmer, 2011), Cfb2 is a subunit of the centromere DNA-binding protein complex *CBF3* and Top3 is involved in mitotic sister chromatid cohesion.

Altogether, the vast majority of genes for which lethality was suppressed in *cdc5-ad cdc13-1* seemed to concern very general processes that were difficult to link directly to Cdc5 activity. However, we found 11 genes involved in repair, cell cycle progression, and chromatid segregation, three processes in which Cdc5 also plays an important role (Botchkarev and Haber, 2018; Lee, 2003), suggesting a function of Cdc5 necessary for the lethality in mutants of these genes and which would be lost in *cdc5-ad*.

Genetic analysis of *cdc5-ad cdc13-1* mutants restoring adaptation in DNA damage conditions

The genetic screen revealed 136 genes whose mutation significantly rescued the adaptation defect of the *cdc5-ad cdc13-1* strain

We chose to set the enrichment factor to x1.5, to account for sampling variability. Besides, we focused only on transposons found at both time points 3 hrs and 24 hrs. We then cross-referenced the lists of genes meeting these criteria for each of the three experiments after normalizing by the total number of reads obtained for each dataset. We found 1,075 genes from experiment 1, 2,577 from experiment 2 and 2,430 from experiment 3. A total of 1,568 genes were enriched in at least 2 out of the 3 experiments (Fig. 3A).

We then performed a statistical analysis using a Wald test on the 3 experiments (see Materials and Methods). From this analysis, 136 genes were significantly enriched by a factor of >1.5 (Fig. 3B & Supp. Table S2), among which 36 have no known function in the literature, while a small group was annotated as essential genes (14 out of 136). Conversely, 131 genes were significantly depleted, of which 7 were annotated as essential (Supp. Table S2). We analyzed these 2 lists separately in the following sections to reveal genetic interactions potentially involved in adaptation.

Gene ontology analysis revealed pathways potentially involved in adaptation

We performed a GO analysis (see Materials and Methods), on the list of the 136 genes statistically enriched in our three experiments. We selected GO terms for which the proportion of genes from our list was significantly higher than their proportion in the genome (p-value from a hypergeometric test < 0.05), and focused on GO terms containing at least 5 genes in total. We observed (Fig. 3C & Supp. Table S3) that the GO terms that best represented our data were "nuclear cohesin complex" (GO:0000798), containing SMC1, IRR1, SMC3, SCC1 and REC8, and "negative regulation of protein serine/threonine kinase activity" (GO:0071901), containing GPB1, GPB2, YDL073W, PHO81, YPL074W, FAR1, SIC1, SPL2 and BCY1. In these 2 GO terms, SCC1, REC8, SPL2 and BCY1 were among the list of 136 statistically enriched genes. Another interesting GO term was "anaphase-promoting complex" (GO:0005680), containing CDC20, CDC23, CDC26, CDC27, CDH1, DOC1, AMA1, APC1, APC2, APC4, APC5, APC9, APC11, SWM1, YDR161W, MND2 and CDC16 of which the last 2 are statistically enriched. As most of these genes are essential, it makes sense not to find all of them in our analyses. Besides MND2 and CDC16, other genes implicated in proteolysis were part of this list as well: DOA1; NTA1 and the proteasome subunit PRE3; RAD6 and UBP7 involved in the regulation of the level of protein ubiquitination (Supp. Table S2).

Taken together, these results suggested a strong involvement of protein degradation dynamics in the adaptation to DNA damage as well as in the regulation of chromatid segregation.

Cross-analysis with other genetic screens

Several previously published screens might be relevant as a comparison for our screens. First, as we were studying adaptation in the context of induction of telomere dysfunction by the temperature-sensitive gene *cdc13-1*, we were interested in the suppressor genes of the *cdc13-1* phenotype listed by Addinall and colleagues (Addinall et al., 2008). Of the 236 genes (a fraction of 0.036 to the total number of genes) referenced as strong or weak suppressors of the *cdc13-1* phenotype, 6 (*ASH1*, *DOA1*, *KAP122*, *OCA2*, *VHS2*, and *YMC2*) were found in our list of 136 enriched genes and 4 (*COX23*, *FYV10*, *IRC7*, *PKH3*) among the 131 depleted genes (Fig. 3D), meaning that the representations of the strong suppressors in these 2 lists of genes are respectively 0.031 and 0.044. The *cdc13-1* suppressor genes were thus globally neither enriched nor depleted in our screen. Although we might have expected an enrichment, this

result was not surprising since our screen was done under different experimental conditions than Addinal and colleagues and was not intended to reveal *cdc13-1* suppressors.

Besides, Snead and colleagues (Snead et al., 2007) have established a list of potential Cdc5 substrates using biochemical and bioinformatic approaches. Among them, some have already been verified as Cdc5 substrates. But no comprehensive study of Cdc5 substrates has been conducted in the specific context of adaptation to DNA damage, nor more generally in response to DNA damage. Of the 192 potential Cdc5 substrates identified, 3 (*CDC55, SLG1, and ZDS1*) were present in our list of depleted genes and 7 (*ASH1, SCC1, PIG1, REG1, REF1, SIM1,* and *SKM1*) in our list of enriched genes (Fig. 3D). We observed that *ASH1* stood out in this cross-analysis again. We also noted the presence of *CDC55* among the depleted genes: we could have expected to find it among the enriched genes as we previously found that *CDC5 cdc55A* can adapt better than *CDC5* wild type, but this result was not completely inconsistent either, since we previously demonstrated that *cdc5-ad cdc55A* is adaptation defective (Coutelier et al., 2021).

BioGrid, an open-access database resource that houses manually curated protein and genetic interactions from multiple species including *Saccharomyces cerevisiae* (Oughtred 2021), provided a list of 219 genes with a verified or suspected interaction with Cdc5. Of these genes, 6 (*CDC16, EAF3, SCC1, RCF1, REC8,* and *REG1*) were present in our list of enriched genes, and 2 (*CDC55* and *YDL186W*) are in the list of depleted genes (Fig. 3D). Interestingly, Cdc55 appeared here again. We will discuss its potential functions in adaptation bellow.

These cross-referenced analyses revealed several genes in common: *ASH1, CDC55, SCC1,* and *REG1,* suggesting the existence of direct or indirect interaction with Cdc5. All these genes are known to be involved in the DNA damage response: Ash1 is a subunit of Rpd3 complex involved in DNA damage checkpoint arrest (Scott and Plon, 2003), Cdc55 is a subunit of PP2A and Reg1 is 1 of 2 subunits of PP1. Both PP2A and PP1 complexes are involved in the DNA damage response (Ramos et al., 2019, p. 20199). Scc1 is a subunit of the cohesin complex, involved in DNA damage repair (Sjögren, 2001).



Figure 3. (**A**) Venn diagram of x1.5 enriched genes in reads, only for transposons that were common between time 3 hrs and time 24 hrs, for all the 3 experiments. The number of reads was normalized by the total number of reads detected in each experiment. (**B**) Volcano plot of the enrichment in reads per genes in the subset of transposons common to time 3 hrs and 24 hrs. In grey are the genes that presented no statistical differences between time 3 hrs and time 24 hrs. In light blue are the genes that were enriched in reads by a factor of >1.5, and in dark blue are those depleted in reads by the same factor. The horizontal line represents the p-value at 0.05. The 2 vertical lines are the limits of enrichment or depletion by a factor of 1.5 (Supp. Table S2). (**C**) The most representative GO terms in our list of 136 genes were statistically enriched. In blue the GO term "nuclear cohesin complex" (GO:0000798), in orange the GO "anaphase-promoting complex" APC/C (GO:0005680). All the GO ids corresponding to the GO names are displayed in (Supp. Table S3). Abbreviations used: mb for membrane, mt for mitochondria, dpdt for dependent. (**D**) Genes in common between our enriched or depleted gene lists and the following lists of genes: the suppressors and strong-suppressors of the *cdc13-1* phenotype (Addinall et al., 2008),

the putative substrates of Cdc5 (Snead et al., 2007), and the list provided by BioGrid listing all the known and putative genes interacting genetically or physically with Cdc5. Genes in common with the list provided by BioGrid are listed in the order of robustness provided by BioGrid according to the amount of evidence of interactions in the literature. In blue are marked the genes that appear several times.

Alternative analysis of enrichments in reads and transposons in the screens

To understand the behavior of the 136 genes statistically enriched we listed, we looked at the enrichment profile of these genes over the times 0, 3 and 24 hrs for the reads of all transposons, after applying a normalization by the number of total reads in each dataset (Fig. 4). Seven main profiles emerged from this analysis. The genes that showed decreased number of reads between 0 and 3 hrs seemed to indicate that the mutation of these genes would be deleterious in the context of telomere dysfunction. Among these genes, some were enriched again at 24 hrs, showing that under checkpoint arrest, their mutation seemed to allow cell divisions despite their potential short-term cytotoxicity. This profile concerned mostly reads from transposons inserted into C-terminal regions, revealing non-lethal truncations in some essential genes, such as SCC1, the deletion of which is lethal (Heo et al., 1998). SCC1 transposon insertion profile matches with a C-terminal truncation, explaining how an essential gene can be among the list of enriched genes (Supp. Fig. S3). Another interesting profile corresponded to genes whose mutation is neutral between time points 0 and 3 hrs but allowed the cells to bypass the checkpoint arrest during the adaptation time, between 3 hrs and 24 hrs, indicating a potential DNA-damage-specific effect. Other genes presented an increasing enrichment from time 0 hrs to time 24 hrs, which might be consistent with checkpoint mutants, even if no known checkpoint genes were found in this category. For the genes that finally presented a depletion between time points 3 and 24 hrs, it could reflect cell death caused by an ultimately deleterious mutation under conditions of persistent damage.

Because the read enrichment behavior of the genes can vary greatly depending on whether we considered the common transposons at 3 hrs and 24 hrs or all the sequenced transposons, we wished to compare the list of 136 genes previously described with the list of genes statistically enriched in reads by a factor of x1.5 taking into account all the transposons, normalized by the total number of transposons for each dataset.

This second list contained 156 genes (Supp. Fig. S3A & Supp. Table S4). Only three genes (*DPB3*, *EAF3*, and *STL1*) are in common between these two lists. The fact that genes enriched

in reads for the common transposons at 3 hrs and 24 hrs were no longer among the genes enriched in reads when all the transposons were considered could be explained by the fact that the transposons present at 3 hrs were either more numerous or had more reads than the transposons present at 24 hrs, thus downgrading these genes to the category of non-enriched genes. The three genes found in common code for the following proteins: Dpb3 is the largest subunit of the DNA polymerase II and is involved in Rad9-dependent DNA damage checkpoint activation (Casari et al., 2021); Eaf3 is a subunit of the histone deacetylase complex RPD3 (Carrozza et al., 2005) – which also includes Ash1 mentioned above –, and the gene *EAF3* was already found among the genes in common between the list of 136 enriched genes (Fig. 4C) and the list of potential substrates of Cdc5 given by BioGrid; Stl1 is involved in glycerol transport (Ferreira et al., 2005). In this second list of 156 genes, we found another gene implicated in the amino acid biosynthesis pathway (*HOM2*, methionine pathway). This list also revealed the potential involvement of some new pathways such as the flavin biosynthesis pathway (with *FAD1*) and the TCA cycle (with *ACO1*), as well as the ubiquitin-proteasome pathway, with *UBA1*.



Figure 4. Heat map representing the changes of the number of reads of all the transposons sequenced in the cell population before induction of damage (T0) and after 24 hrs of induction of damage (T24), compared to a reference fixed at 3 hrs of induction (T3). The list of genes considered for this analysis is that of the 136 genes statistically enriched in reads only with respect to the transposons common at times T3 and T24. Two of these genes (*ELF1* and *YGR068W-A*) are not represented because they have only one transposon in at least one experiment, which makes the observed enrichment unreliable. The heat map was done with TM4 (Saeed, 2003), and the genes were clustered with Euclidean distance. Reads were normalized by the total read number for each dataset. On the right are displayed the seven main profiles observed.

As we also observed that genes could display enrichment in transposons too, we looked at a list of genes significatively enriched in transposons by a factor of 1.5, using a Wald test. This analysis revealed a list of 122 genes (Supp. Fig.4B), among which 35 genes were in common with the list of 122 genes (Supp. Table S4). *DOC1*, implicated in ubiquitinylation processes and APC/C activity regulation, was part of this list, reinforcing our previous hypothesis about APC/C implication in adaptation to DNA damage. Another 4 genes (*CAB2, DOA1, HPA2,* and *MHR1*) were also found in common between the 122 genes enriched in transposons and the 156 genes enriched in reads for all transposons. *DOA1* is implicated in ubiquitin-mediated proteolysis (Johnson et al., 1995). We also found 35 genes in common with the list of 122 genes (Supp. Table S4). *DOC1,* implicated in ubiquitinylation processes and APC/C activity regulation, was found in this list, reinforcing our previous hypothesis about APC/C activity regulation to DNA damage.

Finally, we also compared the set of the 131 depleted genes in reads from common transposons between time points 3 hrs and 24 hrs previously described with the list of depleted genes by a factor of 1.5 in reads for all transposons (128 genes) and genes depleted by a factor of 1.5 in transposons (55 genes), with all datasets normalized by the total number of reads and transposons (Supp. Fig. S4D & Supp. Table S5). The lists of 55 genes and 131 genes displayed no common genes. The lists of 55 genes and 128 genes displayed 16 elements in common (Supp. Table S5) and the lists of 128 genes and 131 genes displayed 6 common genes (*GIM5*, *MRPS28*, *PMC1*, *TAF14*, and *YKL162C*).

All these results highlighted the complexity of the analysis of our screen. By crossing all our 3 lists of enriched genes (in reads and transposons) presented above, we observed the recurrence of the involvement of protein degradation systems (APC/C complex; *PRE3*, a subunit of the proteasome; *RAD6*, *UBP7*, *UBA1* implicated in the regulation of ubiquitinylation), histone and chromatin expression and modification (*ASH1*, *EAF3*, *FPR1*, *HHT2*, *HPA2*) and cohesin regulation (two enriched genes out of five: *SCC1* and *REC8*). The consistency of these different analyses was reinforced by the presence of different genes involved in the same complexes from one analysis to another: the Rpd3S complex (3 genes out of 5 were enriched in all our analyses: *EAF3*, *UME1*, *RPD3*), the Rpd3L complex (4 genes out of 11: *ASH1*, *RPD3*, *SDS3*, *UME1*), the APC/C complex (3 genes out of 17: *DOC1*, *CDC16*, *MND2*).

Cdc5 and MRX might interact genetically to regulate adaptation to DNA damage

In addition to the analyses from the combined SATAY experiments, we also investigated the results of individual screens. To compensate for the intrinsic noise, we focused on complexes whose genes had similar behavior. Among the complexes that emerged enriched in one of our screens, the MRX complex and its associated protein Sae2 appeared to be very good candidates for genetic interaction with Cdc5, specific to adaptation to DNA damage.

Our first experiment revealed that *MRE11* was enriched between times 3 hrs and 24 hrs, by a factor of almost 2, both in transposons and reads (Fig. 5A&B). In this analysis, we kept all the sequenced transposons, whether they are present in the 3-time points or not. *RAD50* also appears to be enriched in both analyses, and *SAE2* to a lesser extent. In contrast, the number of transposons and reads did not vary between 3 and 24 hrs for *XRS2*. Overall, the complex as a whole appeared to be globally enriched between 3 and 24 hrs on our screen.

To experimentally test whether MRX mutants restored adaptation in a *cdc5-ad cdc13-1* strain, we generated deletion mutants of all 3 genes. We verified the expected sensitivity of the 3 deletion mutants to camptothecin (Fig. 5D). The spot tests showed decreased survival for all the MRX and *SAE2* deletion mutants when grown on camptothecin, as expected (Mimitou, 2010; Oh et al., 2016; Seeber et al., 2016). We performed a microcolony assay (Fig. 5C) to

assess adaptation of those strains, measuring the fraction of microcolonies formed by CDC5 and cdc5-ad cells, combined or not with deletion of the MRX genes and SAE2, at 3 and 24 hrs (Toczyski, 2006). For this assay, we quantified the ratio between the number of microcolonies constituted of at least 3 cell bodies and the number of microcolonies with 2 or fewer cell bodies. The results showed a significant increase in adaptation rates in the cdc5-ad Δmre11 and cdc5-ad Δxrs2 mutants compared to cdc5-ad (Fig. 5C), which partially supported our hypothesis, as the deletion of the MRE11 gene did indeed allow the cdc5-ad strain to bypass the arrest (Fig. 5A&B), which explains why we could detect this gene on our screen. However, to avoid the checkpoint-deficient phenotype of the deletion of MRE11 (Grenon et al., 2001), it would be wise to perform a microcolony assay on the nuclease-dead mre11-H125N mutant (Moreau et al., 1999). No significant difference was found for cdc5-ad Δrad50 and cdc5-ad Δ sae2 though (Fig. 5C). We checked for the transposon insertion sites in XRS2 (Sipp. Fig. S2) and observed that its C-terminal region was densely targeted by transposons compared to the rest of the gene. The high concentration of insertion sites in a given region could explain the initially divergent results between the screen and the microcolony assay, a hypothesis that will be detailed in the discussion.

Taken together, our results suggested a significant involvement of the MRX complex and the associated protein Sae2 in adaptation to DNA damage.



Figure 5. (**A**) Transposon enrichment between the time points 0, 3, and 24 hrs. Transposons are normalized by the total number of transposons, using the experiment 2 dataset. *MRE11* in dark blue, *RAD50* in purple, *XRS2* in light blue, and *SAE2* in red. (**B**) Read enrichment between the time points 0, 3, and 24 hrs. Reads are normalized by the total number of reads, using the experiment 2 dataset. (**C**) Microcolony assay measuring the fraction of microcolonies formed by *cdc13-1 CDC5* and *cdc13-1 cdc5-ad* cells at 32°C, deleted for the genes *MRE11*, *RAD50*, *XRS2*, and *SAE2*, as indicated. Data are presented as means \pm SD of n \geq 3 (each n is indicated directly below the histogram). The number of counted cells per experiment is > 100 for each condition. (**D**) Yeast strains of indicated genotypes spotted in serial dilutions on agar plates: YPD as a control and camptothecin-containing plates (70 ng/ml). Growth was monitored after 4 days at 23°C.

Discussion

The synthetic lethality study of the *cdc5-ad cdc13-1* mutant revealed 2 genes linked to genomic instability and 1 gene involved in telomere maintenance

The overall results indicated that the *cdc5-ad cdc13-1* mutant showed synthetic genetic lethality with several genes, but most of them either had no known function or belonged to the mitochondrial genome which was not reliable for further analysis due to many sources of variation of its copy number.

The lack of an obvious synthetic lethality with a signaling pathway in which Cdc5 might have a role supports the fact that, to date, no function other than adaptation has been reported to be impaired in the *cdc5-ad* mutant. That said, the potential relationship between *cdc5-ad* and the *TAF12* and *TPM1* genes, which encode proteins involved in oncogenic processes in humans and whose mutants are associated with genomic instability in yeast, could be further investigated (Duffy et al., 2016; Wang et al., 2019). Surprisingly, while Cdc13-1 is reported to be functional at permissive temperatures, one of the synthetic lethal genes might be related to the *cdc13-1* mutation rather than the *cdc5-ad* mutation since the *YRF1-4* gene potentially encodes a helicase involved in telomere maintenance in a telomerase-independent manner (Yamada et al., 1998). Cdc13 is known to recruit telomerase, and the *cdc13-2* mutant, which like *cdc13-1* does not show a defect in telomere protection at permissive temperature, nevertheless shows a defect in telomere replication (Nugent et al., 1996). Perhaps Cdc13-1 also has a telomere replication defect that might be corrected by the helicase Yrf1-4.

Cdc5 might target Vhs2 to promote adaptation to DNA damage

Vhs2 is a protein that until recently had no known function. However, it has been characterized as being involved in the regulation of septin ring dynamics at the bud neck after entry into mitosis, presumably by stabilizing the septin ring structure and being potentially phosphorylated by the subunit Cdc28 of Cdk1 and dephosphorylated by Cdc14 (Cassani et al., 2014). These results implicate that Vhs2 is directly regulated by Cdc5 through Cdc14 (Botchkarev and Haber, 2018). Our results suggest that the inactivation of Vhs2 might bypass *cdc5-ad cdc13-1*'s cell cycle arrest, a hypothesis supported by the fact that Cdc5 is known to be recruited to the septin ring where it allows the degradation of Swe1 by phosphorylation,

favoring the correct start of mitosis (Asano, 2005; Sakchaisri, 2004; Song et al., 2000). This hypothesis will be tested in the future by assessing the adaptation defect of *cdc5-ad* in a phosphomimetic mutant of Vhs2 which would render its phosphorylation by Cdc28 obsolete. Thus, we would expect to observe adaptation restoration in the *cdc5-ad cdc13-1* strain as well.

A potential role for APC/C-dependent degradation mechanisms in adaptation

Degradation mechanisms appeared to be a key point of adaptation to DNA damage as our analyses revealed that the mutation of many genes involved in ubiquitinylation processes (RAD6, DOA1, UBA1, UBP7) and the APC/C complex (CDC16, DOC1, MND2) promoted adaptation in *cdc5-ad cdc13-1* strains. We showed in a previous study that Cdc5 degradation in response to DNA damage does not seem to occur through the canonical pathways, implicating Cdh1 and Cdc20 (Arnold et al., 2015; Charles et al., 1998). Our results, therefore, point to other genes promoting protein degradation and their potential direct or indirect interaction with Cdc5 could be investigated further. For instance, Doc1 is a subunit of the APC/C complex that promotes D-box recognition (Carrozza et al., 2005). Rad6 also seemed to be an interesting factor as already explained in the previous section. Rad6 is implicated in ubiquitinylation processes facilitating translesion synthesis in G2/M (Prado, 2021). RAD6 expression levels increase during a normal cell cycle at the S/G2 transition and rad6 mutants arrest at this point in the cell cycle. Its levels also increase in response to DNA damage (Kupiec and Simchen, 1986). Inhibition of Rad6 reduces the phosphorylation of Rad53 and the in vitro activation of its kinase activity in response to DNA damage, thus partially bypassing the checkpoint arrest (Giannattasio et al., 2005). Our results were thus consistent with these results, as RAD6 was enriched in our screen, meaning that its mutation promoted adaptation in response to telomere dysfunction. The involvement of Rad6 in protein ubiquitination linked adaptation to the dynamics of degradation, a process that is strongly evident in our various analyses, as discussed below.

The degradation pathways highlighted in our study could not only help to uncover the Cdc5 degradation mechanism in response to DNA damage but also be involved in the general regulation of proteins in DNA damage conditions.

Transcriptional regulation of the *CLB2* gene cluster plays a major role in restoring adaptation ability in the *cdc5-ad cdc13-1* strain

CDC5 belongs to a cluster of genes containing 35 other genes (Spellman, 1998). Among them, *CHS2* could be considered synthetic lethal with *cdc5-ad cdc13-1* as the number of inserted transposons shows a deviation from the threshold - described above - which is in the grey area. The synthetic lethality of the *CLB2* cluster genes suggests that Cdc5-ad may be deficient in some essential functions otherwise performed by *CLB2* cluster genes, in a DNA damage-free cell cycle.

The hypothesis concerning the essential role of *CLB2* cluster in adaptation is moreover strongly supported by the following observation from our analyses of enriched genes: *ASH1*, *EAF3*, *RPD3*, *SDS3*, and *UME1* are enriched in reads in our screens, indicating their mutation managed to bypass DNA damage checkpoint arrest in the *cdc5-ad cdc13-1* strain. *ASH1* and *EAF3* encode for a subunit of the Rpd3 complex, the large one and the small one respectively. Rpd3 complex has been reported as inhibiting the expression of the *CLB2* cluster of genes (Veis et al., 2007). Besides, the transcription of the *CLB2* cluster is regulated by the transcription factor Fkh2, and it appeared that *FKH2* was found highly enriched in reads our first experiment (2.2 enrichment factor) but also in transposons for our 3 experiments (data not showed). Overall, the adaptation defect of *cdc5-ad* can be circumvented by increasing the transcription of the *CLB2* cluster (Coutelier et al., 2021) and the mentioned genes could therefore be interesting candidates for further research in understanding the adaptation deficiency of *cdc5-ad*.

Sister chromatids separation in adaptation to DNA damage as a key event

Not only did cohesin appear to be to most represented GO term in our analysis, but also multiple factors implicated in cohesin and cohesin regulation seemed to be putative substrates of Cdc5 after crossing our list with putative or identified interacting partners of Cdc5 provided by BioGrid (Fig. 3C).

SCC1 and *REC8* both encode cohesin complex subunits inhibiting sister chromatids separation (Sakuno and Hiraoka, 2022) and were significantly enriched in reads in our analysis, meaning their mutations seem to bypass the permanent checkpoint arrest of *cdc5-ad*. Cdc5 is known to control the removal of cohesion (Alexandru et al., 2001) and Scc1 is known to be

Jeanne Le Peillet

phosphorylated by Cdc5 in *cdc13-1* cells at restrictive temperature as well as permissive one (Ratsima et al., 2016). Since Rec8 performs the same function in meiosis as Scc1 in mitosis, it might be a putative substrate of Cdc5 too. Besides, $\Delta rec8$ has the same phenotype as $\Delta mnd2$ (Oelschlaegel et al., 2005) in separating sister chromatids prematurely. *MND2* encodes for a subunit of APC/C, is required for the persistence of cohesin and appeared significantly enriched in reads in our analysis, as well as another gene encoding the subunit Cdc16 (Supp. Table S4) (Oelschlaegel et al., 2005), suggesting that APC/C plays a major role in adaptation to DNA damage potentially through its implication in the regulation of the cohesin complex. More generally, these results suggest that *cdc5-ad*'s adaption deficiency could be due to a defect in sister chromatids' separation.

Besides, the cohesin complex is recruited at the DNA damage site (Piazza et al., 2021; Ünal et al., 2004; Wu and Yu, 2012) thanks to the cohesion loading factor containing a subunit encoded by *SCC4* and to the kinetochore protein encoded by *MIF2*, which are both statistically enriched in transposons and reads respectively in our analysis (Supp. Table S4), supporting the previous considerations. Interestingly, the recruitment of Mif2 and Scc1 to centromeric DNA is inhibited by the phosphorylation of Cse4 by Cdc5 (Mishra et al., 2019, p. 201). When damage is detected, mitotic exit is inhibited by Cdc55 which plays a role in preventing sister chromatid separation (Queralt et al., 2006). Our previous study (Coutelier et al., 2021) showed that *Acdc55* shows a slightly more efficient adaptation than the wild-type, and even though the adaptation defect of *cdc5-ad* seems to be independent of Cdc55, the fact that *SCC1*, *REC8*, and *SCC4* disruption seems to bypass the checkpoint arrest of *cdc5-ad* supports the hypothesis that cohesin regulation is involved in the ability of cells to adapt.

The importance of cohesin in adaptation to DNA damage is reinforced by the significant enrichment in our results of genes encoding the GARP complex (*VPS52*, *VPS53*, *VPS54*). GARP complex mutants have been reported to be deficient in recovery and this deficiency is explained, for the $\Delta vps51$ and $\Delta ypt6$ mutants, by a defect in cohesin dissociation (Ciosk et al., 1998; Eapen and Haber, 2013). The aforementioned enrichment of cohesin subunit genes and the enrichment of the GARP complex suggest that Cdc5-ad may be impaired in its functions with the cohesin in response to DNA damage. This hypothesis is reinforced by the fact that six genes (*SMC1*, *SMC3*, *NSE1*, *CBF2*, *TOP3*) involved in cohesin and its regulation had their essentiality suppressed in *cdc5-ad cdc13-1*, suggesting that the *cdc5-ad* mutation affects a lethal interaction between Cdc5 and the subunits encoded by the cited genes. This hypothesis is reinforced by the physical interaction existing between Cdc5 and Smc1, Smc3 (Mishra et al., 2016a; Pakchuen et al., 2016).

Besides, the cohesin complex recruitment at DSBs requires Mre11 and other checkpoint factors (Kim et al., 2002; Ünal et al., 2004; Wu and Yu, 2012). Our results revealed that depletion of *MRE11* and *XRS2* restored adaptation in the *cdc5-ad cdc13-1* mutant (Fig. 5C), suggesting that their essential role in adaptation to DNA damage might involve the regulation of the recruitment of the cohesin complex in response to DNA damage.

Regarding *XRS2*, our data examplified a good example of the sharpness of the analysis achievable with the screen we have conducted. *XRS2* whole deletion restored adaptation, as showed in the microcolony assay (Fig. 5C). But our screen displayed no enrichment for this gene (Fig. 5A). Thus we checked for the transposon insertion sites profile of *XRS2* (Supp. Fig. S2) and observed that its C-terminal region was densely targeted by transposons compared to the rest of the gene. This high transposon density may cover up the variation on other transposons inserted more in the N-terminal region. To verify this hypothesis, subsequent microcolony assays using N-truncated or C-truncated strains should be performed.

Sml1 as a regulator of adaptation to DNA damage

Mec1 and Rad53 are essential proteins implicated in DNA damage checkpoint, the essentiality of which can be suppressed in a $\Delta sml1$ mutant (Zhao et al., 1998, p. 199). Sml1 inhibits dNTP synthesis by binding to Rnr1, and Mec1 and Rad53 are required to remove this inhibition (Zhao 1998). Sml1 protein level peaks in the G2/M phase and is downregulated in response to DNA damage in a Mec1- and Rad53-dependent manner (Zhao, 2001). Our results revealed significant enrichment in reads for *SML1* between time points 3 hrs and 24 hrs post-DNA damage induction (Supp. Table S4). This suggests that Sml1 is an important factor in adaptation to DNA damage through its Rnr1- and Mec1-dependent regulation.

The screen we conducted has the major advantage of being able to investigate the mechanisms of adaptation to DNA damage in an unbiased manner and it exposed the complexity and diversity of metabolic pathways potentially involved in adaptation to DNA damage. We highlight the importance of cohesin regulation in adaptation to DNA damage, a complex that has interactions with Cdc5 that might be disrupted by the *cdc5-ad* mutation, and whose regulation might depend on the APC/C and MRX complexes in DNA damage conditions. The data from our screen still have much to reveal, providing a solid baseline for future investigations.

Materials and methods

Plasmids and strains

All strains are from the W303 background (*ura3-1 trp1-1 leu2-3,112 his3-11,15 can1-100*). They all contain the *cdc13-1* and *cdc5-ad* or *CDC5* alleles and were grown at the permissive temperature of 23°C in YPD (yeast extract, peptone, dextrose) media and at 32°C to induce telomere dysfunction. Transposition strains were created by transforming strains with plasmid insertion. The plasmid is pBK625, kindly provided by Agnès Michel and Benoît Kornman. In this plasmid, the *LEU2* gene is interrupted with the MiniDs transposon and the Ac transposase is under the *GAL1* promoter. This plasmid does not confer leucine prototrophy to *Δleu2* unless the Ac transposase excises the MiniDs transposon and repairs the *LEU2* gene. OD₆₀₀ were measured using WPA CO8000 Cell Density Meter.

Microcolony assay

Microcolony assays were performed using the *cdc13-1* mutant to assess adaptation, as described in (Toczyski, 2006). Briefly, telomere dysfunction was induced in exponentially growing cells by incubation at 32°C for 3 hrs. 100 μ L of culture at OD_{600 nm} = 0.1 were then plated on a pre-warmed plate. Plates were visualized on a dissection microscope (MSM System 400, Singer Instruments) immediately at 3 hrs and 24 hrs. At each position, the number of cell bodies was counted and microcolonies were defined as comprising \geq 3 cell bodies.

PCR

Transposon insertion sites were amplified and barcoded using the PCR program: 95°C for 1 min, 35 cycles of 95°C for 30 sec – 55°C for 30 sec – 72°C for 3 min, 72°C for 10 min (MiniAmp Thermal Cycle, Thermo Fisher Scientific).

Spotting assays

Overnight cultures grown in YPD at 23°C were spotted in tenfold serial dilutions starting with $OD_{600 \text{ nm}} = 0.5$ (à vérifier) in the first dilution onto the indicated agar plates. Images were taken after 4 days using a regular scanner. Camptothecin was used at a concentration of 70 ng/ml.

Library generation

The *cdc5-ad cdc13-1 ura3-1 leu2-3* strain was transformed with pBK625 plasmid. The resulting strain is phenotypically *leu-* since the *LEU2* gene borne on the plasmid is interrupted by the MiniDs transposon. 6 ml of drop-out-Ura + 2% raffinose + 0.2% glucose were inoculated with the freshly transformed cells, directly scraped off the *ura-* agar plate after comparing the growth capacity of the strains on *leu* - agar plates, at a final OD600 nm of 0.24. The cultures were grown to saturation for 18 to 24 hrs at 23°C and stopped when OD600 nm reached 4-6. Then 30 ml of drop-out-Ura + 2% galactose were inoculated at OD600 nm = 0.2 and incubated at 23°C, to induce transposition. After three days, the total volume of each culture was reseeded in ~1 L – 2 L drop-out-Leu medium at OD600 nm = 0.2 and incubated at 23°C for the enrichment phase, which diluted the remaining leu- cells. This step decreases the background noise by enriching the population of cells able to divide, i.e. having successfully recombined the *LEU2* gene by excision of the transposon. After two days, each culture was separated into 3 equal volumes: one collected immediately, while the two others were incubated at a restrictive temperature of 32°C for 3 hrs and 24 hrs respectively. All the three subcultures harvested by centrifugation (4 min, 3000g), washed with ddH₂O and frozen at -70°C.

Genomic DNA preparation

DNA extraction was performed using the Qiagen kit with the 500G columns, according to Qiagen protocole, with the following modifications: the centrifugation and supernatant removal steps prior to addition of the zymolyase were omitted, the obtained DNA is then isopropanol-precipitated and washed in 70% ethanol, and let to dry overnight.

Library sequencing preparation

We resuspended the DNA in 50 μ L of ultrapure H₂O. DNA concentration was measured by Qubit fluorometer (Invitrogen). A total of 4 μ g was digested for each DNA sample: 2 μ g using of Mbol enzyme and 2 μ g using Hin1II enzyme, both enzymes used up to 30 units per reaction (ThermoFisher Scientific FastDigest), at 37°C overnight. Then the digestion was inactivated by heating at 65°C for 20 min. DNA fragments were circularized using 5 units of DNA ligase (ThermoFisher Scientific Rapid Kit) at 22°C for 6h and isopropanol-precipitated and resuspended in 100 μ L of ultrapure H₂O.

Transposon insertion site amplification

The total volume of 100 μ L (for each experiment and each enzyme tube) was divided into 10 PCR tubes of 10 μ L implemented by a PCR mix of Taq polymerase in Mg₂NH₄SO₄ buffer (ThermoFisher Scientific) and primers P5 and P7, barcoded with Illumina indexes. Then samples were purified on PCR Clean up columns (Macherey-Nagel NucleoSpin Gel and PCR Clean-up) and DNA concentrations were quantified on nanodrop. Sequencing was done at the ICM sequencing platform using the flowcell NextSeq 500 Mid Output Kit V2, 130 million reads.

Bioinformatic analyses

Reads from fastq files obtained after sequencing were aligned on the *Saccharomyces cerevisiae* reference genome S288C using bowtie (Langmead et al., 2009), with -m 1 as a parameter so that reads aligning at multiple sites on the genome are removed. The resulting BAM files were then processed in Matlab using Script 1 (Michel et al., 2017). All the figures, apart from the volcano plot, were created on Matlab, using some of (Michel et al., 2017) published code, as well as our implementations.

Gene annotations were downloaded from the GO consortium (Ashburner et al., 2000)(Gene Ontology Consortium, 2021) (<u>http://current.geneontology.org/annotations/sgd.gaf.gz</u>), and stored in MGSA objects (R package MGSA)(Bauer et al., 2011). For each GO term, the proportion of genes from our list belonging to this GO term was compared to this proportion in the genome by a hypergeometric test and GO terms associated with a P-value lower than 0.05 were selected for further exploration.

Statistical analysis

The volcano plot was computed as follows. For each gene, the number of transposons was normalised by keeping only the ones common to 3 hrs and 24 hrs. The number of reads was normalised to the total number of transposons mapped in the library. For each gene, the fold-change and p-value were calculated using the DeSeq2 function, based on a Wald test (Love et al., 2014). Then the volcano plot was computed on R using the plot function.

Heat maps of the 136 genes statistically (as described above) enriched in reads for transposons in common between time points 3 and 24 hrs, created using MultiExperimentViewer (Saeed, 2003) and Euclidean distance clustering on the number of reads for all transposons sequenced. Genes with a null number of reads or transposons were not shown.

Acknowledgments

We thank Agnès Michel and Benoît Kornmann for providing us with the transposition plasmid and all the protocols needed, Yannick Marie and Emeline Mundwiller for the sequencings at the genomics and sequencing platform of the ICM institute.

Supplemental data



Supplemental Figure 1. Histogram of the number of transposons found in every CDS for (**A**) experiment 1 time 0 hrs, (**B**) experiment 1 time 24 hrs, and (**C**) experiment 2 time 0 hrs. The vertical dash line is the median of the distribution. Genes are categorized as all CDS (dark green) and essential (green). (**D**) Venn diagram of the essential genes, meaning genes having fewer transposons than the threshold that best discriminates essential and non-essential genes according to their distribution curve of the number of transposons inserted per gene. The threshold was specific to each dataset: for Michel and colleagues, the threshold was 4 transposons per gene, 3 for experiment #1 T0, and 5 for experiment #2 T0. Each dataset and the corresponding threshold were then normalized by the total number of transposons inserted, and the deviation of the number of transposons fewer than 5 points away from this deviation were considered essential. These criteria concern 881 genes for Michel and colleagues' dataset, and 1079 and 573 genes for our experiments 1 and 2 respectively. There are 666 genes in common between Michel and colleagues' dataset and at least one of our two experiments.

A C-terminal truncations
GAL10
 Control of the control of the second strength of the se
ULP2
A Construction of the C
SEC12
and the second se
A data
SGV1
A STREET AND A CLASS OF COMPANY
We shall be a set of a set of the set of
MMS21
1
1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1
SEC8
a an ann a sanar an
N. A. A. M. A. M. M. 1997 SPHOP 18 (P. 1997) In Contrast Contra
RET2
C CONTRACTOR OF A CONTRACTOR OF
waka waya a san bir da wa
A 114 MILLION (1997) (1997) (1997)
HRR25
A STATE AND A STAT
and the Physical Street
NIC96
Sector Se
 A state of the first state of the firs
NPA3
 A state of the second se
1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1
, , , , , , , , , , , , , , , , , , ,
APC11
W chan

щ

n bitan Tanan

N-terminal truncations	Mixes truncations
The second se	
A March Mr. March and a second second	 As the definition of the second s
Market Market and Article	ter en state de la sec
RIB2	PAN1
A CONTRACTOR AND A DATA AND A	MAN TO A 201 TO A 201 A STATE AND A COMPANY
ala dan sekara kana dari bertara dari ber	AND F SCHOOL STREAM
Participation of the state o	Martin Contractory States of Contractory States
MOB1	SNU71
	.S. 97
a constant a	A AR WALL A COMMAND
Royan Indiana and Anna	1. 1. 1. 1. 1. 1. 1. 1. 1. 1. 1. 1. 1. 1
A STATE AND A STAT	We are a statistical and the state from the state of the
PRP22	FAB1
aav	WANTER AT A SECONDERVISION AND
Rankton on oto tel da la	CONTRACTOR AND A STREET AND A CONTRACT OF A DATA OF
1924 - 1-25 - 1-1-5 - 1-1-5 - 1-1-5 - 1-1-5 - 1-1-5 - 1-1-5 - 1-1-5 - 1-1-5 - 1-1-5 - 1-1-5 - 1-1-5 - 1-1-5 - 1-5 - 1-1-5 - 1-1-5 - 1-5 -	ARREST AND ARE NOT A RECORDER AND A CONTRACT OF
SRB4	PTA1
	(K) 10 (200), 5 (29)
X (0, 0), 0, 1, 1, 1, 1, 1, 1, 1, 1, 1, 1, 1, 1, 1,	Call Collars Coll Coll
1.10	
1911	
P	
В	



Supplemental Figure 2. (A) Examples of genes annotated as essential and showing partial loss of transposon coverage from the ones selected by (Michel et al., 2017). The color range is proportional to the number of reads sequenced for each transposon, in dark blue the smallest amount of reads and yellow the highest. The first

 $1 \leq i \leq n$

de'

column displays genes for which C-terminal truncations result in viable phenotypes. The second column displays essential genes for which N-terminal truncations result in viable phenotypes. The third column displays essential genes for which various truncations result in viable phenotypes. Line (a) corresponds to the dataset from Michel's team. Lines (b) correspond to our experiments 1 and 2, time point 0. Lines (c) represent our three experiments, time 3 hrs. Line (d) displays the transposons obtained in our three experiments, time 24 hrs. (B) Comparison of lists of genes containing less than the median of transposons. In purple, the genes are present in Michel's dataset, in blue the dataset from our first experiment time point 0 hrs and in red the dataset from our second experiment, time point 0 hrs.

CDC16		SCC1
MRE11	RAD50	XRS2
SAE2		

Supplemental Figure 3. Transposon insertion sites for the displayed genes. The color range is proportional to the number of reads sequenced for each transposon, in dark blue the smallest amount of reads and yellow the highest. Line (a) corresponds to the dataset from Michel's team. Lines (b) correspond to our experiments 1 and 2, time point 0. Lines (c) represent our three experiments, time 3 hrs. Line (d) displays the transposons obtained in our three experiments, time 24 hrs.


Supplemental Figure 4. (**A** & **B**) Volcano plots showing statistically enriched genes in green and statistically depleted genes in red between time points 3 hrs and 24 hrs. The vertical lines represent statistical limits of p-value = 0.05. The horizontal line represents the limit above it genes are enriched by 1.5 in (**A**) reads for all transposons and in (**B**) transposons. (**C** & **D**) Common genes regarding enrichment or depletion in transposons or reads, looking at all transposons or only transposons existing at both times 3 hrs and 24 hrs. All Venn Diagrams were made with BioVenn. (**C**) In red are the genes which read number for transposons existing at both time 3 hrs and time 24 hrs is enriched by 1.5 between time 3 hrs and 24 hrs. In blue the genes which read number for all transposons considered were enriched by 1.5 between time 3 hrs and 24 hrs. (**D**) In red are the genes which read number for transposons existing at both times 3 hrs and 24 hrs. In purple, the genes which read number for transposons existing at both times 3 hrs and 24 hrs. In purple, the genes which read number for transposons existing at both times 3 hrs and 24 hrs. In purple, the genes which read number for transposons existing at both times 3 hrs and 24 hrs. In purple, the genes which read number for transposons existing at both times 3 hrs and time 24 hrs is depleted by 1.5 between time 3 hrs and 24 hrs. In blue the genes which read number for all transposons existing at both times 3 hrs and time 24 hrs is depleted by 1.5 between time 3 hrs and 24 hrs. In blue the genes which read numbers for all transposons considered were depleted by 1.5 between time 3 hrs and 24 hrs. In blue the genes which read numbers for all transposons considered were depleted by 1.5 between time 3 hrs and 24 hrs. In blue the genes which read numbers for all transposons considered were depleted by 1.5 between time 3 hrs and 24 hrs.

Jeanne Le Peillet

	Synthetic lethal	ity			Suppressed			
GenelD	Michel et al.	Exp1 T0h	Exp2 T0h	GenelD	Michel <i>et al.</i>		Exp1 T0h	Exp2 T0h
'AI1'	327	-18	-32	'AAT2'		-17	70	20
'AI2'	730	-18	-32	'ACO1'		-13	51	32
'AI3'	924	-18	-32	'ACP1'		-13	26	20
'AI4'	1259	-18	-32	'ADE4'		-13	226	142
'AI5 ALPHA'	1389	-18	-32	'ADE5%2C7'		-13	145	154
'AI5 BETA'	185	-18	-32	'ADE6'		-17	382	455
'AIF1'	44	-18	-32	'ADE8'		-17	45	38
'ATP6'	177	-18	-32	'ADH1'		_9	88	84
'BI2'	452	-18	-32	'AKR1'		-9	70	131
'BI3'	831	-18	-32	'ALG11'		-9	20	38
'ВIЛ'	1/133	-18	-32	'ARH1'		-9	26	67
יפגרטי	20	10	22			0	20	61
'CBDE'	20	-10	-52	ANO7		17	00	01
	1952	-10	-20			-17	176	165
	1000	-10	-52			-9	170	105
	1//2	-18	-32			-9	20	171
	282	-18	-32			-13	188	1/1
	230	-18	-32	BIGI		-9	/	15
CWC23	8	-12	-20	BRUT		-17	82	96
	44	-18	-32	CAK1		-17	32	20
'HXT17'	121	-18	-32	'CBF2'		-9	32	26
'MRP8'	16	-12	-14	'CDC40'		-13	70	84
'OLI1'	16	-18	-32	'CDC48'		-9	20	15
'PBI2'	28	-18	-26	'CDC55'		-13	13	9
'PDR18'	343	-18	-32	'CDC60'		-9	7	15
'Q0032'	8	-18	-32	'CFT1'		-13	26	15
'Q0092'	12	-18	-32	'CHC1'		-17	7	9
'Q0142'	8	-18	-32	'CYS3'		-13	226	310
'Q0144'	24	-18	-32	'DGK1'		-9	26	26
'Q0182'	44	-18	-32	'DID2'		-17	45	15
'Q0255'	432	-18	-32	'DML1'		-13	26	9
'Q0297'	36	-18	-32	'DOA1'		-13	95	148
'RRP17'	12	-12	-26	'DOA4'		-13	138	96
'SCEI'	399	-18	-32	'DOP1'		-9	51	55
'SNO4'	8	-18	-32	'DPL1'		-13	120	102
'TAF12'	8	-12	-14	'DYS1'		-13	32	26
'TIM11'	16	-18	-9	'ERG2'		-13	13	49
'TPM1'	12	-12	-26	'EXO70'		-13	57	55
'VAR1'	104	-18	-32	'FAD1'		-13	45	73
'VBA3'	8	-18	-9	'FAS1'		-17	20	15
'YAR075W'	16	-18	-32	'FOL1'		-9	338	154
'YBR012C'	141	-18	-32	'FOL3'		-9	132	96
'YBR013C'	177	-18	-32	'GAL4'		_9	320	142
'YCI 046W'	24	-12	-20	'GAL7'		-13	207	264
'YDR413C'	12	-12	-26	'GCD14'		-13	7	90
'YGI 132W'	16	-12	-20	'GPP1'		-17	126	73
'VII 102C'	36	-12	-9	'HEM2'		-9	13	55
'VI R464W'	24	-18	-32	'HEMA'		-17	38	20
	24	10	52			1,	70	20
	12	-12	-5			12	200	142
	12	-12	-20			17	230	22
	10	-12	-20			12	13	32
	12	-18	-9			-13	13	26
	181	-18	-32			-9	/	9
	88	-18	-32			-13	45	/8
YOLU99C	28	-12	-14	KAET		-17	38	26
YUKUU8W-B	64	-12	-9	KRE5		-9	26	/8
YOR152C	20	-12	-14	KRS1		-13	26	20
'YRF1-4'	24	-18	-32	'LEU2'		-17	4418	2884
				'LYS9'		-17	295	322
				'MAK5'		-9	20	15
				'MET17'		-17	151	73
				'MOT1'		-13	76	96

'MRPL49'	-9	38	26
'MVB12'	-9	26	20
'NAN1'	-13	20	9
'NIP1'	-13	13	15
'NSE1'	-13	95	15
'OCH1'	-9	120	113
'OPI8'	-17	45	15
'ORC1'	-9	13	15
'PCC1'	-9	7	15
'PDC2'	-17	13	38
'PER1'	-9	26	20
'PET9'	-13	151	177
'PFS2'	-9	13	26
'PGM2'	-17	245	194
'PPT2'	-9	76	26
'PRI2'	-9	20	15
'PSD1'	-17	26	61
'PSD2'	-13	419	299
'PTR3'	-17	176	716
'QNS1'	-13	51	44
'RAD6'	-17	26	20
'RAP1'	-9	38	9
'RIB7'	-13	82	165
'RSC4'	-9	88	32
'RTP1'	-9	76	49
'SAM50'	-17	26	55
'SEC7'	-9	45	9
'SHQ1'	-13	63	73
'SMC1'	-13	7	9
'SMC2'	-17	13	9
'SMC3'	-9	20	26
'SMP3'	-17	13	9
'SNF1'	-9	51	9
'SRB5'	-13	20	15
'SSY1'	-17	51	247
'SSY5'	-13	126	148
'SWC7'	-9	20	9
'TAD2'	-9	101	73
'TAD3'	-17	20	15
'THI80'	-9	13	20
'TOP3'	-9	232	44
'TRM5'	-17	120	102
'TRS120'	-9	70	20
'TUP1'	-9	13	67
'TYR1'	-13	182	160
'USB1'	-9	20	78
'VMA1'	-9	120	67
'VMΔ4'	-13	26	32
'VMA7'	_9	13	9
'VP\$20'	-17	51	20
'VPS24'	-17	26	9
'VP\$25'	-17	82	61
'\/P\$33'	_9	45	38
'\/PSA'	-17	76	26
'YBI 100C'	-17	20	15
'YBR200\\/_4'	-13	20	9
'YBR285\\\/'	-9	26	9
	-9	12	9
'VER172C_A'	-9	15	20
	-9	22	38
VGI 219\//	-13	52	44
10L210VV	-17	13	9
	-9	13	9
11VIN294VV-A	-13	13	9

'YNR003W-A' 'YPR123C' Article 2

-9

-9

26

26

26 38

Supplementary table 1. Lists of synthetic genes that are lethal with the *cdc5-ad cdc13-1* strain and genes whose mutation is usually deleterious but not in the *cdc5-ad cdc13-1* genetic background. Reference data are taken from the dataset of Michel *et al.* 2017, who performed genetic screens on W303 *CDC5* WT *CDC13* WT strains. The number of transposons per gene is normalized by the total number of transposons obtained in the dataset. The threshold for determining whether a gene is considered essential in our experiments is a strict 4 transposons per gene for the Michel and colleagues dataset, and 3 and 5 transposons per gene for our experiments 2 and 3 respectively, all normalised by the total number of transposon in the dataset. Only experiments 2 and 3 were considered here, since experiment 1 does not contain a time 0, *i.e.* without damage induction. In this table, we look at the logarithm of the deviation from this threshold, excluding a grey area of +/- 5.

	Enriched genes			Depleted genes	
GenelD	log2FoldChange	pvalue	GenelD	log2FoldChange	pvalue
SIP18	5.97943261	6.70E-05	YBR209W	-1.79311083	0.03320147
YOL099C	5.35088432	0.01290966	YBL059W	-1.7933451	0.04893553
CAB2	5.28273439	0.03281763	YGL117W	-1.81769318	0.03894303
YDR521W	5.20642888	0.01030397	IRC22	-1.83640375	0.04394
RPS8A	4.99607683	0.03078173	YKR051W	-1.84214913	0.02908436
TIM10	4.93668248	0.00060322	MIC19	-1.8486806	0.04926632
YFR054C	4.70055059	0.00057269	PKP1	-1.90675793	0.04466883
ELF1	4.68186244	0.03069929	YOR186C-A	-1.9532699	0.01731949
HNT2	4.60928433	0.00363835	YLR400W	-1.9707804	0.02347366
RPS16B	4.58779996	0.03598155	FMS1	-1.97933237	0.0359797
BCY1	4.48928774	0.00032047	YJR005C-A	-1.98239355	0.03913468
YKL096C-B	4.47865997	0.03762334	AKR2	-1.98272154	0.04278467
OCA2	4.44400879	0.00093854	YJR112W-A	-2.0261888	0.03720715
PRE3	4.37758662	0.00124142	YOR379C	-2.04273709	0.02632555
YDL158C	4.3698828	0.04217519	PMC1	-2.04562204	0.03474134
ERG11	4.29165234	0.0260287	EMP65	-2.08050251	0.0486296
SLM4	4.25394668	0.00196367	ABP1	-2.08190341	0.0241344
REG1	4.18806842	0.0076756	TRP2	-2.11212853	0.04504518
SRL3	4.17414732	0.00415571	DGR2	-2.11697778	0.04444508
BIG1	4.17134146	0.02217031	PGS1	-2.14015014	0.03359062
UBA4	4.09865737	0.00623517	MGS1	-2.15472753	0.03762769
INM2	4.04163453	0.00109661	PSH1	-2.16518024	0.04689648
YGL007C-A	4.02786465	4.52E-05	YER076W-A	-2.17777918	0.04685291
DHR2	3.99684452	0.01113547	COX23	-2.18387003	0.02141562
RCF1	3.88898638	0.00755187	YNR066C	-2.18425908	0.03908213
YGL101W	3.85562099	0.01402543	MIX17	-2.19877652	0.0366803
YDL121C	3.85109869	0.00615226	YNL277W-A	-2.21221242	0.02819902
SPL2	3.84004028	0.00687943	YER079C-A	-2.21300398	0.03099628
MRP21	3.76517734	0.00541772	ECM19	-2.21844882	0.04457897
YLR149C-A	3.71681722	0.01379645	INP2	-2.23068129	0.027584
DOA1	3.64498297	0.0003745	CHA4	-2.23227863	0.02421841
TPO2	3.4500386	0.00708294	SMF3	-2.24651106	0.02167899
NPL4	3.42785626	0.00537396	COX13	-2.24876592	0.02965261
PIG1	3.41841282	0.00191523	SPI1	-2.25497674	0.04321731
COX26	3.37783145	0.00792042	ATG22	-2.25581046	0.04098131
DSS4	3.37224688	0.00805944	YKL162C	-2.2677566	0.03412237
HIS6	3.37204749	0.00355087	SBA1	-2.26886351	0.04557534
YGL088W	3.29713573	0.01222127	YFH7	-2.27924202	0.01078069

YOL013W-B	3.27555277	0.00081322	PHO89	-2.28658459	0.01370486
YOL150C	3.25232364	0.00789131	GIM5	-2.29134768	0.04895947
AST1	3.22097705	0.01593688	CCW14	-2.29652028	0.04836172
CBP2	3.21646989	0.00990976	BIO2	-2.30127687	0.02028239
TGL2	3.18730694	0.02220109	YGR117C	-2.32796587	0.02811625
SKM1	3,17880425	0.0155699	YMR310C	-2.33773946	0.03134965
DTD2	3 130/0078	0.00605013		-2 33788503	0.02251605
	2 11 200400	0.00093913		-2.33788303	0.02251005
TILU/IVV-A	3.11500409	0.01447217	IJRUIOW	-2.55902524	0.02750407
RAD6	3.10591667	0.02459848	REIVII	-2.34168483	0.02612221
SPP381	3.09743099	0.03813454	RPA34	-2.34648914	0.03416837
SPO23	3.08702214	0.00558006	YML119W	-2.37367799	0.01886147
OSH3	3.04076229	0.01021245	NMA2	-2.37458493	0.02763963
VHS2	3.02559685	0.0029256	YDR230W	-2.4004316	0.0217515
YNR005C	3.02103272	0.02976558	ZRG8	-2.42358352	0.02508482
YMR158W-B	3.0026538	0.02194609	SCP1	-2.42734792	0.0154936
MCD1	2.99721105	0.01914341	RPN14	-2.42900613	0.02590974
YGR068W-A	2,99499427	0.00897968	TBS1	-2.46176041	0.03586491
POA1	2 98334834	0.00092951	BUR6	-2 46309832	0.0129251
VGL082W/	2 95097832	0.002/1506	7051	-2 /17718529	0.03186903
	2.0007002	0.00241900		2.47710323	0.03100503
	2.95104789	0.01454954	1DR259C	-2.4021000	0.05752974
YIVIK316C-B	2.92353699	0.01547697	0004	-2.513/9461	0.03824141
SIM1	2.89965018	0.00221107	POF1	-2.52884762	0.00868246
ATG16	2.89910475	0.02263551	IRC7	-2.52977559	0.01779446
TMN2	2.89849277	0.01622524	YER148W-A	-2.54300364	0.04104335
HPA2	2.88837312	0.01901635	IMA2	-2.55332293	0.04842968
LEU5	2.86485252	0.0216127	THP2	-2.56727173	0.02468115
STL1	2.85567817	0.01822396	YDL187C	-2.58529237	0.00942725
DPB3	2.84763302	0.04327604	BUD21	-2.66645941	0.0422384
MHR1	2.8335636	0.00415359	PBP2	-2.69758484	0.02361515
EGD2	2.82451426	0.04509741	DSS1	-2.70445916	0.04066732
SCO1	2.81676613	0.01255765	ICT1	-2.70720564	0.01676134
NTA1	2.80291366	0.03865143	PEA2	-2.73094813	0.02668725
SCW4	2.78889631	0.02058254	PEX27	-2.73671777	0.04721159
MRPS12	2.78528205	0.00698345	YML094C-A	-2.74711983	0.01926458
YIL054W	2.77802898	0.01637383	CDA1	-2.75564335	0.03419314
RPS24B	2.75617286	0.03442923	YMR122C	-2.7647481	0.00397978
AAC3	2,74577826	0.03050924	FYV10	-2.77038871	0.04982334
YRA2	2,70952624	0.03977181	YBR296C-A	-2.78905773	0.00607287
FRV25	2 69839502	0.01701829	FGT2	-2 79333467	0.03381657
TR\$85	2.69035302	0.011/04/1	11.1/6	-2 79937394	0.00060846
AOV1	2.00270331	0.02707832	RAM1	-2 81725466	0.0156707
	2.07703780	0.02797832		2.81723400	0.01970549
	2.00729237	0.0308482		2.02021324	0.01870348
	2.03423072	0.01096676		-2.8211811	0.04700823
	2.59942714	0.00580736	UBP9	-2.86282023	0.01474807
YKLU31W	2.59012158	0.04289591	YDL186W	-2.8/25299/	0.01825759
	2.58561512	0.02826506	SEEL	-2.890/501	0.04478451
CDC16	2.5/300/69	0.01/83/85	YDR433W	-2.89789864	0.02/309/1
REC8	2.57090492	0.02432947	TAX4	-2.92907926	0.00348158
SML1	2.56025015	0.04761454	BMT5	-2.96722656	0.00422779
MSM1	2.52690692	0.03418292	NCE103	-2.97062546	0.0396769
GEP7	2.52560262	0.0136314	DIT2	-2.99279095	0.00260972
CNN1	2.51486604	0.03564217	TIM54	-2.99483474	0.02303175
AVT2	2.51320216	0.01474902	KTI11	-3.01146762	0.01828893
HHT2	2.50738213	0.04936133	PRR1	-3.0207419	0.01017418
DJP1	2.48390429	0.0317364	PSY2	-3.03450332	0.01983477
YML6	2.45573334	0.03681561	RPL36A	-3.03895275	0.03402857
YGR069W	2.44311891	0.03101811	MIT1	-3.06183243	0.0180278
YBR238C	2.44157105	0.00467841	MRPL50	-3.06224505	0.00525823
MND2	2.43166975	0.01292517	MRPS28	-3.0843546	0.02722901
LAS21	2.41687454	0.04946906	TYR1	-3.0922704	0.01178904
MTC3	2.41402433	0.02929871	BRR1	-3.11557895	0.03426113
ASH1	2.40224468	0.04561385	HPC2	-3,1995792	0.00662531
NOP8	2.40172057	0.01993205	YDL085C-A	-3.21854129	0.01653373

YMC2	2.38699384	0.00815906	ABF2	-3.23093297	0.0077075
YMR304C-A	2.38176265	0.02665525	РКНЗ	-3.23829896	0.0045813
YJL047C-A	2.3803147	0.0282137	FLO8	-3.25310409	0.0141704
KAP120	2.3753685	0.03320186	CKI1	-3.26467303	0.0047650
YJL175W	2.37207374	0.02903926	FIP1	-3.27188854	0.038055
YNL205C	2.35295535	0.01978655	SEC72	-3.28236094	0.0417586
FUS1	2.35029255	0.0345944	UBC11	-3.31719208	0.0243822
LYP1	2.30317481	0.03673629	KRR1	-3.33784091	0.0249481
ECM8	2.29327555	0.01912318	TDA2	-3.35031473	0.0155956
IDP3	2.2669001	0.02201353	VBA2	-3.41847985	0.004622
YGR107W	2.24589283	0.04608821	HIS1	-3.42257964	0.0019056
YJR020W	2.23342382	0.03873409	TAF14	-3.42282526	0.022304
FPR1	2.22915061	0.01574927	RPS27A	-3.42628072	0.0167419
ҮРКЗ	2.22396596	0.03367341	YPR170W-B	-3.62077647	0.0090159
CTL1	2.21014548	0.04842868	PMU1	-3.66223137	0.0020480
YOL075C	2.20347624	0.01768707	HOS2	-3.68444121	0.0043707
YOR365C	2.19287409	0.02902157	GID8	-3.7597987	0.0114989
YIL086C	2.18553465	0.01549	SLG1	-3.77170433	0.008855
EAF3	2.17333513	0.03749017	CPT1	-3.88134206	0.0020000
MTL1	2.17118482	0.0285326	YHB1	-3.88276769	0.000865
FMP45	2.15415506	0.03898354	NRD1	-3.92632041	0.0091276
UBP7	2.13935968	0.01867328	YBR232C	-4.13670157	0.0007270
KAP122	2.10633904	0.03275116	RRT15	-4.23365052	0.000337
NYV1	2.10559682	0.02031381	IKI3	-4.26216176	0.00674
PFK1	2.08545527	0.04011241	PDX1	-4.28995109	0.0002088
YMR206W	2.07963089	0.03225108	YPR170W-A	-4.35302216	0.0013034
IMP2%27	2.06305398	0.01022463	DIA2	-4.59394666	0.0006530
YJL016W	2.04474419	0.02478078	MRP8	-5.25410395	0.0228727
YPR196W	1.92480708	0.04513514	DPB2	-5.29201311	0.0387474
YBR071W	1.91612267	0.0253191	CDC55	-5.59386037	0.0212105
SEF1	1.89587678	0.04518952			
FBP1	1.7972956	0.04403334			
POP3	1.71582195	0.04843533			
YHL042W	1.57901184	0.04951342			
YDL196W	1.52233337	0.04955905			

Supplementary table 2. Lists or enriched and depleted genes. The fold-change and p-value were calculated using the DeSeq2 function, based on a Wald test (Love et al., 2014). This table only shows the statistically significant results.

go. typ e	go.id	go.name	P-value	nbMy Genes.g o	nbAll Genes.g o	ratio.go Sur Proteome	Enriched Genes.inG o	All Genes in GO
С	GO:000079 8	nuclear cohesin complex	0.003992125962834 82	2	5	19.546666 7	MCD1 REC8	MCD1, SMC1, IRR1, SMC3, REC8
Р	GO:007190 1	negative regulation of protein serine/threonine kinase activity	0.013619567049697	2	9	10.859259 3	SPL2 BCY1	GPB2, YDL073W, PHO81, SPL2, BCY1, FAR1, SIC1, GPB1, YPL014W
С	GO:000016 4	protein phosphatase type 1 complex	0.016798147416198 2	2	10	9.7733333 3	REG1 PIG1	GIP1, REG2, REG1, FIN1, GIP2,

								GLC7,
								PIG2,
								SDS22,
								PIG1,
								GAC1
								PET9,
								AAC3,
								GGC1,
		nurine-containing						FCY2,
	60.007253	compound	0 020258592684723			8 8848484	AAC3	FCY21,
Р	0	transmembrane	6	2	11	8	I FU5	FCY22,
	Ũ	transport	0			0	2205	LEU5,
		transport						AAC1,
								ODC2,
								ODC1,
								YPR011C
								VID24,
								APE3,
								REG1,
								PRB1,
	CO.000702	protein catabolic	0 000000010000000			0 1 4 4 4 4 4 4		MIL1,
Р	GO:000703	process in the	0.023988212886602	2	12	8.1444444	REGI	YGRUBBC,
	9	vacuole	4			4	IVITLI	
								νισ22, ΡΔΙ3
								VSP3
								YOR062C
								PFT9
								AAC3.
								YBR219C.
								YBR220C,
		purine nucleotide						GGC1,
_	GO:001521	' transmembrane	0.023988212886602			8.1444444	AAC3	LEU5,
F	6	transporter	4	2	12	4	LEU5	AAC1,
		activity						SAL1,
								ODC2,
								ODC1,
								YPR011C,
								ANT1
								SSA1,
								UBC4,
								NPL4,
		mitochondria-						CDC48,
	60.007267	associated	0 00707474070707070			7 54 70 40 7		VMS1,
Р	GO:007267	ubiquitin-	0.02/9/4/12/0/2/2	2	13	7.5179487	NPL4	RSP5,
	1	aepenaent	8			2	DUA1	
		process						DOA1
								LIBX2
								SIS1, BRO1
								HHT1
								SCO2
								SCO1.
								TMN2,
	0.005507		0 000700175444456			C (C22222)	SCO1	CCC2,
Р	GU:005507	copper ion	0.009709175111156	3	22	6,0636363	TMN2	SLF1,
	U	nomeostasis	10			Ø	HHT2	VMA3,
								PIC2,
								TMN3,
								CUP2,
								CTR2,

								ICS3, GEF1, SOD1, EMP70, CTR3, MAC1, COA6, HHT2, SMF1, HAA1, CTR1
F	GO:014010 4	molecular carrier activity	0.012387204423558 5	3	24	6.1083333 3	SCO1 KAP122 KAP120	KAP104, SCO2, SCO1, YFH1, MSN5, SXM1, RTT105, KAP123, OXA1, KAP122, COX18, CRM1, NMD5, ACP1, COX17, KAP95, CCS1, PSE1, ATX1, SRP1, OP110, KAP120
С	GO:000575 1	mitochondrial respiratory chain complex IV	0.046256826130258 2	2	17	5.7490196 1	COX26 MTC3	COX9, COX26, MTC3, COX13, COX4, COX6, COX5B, COX12, COX8, COX7, COX5A, AI3, AI4, AI5_ALPH A, COX1, COX2, COX3
С	GO:000568 0	anaphase- promoting complex	0.046256826130258 2	2	17	5.7490196 1	MND2 CDC16	CDC27, APC11, APC4, YDR161W, SWM1, CDC26, DOC1, CDC20, CDH1, AMA1, CDC23, MND2,

								CDC16,
								APC9,
								APC2,
								APC1,
								APC5
								AST1,
								RFS1,
								SLM4,
								AIM3,
								VMA2,
								FTH1,
								YCP4,
								RVS161,
								YCR075W-
								A. FMP45.
								TMS1.
								YCF1. IVY1.
								DPP1.
								VMA8.
								VAC8.
	GO:004512		0.029235824182258			4.4424242	AST1	EET5.
С	1	membrane raft	1	3	33	4	SLM4	XRN1.
	_		_			-	FMP45	PMA1.
								GTR2.
								TRK1.
								LTV1,
								MEH1,
								YBT1,
								NHA1.
								GTR1.
								SUR7.
								ZRC1.
								GAS1.
								YNL194C.
								VPH1.
								COT1.
								VMA4
								COR1.
								COX9.
								COX26.
								SDH4.
								QCR7.
								RIP1.
								QCR6.
								MTC3,
								COX13,
								COX4,
								QCR9,
								QCR10,
	GO:000574	mitochondrial	0.036611560313678	-		4.0722222	COX26	COX6,
C	6	respirasome	9	3	36	2	MTC3	COX5B.
	-		-			_	RCF1	QCR8.
								YJL045W.
								SDH1.
								SDH3.
								SDH2
								COX12
								SHH4
								COX8
								RCF1
								SHH3
								COX7
								COX5A.

								RCF2,
								CYT1,
								QCR2, AI3,
								Al4,
								AI5_ALPH
								A, COX1,
								COB,
								COX2,
	-							
								GPBZ,
								VBR296C-
								A LRF1
								SYP1
								YIH1
								CDC13.
								INH1,
								STF1,
								HED1,
								MRPL35,
								YRA1,
								MUS81,
								MMS21,
								KRE29,
								PAB1,
								DMC1,
								ISC10,
								YPI1, IGD1,
								SDS23,
								DVR1
								FCM29
								IG02.
							SPL2 BCY1	SPL2.
_	GO:000485	enzyme inhibitor	0.009060663272105	_		3.8783068	MND2	YHR138C,
F	7	activity	13	5	63	8	SML1	BCY1,
							NOP8	MND2,
								FAR1,
								NET1,
								SDS22,
								SIS2,
								RFU1,
								SIC1, IFS1,
								YLKI79C,
								HUG1
								SMI1
								GAI 80.
								NSE5.
								PAI3,
								ROY1,
								ZDS1,
								GLC8,
								MCK1,
								IST1, IGO1,
								PBI2,
								NOP8,
								STI1,
								CKB2,
								VH53,
								DUSZ,
1	1	1	1	1	1			GPB1,

								ACM1,
								CAR1,
								ERI1,
								OAZ1,
								YPL014W
								GPB2,
								MCM2,
								CDC28,
								NPL4,
								SDS24,
								YBR296C-
								A, LRE1,
								HSP30,
								SYP1,
								INП1, сте1
								CDC/18
								YDI 073W
								RAD61.
								HED1.
								REG1,
								GRX3,
								BMH2,
								GIR2,
								GCN2,
								MRPL35,
								YRA1,
								MUS81,
								MMS21,
								PAB1,
		in a mattice					NPL4	GRX4,
	60.004409	negative	0 002105952594022			2 9424456	REGI SPLZ	
Р	00.004409	molecular	0.002193832384023 //2	7	89	3.8434430 Q		DKD2
	2	function	45			5	SML1	50523
		lanction					REC8	RPT6.
								CKB1,
								KSS1,
								UFD1,
								PIL1, ESP1,
								PHO81,
								PXR1,
								PCL5,
								IGO2,
								SPLZ,
								SIN1
								BCV1
								MND2
								FAR1.
								IME2.
								NET1,
								TOR1,
								SBA1,
								UFD4,
								SIS2, LOT6,
								RFU1,
								SIC1, TFS1,
								YLR179C,
								DIF1, PIF1,
								HUG1,
1				1	1	1	1	SML1.

								GAL80, CDC5, PAI3, ROY1, ZDS1, GLC8, MCK1, RAD50, URE2, IGO1, PBI2, FPK1, NBA1, LAG2, CKB2, VHS3, DCS2, GPB1, ACM1, ERI1, OAZ1, PHO85, YPL014W, LSP1, REC8, NHP6A
Ρ	GO:000627 5	regulation of DNA replication	0.024101809341294 5	4	54	3.6197530 9	MHR1 CDC16 SML1 EAF3	CCR4, NTG1, DEP1, POL30, MEC1, CDC28, CHK1, RIF1, MRC1, RIM1, MSH3, DUN1, BRE1, SIR2, DBF4, DOA4, MSH6, FOB1, RAD9, MHR1, RSC3, SUM1, SAK1, DD11, CHD1, CHD1, CHD1, CHD1, CHD1, CHD1, CHD1, CHD1, CHD1, SAK1, DD11, CHD1, CHD1, SAK1, DD11, CHD1, CHD1, SAK1

_									
									SML1,
									CSM3.
									RCO1
									TOFA IDIA
									TOF1, IPI3,
									TOP2,
									FKH2,
									MSH2,
									SIN3,
									SLD7.
									DIA2
									RFM1
									стіб
									EAF3, CLB5
									SWH1,
									ATG8,
									SHP1,
									SLM4,
									CMD1,
									ATG14,
									ATG12
									ATG15
									ATG15,
									ATG9,
									CDC48,
									VAM6,
									OSH2,
									ATG31,
									VPS41,
									YDR089W,
									TRS85,
									VAC8,
									VTC1.
									VTC2
									ATG18
									X1010,
									VAIVI7,
									CDC55,
								SLM4	AIG1,
		GO:001623	lysosomal	0.027136038774241			3,4904761	TRS85	GTR2,
	Р	7	microautonhagy	1	4	56	9	ОСНЗ	HSV2,
		,	merodutophagy	1			5	ATG16	HSE1,
								AIGIO	OSH7,
									OSH3,
									ATG7,
									NVJ1.
									SNX4
									V1C4,
									USH6,
									MEH1,
									ATG10,
									STT4,
									VPS33,
									ATG17.
									YPT7.
1									ATG16
1									
1									
1									AIG2,
1									ATG4,
1									VPS27,
1									ATG3,
1									VAM3,
1									HES1.
1									ATG29
1									рерл
1			1	1	1	1	1	1	Г ГL Г 4,

								ATG5,
								KES1,
								VPS30,
								ATG21,
								VIC3,
								ATG11,
								DCK1
								MNN2.
								TPS1,
								ROT2,
								LRG1,
								KNH1,
								TPS2,
								INM2,
								HKR1,
								GLC3,
								GIP2,
								PCLO, GDD2
								GFF2, SΔK1
								GSY1.
								IGD1.
								KEG1,
								PCL10,
								CWH41,
								GSC2,
								SKN1,
								TRS65,
								INM1,
								BIGI,
		cellular						PCL7
								PIG2
_	GO:003463	carbohvdrate	0.030389164750838			3.3701149	INM2 BIG1	MNN5.
Р	7	biosynthetic	6	4	58	4	PIG1 FBP1	KRE9,
		process						INO1,
								GLG2,
								KAR2,
								PGM1,
								UGP1,
								GLG1,
								FKS1
								GAS2.
								FBP1,
								TSL1,
								PGM2,
								GAS3,
								TPS3,
								FKS3,
								GAS1,
								GLC8,
								0A34, DSK2
								GASS
								GAC1.
								KRE5.
								PCL8,
								ÝIG1,
								PHO85,
								KRE6,

Г									-
									RHO1,
									GDB1
I									FLR1,
									FAT1,
									ODR3.
									AGP2
									DTR1
									SIII 1
									JOLI,
									PCAL,
									GEXI,
									VBA3,
									FUS1,
									CWH43,
									HKR1,
									SIT1, STE2,
									ZRT1,
									YGL114W,
									PMC1,
									MSB2,
									MTL1,
									TPO2,
									AZR1,
									ARN2,
									ARN1.
									YHL008C.
									YHK8
									SIN1
									ΔΧΙ 2
									QDR2,
									QDRI,
			intrinsic					FUS1	OPT1,
	-	GO:003122	component of	0.047780302444860			2.9174129	MTL1	TRK1,
	С	6	plasma	3	4	67	4	TPO2	ток1,
		Ū	membrane	C C				LAS21	LAS21,
			memorane					0.021	GEF1,
									KCH1,
									STE3,
									DCW1,
									GAP1,
									TRK2,
									VBA5,
									GEX2,
									TPO1,
									SUL2,
									YPS1.
									YPS3.
									YI R194C
									MID2
I									VIDZZ,
I									
I									PHU84,
I									PRM6,
I									UBX2,
I									HOF1,
I									DFG5,
I									FET4,
I									AQR1,
I									HOL1,
									FNB1
									YVC1
									YVC1, TPO4
									YVC1, TPO4, FFX1
									YVC1, TPO4, FEX1,

								YPR003C,
								OPY2,
								TPO3,
								OPT2,
								SGE1
							INM2	
	GO:001631	dephosphorylatio	0.038227404494862	-	01	2.6849816	PTP3	
Р	1	n	8	5	91	8	OSH3 CTL1	
							OCA2	
							POA1	
			0.017568713382298 4	7	131		INM2	
-	GO:004257 8	phosphoric ester hydrolase activity				2.6111959	PTP3	
F						3	YGL101W	
							FBP1 CTL1	
							OCA2	
							MRP21	
	60.004500		0 0 4 0 4 4 0 7 0 2 7 0 2 2 5 5			2 5400000	RPS8A	
С	GO:001593 5	small ribosomal subunit	0.048148793783255	5	97	4	RPS16B	
							RPS24B	
							MRPS12	
							SEF1	
		anatamical					SPO23	
		anatomical					FUS1	
	GO:004864	formation	0.025902877049822	0	174	2 2467422	FMP45	
Р	6	involved in	9	õ	174	2.2407433	TRS85	
		involved in					RAD6	
		morphogenesis					HHT2	
							AQY1	ĺ

Supplementary table 3. List of GO terms enriched in our screen. GO analysis was performed on the list of the 136 enriched genes, among which 116 were annotated. The p-value was settled at 0.05 and all the GO terms were listed, regardless of the number of genes it contains.

List 1: genes enriched in reads x1,5 between 3h and 24h for common transposons between 3h and 24h (same as Table 2)	List 2: genes enriched in reads x1,5 between 3h and 24h for all transposons	List 3: genes enriched in transposons x1,5	Common genes between lists 1 and 2 (same as Table 2)	Common genes between lists 1 and 3	Common genes between lists 2 and 3	Common genes between lists 1, 2 and 3
YDL196W	YAL069W	TPD3	DPB3	AAD4	CAB2	none
YHL042W	ADE1	MIX23	EAF3	ACO1	DOA1	
LAS21	MIX23	YBL100W-C	STL1	APM1	HPA2	
HHT2	ILS1	SCS22		BPL1	MHR1	
POP3	MOH1	MOH1		CBT1		
CTL1	ECM15	ALG14		CIA1		
SML1	PRP6	YBR131C-A		ERG1		
YGR107W	ARA1	RIB7		ERG10		
ASH1	ICS2	YCR047W-A		GPP1		
SEF1	YBR184W	AAD4		GTT1		
YPR196W	AIM4	FAP7		IZH4		
EGD2	DPB3	NOP14		LYS9		
FBP1	PCA1	BPL1		MIX23		
DPB3	VMA9	POL3		MOH1		
YKL031W	BPH1	RPL13A		MOT1		
YDL158C	CPR4	VPS54		MPS2		
PFK1	AAD4	RPS13		NOP14		

YRA2	CDC36	RLI1	NOP56
FMP45	NOP14	RGP1	PRP19
YJR020W	BPL1	CIA1	RPO31
NTA1	YDL114W	YDR282C	SAD1
SPP381	SNU23	YDR286C	SDO1
YKL096C-B	FAD1	MHR1	SGD1
EAF3	PRP11	ARH1	TAH18
ERV29	YDR118W-A	SPT3	TOF1
YML6	HOM2	YDR396W	TRL1
LYP1	CIA1	NCB2	UME1
RPS16B	YDR396W	VPS52	VPH2
CNN1	YDR417C	GLY1	VPS30
FUS1	RPL12B	YER023C-A	VPS38
RPS24B	YDR444W	YER079C-A	VPS75
MSM1	IZH1	KAP123	YDR396W
YPK3	STL1	SCC4	YMR317W
KAP120	RMD6	BRR2	YNL181W
CAB2	PHM8	SAD1	YVH1
KAP122	ARG5%2C6	DOC1	
YMR206W	UBP9	CHC1	
DJP1	SWI4	ATG1	
YGR069W	YER186C	MPS2	
RPS8A	GNA1	COG7	
ELF1	SAD1	NSR1	
AAC3	YFR036W-A	ERG1	
YNR005C	RSC8	ECM34	
MTC3	YFR056C	RPS4B	
YJL175W	ZRT1	CAB2	
YOR365C	RTF1	GPP1	
MTL1	FRA2	YIL021C-A	
MOG1	YGL102C	INA22	
YJL047C-A	MPS2	YVH1	
AQY1	AFT1	GTT1	
YMR304C-A	JAC1	BUD19	
ERG11	SPR3	TRL1	
YBR071W	SPT4	PRY1	
YJL016W	UPF3	TTI2	
RAD6	RPL11B	SOR1	
REC8	ERG1	COS9	
ATG16	CWC22	DOA1	
TGL2	RPL8A	CBT1	
BIG1	YSC84	TOR2	
IDP3	YHR022C-A	YKL156C-A	
YMR158W-B	DOG2	VPH2	
LEU5	YHR069C-A	VMA5	
SCW4	SAM35	TFA2	
NYV1	COX23	YLL056C	
NOP8	NBL1	PRP19	

Page | 196

YNL205C	YHR202W	SDO1
MCD1	YIL165C	MIM2
ECM8	YIL163C	YLR146W-A
HPA2	SDS3	NOP56
UBP7	GPP1	LIP2
STL1	GVP36	VPS34
CDC16	IST3	ACO1
YOL075C	YVH1	BUD6
ERV25	LYS1	MID2
YIL054W	GTT1	SGD1
TMN2	YPS6	ATG33
AST1	IMA5	VPS38
FPR1	PRP21	ATG17
SKM1	ASF1	RPS1A
YII 086C	UTP10	SIR3
YMR316C-B	TRI 1	SEC65
	VPS53	TAF13
СЕН1		0.068
VII 071\W/_A		DD71
	OBA1	
YLR149C-A	CBT1	
	PXAZ	
YOLU99C	VPH2	TOF1
SCO1	MIF2	VPS75
YGL088W	YKL071W	NAR1
TRS85	YKL018C-A	YNL203C
DHR2	OPI8	IPI3
TWF1	DID2	YNL181W
YDR521W	MMP1	RIA1
IMP2%27	YLL053C	TOP2
OSH3	COF1	END3
CBP2	PRP19	COG5
YGR068W-A	YLL020C	COG6
YMC2	SDO1	YNL019C
DSS4	YLR031W	LYS9
COX26	FRS1	IZH4
YOL150C	EMP70	MPD2
REG1	PDC5	RPO31
RCF1	HCR1	SER1
TPO2	NOP56	HRK1
MRPS12	ACO1	RDL1
РТРЗ	SGD1	YOR366W
SPL2	KAP95	PHR1
UBA4	VPS38	PBI1
YDL121C	VPS33	KAR9
PIH1	URA4	APM1
SPO23	YLR455W	RRD2

MRP21	YML116W-A	UME1
NPL4	MED11	VPS30
YBR238C	TIF34	MOT1
SRL3	TRI1	GPI2
MHR1	YMR317W	ERG10
HNT2	MRPL10	TAH18
HIS6	TOF1	NHP6A
VHS2	VPS75	RHO1
YGL082W	SSB2	HPA2
SIM1	YNL198C	
SLM4	YNL181W	
PIG1	YNL109W	
PRE3	LYS9	
INM2	BSC5	
OCA2	COS10	
POA1	YOL159C	
YOL013W-B	HPF1	
TIM10	RRP40	
YFR054C	IZH4	
DOA1	RFC4	
BCY1	LDS2	
SIP18	SIL1	
YGL007C-A	RPO31	
	SLP1	
	PTP2	
	PNT1	
	MRS2	
	YPL277C	
	APM1	
	YPL250W-A	
	UME1	
	TBF1	
	VPS30	
	INA17	
	MOT1	
	YPL041C	
	ERG10	
	RLF2	
	EAF3	
	TAH18	
	RPC40	
	NCE102	
	JIP5	

Supplementary table 4. Lists of enriched genes according the following settings : read enrichment of x1.5 between 3 hrs and 24 hrs or DNA damage induction, only for transposons found in commun between 3 hrs and 24 hrs (column 1) ; read enrichment for the same time points and for all transposons (column 2) ; transposon enrichment by a factor x1.5 for the same time points (column 3). The next three columns are the lists resulting

from the intersection of the previously described lists, and the last column results from the intersection of all the

three lists.

List 1: genes depleted in reads x1,5 between 3h and 24h for common transposons between 3h and 24h	List 2: genes depleted in reads x1,5 between 3h and 24h for all transposons	List 3: genes depleted in transposons x1.5	Common genes between lists 1 and 2	Common genes between lists 1 and 3	Common genes between lists 2 and 3	Common genes between lists 1, 2 and 3
FYV10	FUN19	YAR075W	ATP12	none	GIM5	none
MIC19	COR1	RPS8A	CUP2		MRPS28	
GIM5	FUI1	YBL065W	IES4		PMC1	
YBI 059W	ISM2	CDS1	ISA2		SMF3	
FMP65	YBI 008W-A	RPS11B	KRE1		TAF14	
IMA2	YBR027C	MSI1	MRP1		YKL162C	
CCW14	RPS11B	YBR221W-A	MRPL51			
PEX27	TSC3	DAD3	RPS11B			
YMR141C	BMT2	HEM3	RRG9			
PSH1	YSW1	SYO1	SSP120			
YER076W-A	YBR224W	YDL023C	URA3			
SBA1	YBR292C	SED1	YDR344C			
TRP2	LEU2	PET100	YHR054C			
SEE1	YIH1	YDR344C	YMR099C			
PKP1	ATG15	НХТЗ	YMR147W			
ECM19	SRF1	MRP1	YOR152C			
DGR2	SLC1	ATP17				
IRC22	NAT1	SNF1				
SPI1	FYV1	YEL032C-A				
AKR2	YDR102C	URA3				
BUD21	YDR109C	YFL066C				
SEC72	TRM82	YGL188C				
YER148W-A	SUP35	CUP2				
ATG22	YDR278C	SEH1				
DSS1	YDR290W	TEL2				
NCE103	DPL1	FHN1				
YJR005C-A	MRPS28	TRX2				
YNR066C	YDR344C	NOP19				
YGL117W	MRP1	YHR054C				
DPB2	SBE2	ATP12				
COQ4	DYN2	BNA3				
FIP1	URA3	EBP2				
MGS1	GTT3	SDH1				
YDR239C	UBC8	SDH3				
YJR112W-A	GCD11	SSP120				
MIX17	EDC2	YLR307C-A				
FMS1	ALD5	YLR466C-B				
TBS1	YER078W-A	YMR099C				

PMC1	UTP7	FOL3
BRR1	IES5	YMR147W
CDA1	LSM5	KRE1
RPA34	PET122	RRG9
YKL162C	CUP2	PSD1
RPL36A	YGL165C	RAS2
EGT2	DST1	YNL058C
PGS1	PMC1	YOL134C
YBR209W	TAM41	SFM1
ZDS1	PEF1	YOR029W
YMR310C	NNF2	YOR152C
YER079C-A	UTP8	GAC1
COX13	ENP2	IES4
YKR051W	YHR050W-A	YOR223W
YNL277W-A	YHR054C	TMA16
YGR117C	GEP4	ISA2
NMA2	ATG32	MRPL51
INP2	PRM5	
YJR018W	YIL030W-A	
YDR433W	YJL182C	
MRPS28	ATP12	
PEA2	YJL175W	
YOR379C	РТК2	
RFM1	HOC1	
RPN14	YKL162C	
ZRG8	SDH2	
KRR1	SMF3	
THP2	RGR1	
UBC11	BOS1	
CHA4	APC9	
ABP1	HOG1	
PBP2	YLR202C	
YLR400W	EST1	
TIM54	SSP120	
MRP8	ECI1	
DIT1	CDA2	
TAF14	YLR326W	
YDR230W	YLR349W	
SMF3	GIM5	
COX23	RCF1	
CDC55	MRPL39	
BIO2	CCS1	
PSY2	YMR085W	
YML094C-A	ATP25	
YML119W	YMR099C	
YER046W-A	YMR147W	
KTI11	YIM1	
YDL186W	NUP53	

MIT1	GYL1
IRC7	RNH1
YOR186C-A	YMR272W-A
ICT1	KRE1
RPS27A	PFS2
YDL085C-A	RTC4
RAM1	YNL235C
TDA2	YNL228W
SCP1	RRG9
UBP9	RHO5
FLO8	NSG2
PHO89	BOP3
BUR6	HDA1
TYR1	ALG12
GID8	NOP8
YFH7	YOL019W
PRR1	NOB1
YDL187C	YOR108C-A
NRD1	CEX1
YPR170W-B	YOR152C
SLG1	PET123
POF1	FYV12
ABF2	TUF1
IKI3	MSB1
HPC2	IES4
YBR296C-A	GEP3
MRPL50	WTM1
CKI1	YOR338W
VBA2	GDS1
РКНЗ	YPL197C
HOS2	TAF14
BMT5	NOG1
YMR122C	DIG1
TAX4	YPL035C
DIT2	SKS1
PMU1	YPR011C
CPT1	ERV2
HIS1	ISA2
YPR170W-A	VPS69
YHB1	MRPL51
YBR232C	SCD6
DIA2	
ILV6	
RRT15	
PDX1	

Supplementary table 5. Lists resulting from the same settings as discribred in Supp. Table 4, but with a depletion of a factor of 1.5 instead of an enrichment.

References

Addinall, S.G., Downey, M., Yu, M., Zubko, M.K., Dewar, J., Leake, A., Hallinan, J., Shaw, O., James, K., Wilkinson, D.J., Wipat, A., Durocher, D., Lydall, D., 2008. A Genomewide Suppressor and Enhancer Analysis of cdc13-1 Reveals Varied Cellular Processes Influencing Telomere Capping in Saccharomyces cerevisiae. Genetics 180, 2251–2266. https://doi.org/10.1534/genetics.108.092577

Alexandru, G., Uhlmann, F., Mechtler, K., Poupart, M.-A., Nasmyth, K., 2001. Phosphorylation of the Cohesin Subunit Scc1 by Polo/Cdc5 Kinase Regulates Sister Chromatid Separation in Yeast. Cell 105, 459–472. https://doi.org/10.1016/S0092-8674(01)00362-2

Arnold, L., Höckner, S., Seufert, W., 2015. Insights into the cellular mechanism of the yeast ubiquitin ligase APC/C-Cdh1 from the analysis of in vivo degrons. MBoC 26, 843–858. https://doi.org/10.1091/mbc.E14-09-1342

Asano, 2005. Concerted mechanism of Swe1/Wee1 regulation by multiple kinases in budding yeast. The EMBO Journal 24, 2194–2204. https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600683

Ashburner, M., Ball, C.A., Blake, J.A., Botstein, D., Butler, H., Cherry, J.M., Davis, A.P., Dolinski, K., Dwight, S.S., Eppig, J.T., Harris, M.A., Hill, D.P., Issel-Tarver, L., Kasarskis, A., Lewis, S., Matese, J.C., Richardson, J.E., Ringwald, M., Rubin, G.M., Sherlock, G., 2000. Gene Ontology: tool for the unification of biology. Nat Genet 25, 25–29. https://doi.org/10.1038/75556

Barford D. 2011 Structure, function and mechanism of the anaphase promoting complex (APC/C). Q Rev Biophys. May;44(2):153-90. doi: 10.1017/S0033583510000259.

Bauer, B., Carr, L.D., Evertz, H.G., Feiguin, A., Freire, J., Fuchs, S., Gamper, L., Gukelberger, J., Gull, E., Guertler, S., Hehn, A., Igarashi, R., Isakov, S.V., Koop, D., Ma, P.N., Mates, P., Matsuo, H., Parcollet, O., Paw\lowski, G., Picon, J.D., Pollet, L., Santos, E., Scarola, V.W., Schollwöck, U., Silva, C., Surer, B., Todo, S., Trebst, S., Troyer, M., Wall, M.L., Werner, P., Wessel, S., 2011. The ALPS project release 2.0: open source software for strongly correlated systems. J. Stat. Mech. 2011, P05001. https://doi.org/10.1088/1742-5468/2011/05/P05001

Botchkarev, V.V., Haber, J.E., 2018. Functions and regulation of the Polo-like kinase Cdc5 in the absence and presence of DNA damage. Curr Genet 64, 87–96. https://doi.org/10.1007/s00294-017-0727-2

Page | 202

Carrozza, M.J., Li, B., Florens, L., Suganuma, T., Swanson, S.K., Lee, K.K., Shia, W.-J., Anderson, S., Yates, J., Washburn, M.P., Workman, J.L., 2005. Histone H3 methylation by Set2 directs deacetylation of coding regions by Rpd3S to suppress spurious intragenic transcription. Cell 123, 581–592. https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.10.023

Casari, E., Gobbini, E., Gnugnoli, M., Mangiagalli, M., Clerici, M., Longhese, M.P., 2021. Dpb4 promotes resection of DNA double-strand breaks and checkpoint activation by acting in two different protein complexes. Nat Commun 12, 4750. https://doi.org/10.1038/s41467-021-25090-9

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. Front Mol Biosci 6, 43. https://doi.org/10.3389/fmolb.2019.00043

Cassani, C., Raspelli, E., Chiroli, E., Fraschini, R., 2014. Vhs2 is a novel regulator of septin dynamics in budding yeast. Cell Cycle 13, 1590–1601. https://doi.org/10.4161/cc.28561

Charles, J.F., Jaspersen, S.L., Tinker-Kulberg, R.L., Hwang, L., Szidon, A., Morgan, D.O., 1998. The Polo-related kinase Cdc5 activates and is destroyed by the mitotic cyclin destruction machinery in S. cerevisiae. Current Biology 8, 497–507. https://doi.org/10.1016/S0960-9822(98)70201-5

Ciosk, R., Zachariae, W., Michaelis, C., Shevchenko, A., Mann, M., Nasmyth, K., 1998. An ESP1/PDS1 Complex Regulates Loss of Sister Chromatid Cohesion at the Metaphase to Anaphase Transition in Yeast. Cell 93, 1067–1076. https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81211-8

Coutelier, H., Ilioaia, O., Peillet, J.L., Hamon, M., D'Amours, D., Teixeira, M.T., Xu, Z., 2021. The Polo kinase Cdc5 is regulated at multiple levels in the adaptation response to telomere dysfunction. bioRxiv. https://doi.org/10.1101/2021.10.20.465143

Coutelier, H., Xu, Z., Morisse, M.C., Lhuillier-Akakpo, M., Pelet, S., Charvin, G., Dubrana, K., Teixeira, M.T., 2018. Adaptation to DNA damage checkpoint in senescent telomerase-negative cells promotes genome instability. Genes Dev. 32, 1499–1513. https://doi.org/10.1101/gad.318485.118 Donnianni, R.A., Ferrari, M., Lazzaro, F., Clerici, M., Tamilselvan Nachimuthu, B., Plevani, P., Muzi-Falconi, M., Pellicioli, A., 2010. Elevated Levels of the Polo Kinase Cdc5 Override the Mec1/ATR Checkpoint in Budding Yeast by Acting at Different Steps of the Signaling Pathway. PLoS Genet 6, e1000763. https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000763

Duffy, S., Fam, H.K., Wang, Y.K., Styles, E.B., Kim, J.-H., Ang, J.S., Singh, T., Larionov, V., Shah, S.P., Andrews, B., Boerkoel, C.F., Hieter, P., 2016. Overexpression screens identify conserved dosage chromosome instability genes in yeast and human cancer. Proc Natl Acad Sci U S A 113, 9967–9976. https://doi.org/10.1073/pnas.1611839113

Eapen, V.V., Haber, J.E., 2013. DNA damage signaling triggers the cytoplasm-to-vacuole pathway of autophagy to regulate cell cycle progression. Autophagy 9, 440–441. https://doi.org/10.4161/auto.23280

Edenberg, E.R., Vashisht, A., Benanti, J.A., Wohlschlegel, J., Toczyski, D.P., 2014. Rad53 Downregulates Mitotic Gene Transcription by Inhibiting the Transcriptional Activator Ndd1. Mol Cell Biol 34, 725–738. https://doi.org/10.1128/MCB.01056-13

Ensminger, 2020. One end to rule them all: Non-homologous end-joining and homologous recombination at DNA double-strand breaks PubMed https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32105514

Farmer S, San-Segundo PA, Aragón L 2011 The Smc5–Smc6 Complex Is Required to Remove Chromosome Junctions in Meiosis. PLOS ONE 6(6): e20948. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0020948

Ferreira, C., van Voorst, F., Martins, A., Neves, L., Oliveira, R., Kielland-Brandt, M.C., Lucas, C., Brandt, A., 2005. A member of the sugar transporter family, Stl1p is the glycerol/H+ symporter in Saccharomyces cerevisiae. Mol Biol Cell 16, 2068–2076. https://doi.org/10.1091/mbc.e04-10-0884

Galgoczy, D.J., Toczyski, D.P., 2001. Checkpoint adaptation precedes spontaneous and damage-induced genomic instability in yeast. Mol Cell Biol 21, 1710–1718. https://doi.org/10.1128/MCB.21.5.1710-1718.2001

Garvik, B., Carson, M., Hartwell, L., 1995. Single-stranded DNA arising at telomeres in cdc13 mutants may constitute a specific signal for the RAD9 checkpoint. Molecular and Cellular Biology 15, 6128–6138. https://doi.org/10.1128/MCB.15.11.6128

Giannattasio, M., Lazzaro, F., Plevani, P., Muzi-Falconi, M., 2005. The DNA Damage Checkpoint Response Requires Histone H2B Ubiquitination by Rad6-Bre1 and H3 Methylation by Dot1 *. Journal of Biological Chemistry 280, 9879–9886. https://doi.org/10.1074/jbc.M414453200

Goebl, M., Yanagida, M., 1991. The TPR snap helix: a novel protein repeat motif from mitosis to transcription. Trends in Biochemical Sciences 16, 173–177. https://doi.org/10.1016/0968-0004(91)90070-C

Grenon, M., Gilbert, C., Lowndes, N.F., 2001. Checkpoint activation in response to doublestrand breaks requires the Mre11/Rad50/Xrs2 complex. Nat Cell Biol 3, 844–847. https://doi.org/10.1038/ncb0901-844

Harkness, T.A.A., 2018. Activating the Anaphase Promoting Complex to Enhance Genomic Stability and Prolong Lifespan. International Journal of Molecular Sciences 19, 1888. https://doi.org/10.3390/ijms19071888

Heo, S.J., Tatebayashi, K., Kato, J., Ikeda, H., 1998. The RHC21 gene of budding yeast, a homologue of the fission yeast rad21+ gene, is essential for chromosome segregation. Mol Gen Genet 257, 149–156. https://doi.org/10.1007/s004380050634

Johnson, E.S., Ma, P.C., Ota, I.M., Varshavsky, A., 1995. A proteolytic pathway that recognizes ubiquitin as a degradation signal. J Biol Chem 270, 17442–17456. https://doi.org/10.1074/jbc.270.29.17442

Kim, J.-S., Krasieva, T.B., LaMorte, V., Taylor, A.M.R., Yokomori, K., 2002. Specific Recruitment of Human Cohesin to Laser-induced DNA Damage *. Journal of Biological Chemistry 277, 45149–45153. https://doi.org/10.1074/jbc.M209123200

Kupiec, M., Simchen, G., 1986. Regulation of the RAD6 gene of Saccharomyces cerevisiae in the mitotic cell cycle and in meiosis. Mol Gen Genet 203, 538–543. https://doi.org/10.1007/BF00422083 Langmead, B., Trapnell, C., Pop, M., Salzberg, S.L., 2009. Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome. Genome Biology 10, R25. https://doi.org/10.1186/gb-2009-10-3-r25

Lee, 2003. Yeast Rad52 and Rad51 Recombination Proteins Define a Second Pathway of DNA Damage Assessment in Response to a Single Double-Strand Break Molecular and Cellular Biology. https://journals.asm.org/doi/full/10.1128/MCB.23.23.8913-8923.2003

Lee, S.E., Moore, J.K., Holmes, A., Umezu, K., Kolodner, R.D., Haber, J.E., 1998. Saccharomyces Ku70, Mre11/Rad50, and RPA Proteins Regulate Adaptation to G2/M Arrest after DNA Damage. Cell 94, 399–409. https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81482-8

Love, M.I., Huber, W., Anders, S., 2014. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. Genome Biol 15, 550. https://doi.org/10.1186/s13059-014-0550-8

Lowery, D.M., Lim, D., Yaffe, M.B., 2005. Structure and function of Polo-like kinases. Oncogene 24, 248–259. https://doi.org/10.1038/sj.onc.1208280

Michel, A.H., Hatakeyama, R., Kimmig, P., Arter, M., Peter, M., Matos, J., De Virgilio, C., Kornmann, B., 2017. Functional mapping of yeast genomes by saturated transposition. Elife 6, e23570. https://doi.org/10.7554/eLife.23570

Michel, A.H., van Schie, S., Mosbach, A., Scalliet, G., Kornmann, B., 2019. Exploiting homologous recombination increases SATAY efficiency for loss- and gain-of-function screening (preprint). Cell Biology. https://doi.org/10.1101/866483

Mimitou, 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, 3358–3369. https://doi.org/10.1038/emboj.2010.193

Mishra, P.K., Ciftci-Yilmaz, S., Reynolds, D., Au, W.-C., Boeckmann, L., Dittman, L.E., Jowhar, Z., Pachpor, T., Yeh, E., Baker, R.E., Hoyt, M.A., D'Amours, D., Bloom, K., Basrai, M.A., 2016. Polo kinase Cdc5 associates with centromeres to facilitate the removal of centromeric cohesin during mitosis. Mol Biol Cell 27, 2286–2300. https://doi.org/10.1091/mbc.E16-01-0004

Mishra, P.K., Olafsson, G., Boeckmann, L., Westlake, T.J., Jowhar, Z.M., Dittman, L.E., Baker, R.E., D'Amours, D., Thorpe, P.H., Basrai, M.A., 2019. Cell cycle–dependent association of polo kinase Cdc5 with CENP-A contributes to faithful chromosome segregation in budding yeast. MBoC 30, 1020–1036. https://doi.org/10.1091/mbc.E18-09-0584

Moreau, S., Ferguson, J.R., Symington, L.S., 1999. The Nuclease Activity of Mre11 Is Required for Meiosis but Not for Mating Type Switching, End Joining, or Telomere Maintenance. Mol Cell Biol 19, 556–566. https://doi.org/10.1128/mcb.19.1.556

Nugent, C.I., Hughes, T.R., Lue, N.F., Lundblad, V., 1996. Cdc13p: A Single-Strand Telomeric DNA-Binding Protein with a Dual Role in Yeast Telomere Maintenance. Science 274, 249–252. https://doi.org/10.1126/science.274.5285.249

Oelschlaegel, T., Schwickart, M., Matos, J., Bogdanova, A., Camasses, A., Havlis, J., Shevchenko, A., Zachariae, W., 2005. The Yeast APC/C Subunit Mnd2 Prevents Premature Sister Chromatid Separation Triggered by the Meiosis-Specific APC/C-Ama1. Cell 120, 773– 788. https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.01.032

Oh, J., Al-Zain, A., Cannavo, E., Cejka, P., Symington, L.S., 2016. Xrs2 Dependent and Independent Functions of the Mre11-Rad50 Complex. Molecular Cell 64, 405–415. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.09.011

Pakchuen, S., Ishibashi, M., Takakusagi, E., Shirahige, K., Sutani, T., 2016. Physical Association of Saccharomyces cerevisiae Polo-like Kinase Cdc5 with Chromosomal Cohesin Facilitates DNA Damage Response. J Biol Chem 291, 17228–17246. https://doi.org/10.1074/jbc.M116.727438

Penkner, A.M., Prinz, S., Ferscha, S., Klein, F., 2005. Mnd2, an Essential Antagonist of the Anaphase-Promoting Complex during Meiotic Prophase. Cell 120, 789–801. https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.01.017

Piazza, A., Bordelet, H., Dumont, A., Thierry, A., Savocco, J., Girard, F., Koszul, R., 2021. Cohesin regulates homology search during recombinational DNA repair. Nat Cell Biol 23, 1176–1186. https://doi.org/10.1038/s41556-021-00783-x

Prado, F., 2021. Non-Recombinogenic Functions of Rad51, BRCA2, and Rad52 in DNA Damage Tolerance. Genes 12, 1550. https://doi.org/10.3390/genes12101550

Queralt, E., Lehane, C., Novak, B., Uhlmann, F., 2006. Downregulation of PP2ACdc55 Phosphatase by Separase Initiates Mitotic Exit in Budding Yeast. Cell 125, 719–732. https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.03.038

Ramos, F., Villoria, M.T., Alonso-Rodríguez, E., Clemente-Blanco, A., 2019. Role of protein phosphatases PP1, PP2A, PP4 and Cdc14 in the DNA damage response. Cell Stress 3, 70–85. https://doi.org/10.15698/cst2019.03.178

Ratsima, H., Serrano, D., Pascariu, M., D'Amours, D., 2016. Centrosome-Dependent Bypass of the DNA Damage Checkpoint by the Polo Kinase Cdc5. Cell Rep 14, 1422–1434. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.01.014

Rudner, A.D., Murray, A.W., 2000. Phosphorylation by Cdc28 Activates the Cdc20-Dependent Activity of the Anaphase-Promoting Complex. Journal of Cell Biology 149, 1377–1390. https://doi.org/10.1083/jcb.149.7.1377

Saeed AI, Sharov V, White J, Li J, Liang W, Bhagabati N, Braisted J, Klapa M, Currier T, Thiagarajan M, Sturn A, Snuffin M, Rezantsev A, Popov D, Ryltsov A, Kostukovich E, Borisovsky I, Liu Z, Vinsavich A, Trush V, Quackenbush J. 2003. TM4: a free, open-source system for microarray data management and analysis. Biotechniques. Feb;34(2):374-8. doi: 10.2144/03342mt01.

Sakchaisri, 2004. Coupling morphogenesis to mitotic entry | PNAS [WWW Document]. URL https://www.pnas.org/doi/abs/10.1073/pnas.0400641101 (accessed 7.19.22).

Sakuno, T., Hiraoka, Y., 2022. Rec8 Cohesin: A Structural Platform for Shaping the Meiotic Chromosomes. Genes 13, 200. https://doi.org/10.3390/genes13020200

Sandell, L.L., Zakian, V.A., 1993. Loss of a yeast telomere: Arrest, recovery, and chromosome loss. Cell 75, 729–739. https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90493-A

Scott, K.L., Plon, S.E., 2003. Loss of Sin3/Rpd3 Histone Deacetylase Restores the DNA Damage Response in Checkpoint-Deficient Strains of Saccharomyces cerevisiae. Molecular and Cellular Biology 23, 4522–4531. https://doi.org/10.1128/MCB.23.13.4522-4531.2003

Seeber, A., Hegnauer, A.M., Hustedt, N., Deshpande, I., Poli, J., Eglinger, J., Pasero, P., Gut, H., Shinohara, M., Hopfner, K.-P., Shimada, K., Gasser, S.M., 2016. RPA Mediates Recruitment of

MRX to Forks and Double-Strand Breaks to Hold Sister Chromatids Together. Molecular Cell 64, 951–966. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.10.032

Sjögren, 2001. Sister chromatid cohesion is required for postreplicative double-strand break repair in Saccharomyces cerevisiae ScienceDirect. https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960982201002718

Snead, J.L., Sullivan, M., Lowery, D.M., Cohen, M.S., Zhang, C., Randle, D.H., Taunton, J., Yaffe, M.B., Morgan, D.O., Shokat, K.M., 2007. A Coupled Chemical-Genetic and Bioinformatic Approach to Polo-like Kinase Pathway Exploration. Chemistry & Biology 14, 1261–1272. https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2007.09.011

Song, S., Grenfell, T.Z., Garfield, S., Erikson, R.L., Lee, K.S., 2000. Essential function of the polo box of Cdc5 in subcellular localization and induction of cytokinetic structures. Molecular and Cellular Biology 20, 286–298. https://doi.org/10.1128/MCB.20.1.286-298.2000

Spellman, 1998. Comprehensive Identification of Cell Cycle–regulated Genes of the Yeast Saccharomyces cerevisiae by Microarray Hybridization Molecular Biology of the Cell. https://www.molbiolcell.org/doi/full/10.1091/mbc.9.12.3273

Surana, U., Amon, A., Dowzer, C., McGrew, J., Byers, B., Nasmyth, K., 1993. Destruction of the CDC28/CLB mitotic kinase is not required for the metaphase to anaphase transition in budding yeast. The EMBO journal 12, 1969–1978. https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1993.tb05846.x

Taddei, A., Gasser, S.M., 2012. Structure and function in the budding yeast nucleus. Genetics 192, 107–129 https://doi.org/10.1534/genetics.112.140608

Thornton BR, Ng TM, Matyskiela ME, Carroll CW, Morgan DO, Toczyski DP. 2006 An architectural map of the anaphase-promoting complex. Genes Dev.;20(4):449-60. doi: 10.1101/gad.1396906

Toczyski, D.P., 2006. Methods for Studying Adaptation to the DNA Damage Checkpoint in Yeast, in: Methods in Enzymology, DNA Repair, Part B. Academic Press, pp. 150–165. https://doi.org/10.1016/S0076-6879(05)09009-9 Toczyski, D.P., Galgoczy, D.J., Hartwell, L.H., 1997. CDC5 and CKII Control Adaptation to the Yeast DNA Damage Checkpoint. Cell 90, 1097–1106. https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80375-X

Ünal, E., Arbel-Eden, A., Sattler, U., Shroff, R., Lichten, M., Haber, J.E., Koshland, D., 2004. DNA Damage Response Pathway Uses Histone Modification to Assemble a Double-Strand Break-Specific Cohesin Domain. Molecular Cell 16, 991–1002. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2004.11.027

Veis, J., Klug, H., Koranda, M., Ammerer, G., 2007. Activation of the G2/M-specific gene CLB2 requires multiple cell cycle signals. Mol Cell Biol 27, 8364–8373. https://doi.org/10.1128/MCB.01253-07

Vidanes, G.M., Sweeney, F.D., Galicia, S., Cheung, S., Doyle, J.P., Durocher, D., Toczyski, D.P., 2010. CDC5 inhibits the hyperphosphorylation of the checkpoint kinase Rad53, leading to checkpoint adaptation. PLoS Biol 8, e1000286. https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000286

Wang, J., Tang, C., Yang, C., Zheng, Q., Hou, Y., 2019. Tropomyosin-1 Functions as a Tumor Suppressor with Respect to Cell Proliferation, Angiogenesis and Metastasis in Renal Cell Carcinoma. J Cancer 10, 2220–2228. https://doi.org/10.7150/jca.28261

Waterman, D.P., Haber, J.E., Smolka, M.B., 2020. Checkpoint responses to DNA double-strand breaks. Annu Rev Biochem 89, 103–133. https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-011520-104722

Wu, N., Yu, H., 2012. The Smc complexes in DNA damage response. Cell Biosci 2, 5. https://doi.org/10.1186/2045-3701-2-5

Yamada, M., Hayatsu, N., Matsuura, A., Ishikawa, F., 1998. Y'-Help1, a DNA helicase encoded by the yeast subtelomeric Y' element, is induced in survivors defective for telomerase. J Biol Chem 273, 33360–33366. https://doi.org/10.1074/jbc.273.50.33360

Yelamanchi, S.K., Veis, J., Anrather, D., Klug, H., Ammerer, G., 2014. Genotoxic Stress Prevents Ndd1-Dependent Transcriptional Activation of G 2 /M-Specific Genes in Saccharomyces cerevisiae. Mol Cell Biol 34, 711–724. https://doi.org/10.1128/MCB.01090-13 Zachariae, 1996. TPR proteins required for anaphase progression mediate ubiquitination of mitotic B-type cyclins in yeast. Molecular Biology of the Cell. https://doi.org/10.1091/mbc.7.5.791

Zhao, X., 2001. The ribonucleotide reductase inhibitor Sml1 is a new target of the Mec1/Rad53 kinase cascade during growth and in response to DNA damage. The EMBO Journal 20, 3544–3553. https://doi.org/10.1093/emboj/20.13.3544

Zhao, X., Muller, E.G.D., Rothstein, R., 1998. A Suppressor of Two Essential Checkpoint Genes Identifies a Novel Protein that Negatively Affects dNTP Pools. Molecular Cell 2, 329–340. https://doi.org/10.1016/S1097-2765(00)80277-4

Matériels et

0

000

Méthodes

sur le crible saturé en transposons pour l'étude de l'adaptation au dommage à l'ADN

00000

0



Vue artistique de la transposition chez S. cerevisiae. Chaque couleur correspond à une cellule, contenant un plasmide de transposition de la même couleur et ayant intégré un transposon de même couleur dans son génome. Au séquençage, nous observons l'ensemble des sites d'insertion de transposons, comme si tous étaient initialement au sein d'une même cellule. Le crible saturé en transposons que nous avons conduit a été un défi à mettre au point au sein du laboratoire. Il est basé sur un protocole en culture liquide, qui n'avait encore jamais été publié alors, gracieusement mis à notre disposition par l'équipe d'Agnès Michel et de Benoît Kornmann. Le protocole utilise le plasmide pBK549 (Fig. 12) sur lequel le transposon interrompt le gène ADE2.



Figure 12. Carte du plasmide pBK549 (Michel and Kornmann, 2022) sur lequel la séquence du transposon MiniDs interrompt le gène *ADE2*. En ce qui concerne le plasmide pBK625, le transposon interrompt le gène *LEU2*. Le gène *URA3* permet la sélection des clones ayant intégré le plasmide. La transposase est sous promoteur galactose et permet l'excision du transposon au moment d'une culture en milieu galactose.

Comme mentionné dans l'article 2, nous avons adapté le protocole à l'utilisation du plasmide pBK625 – nous avons d'ailleurs eu l'honneur de faire partie des premiers à nous en servir – et à l'étude de l'adaptation au dommage à l'ADN, en ajoutant une expérience d'induction d'un dommage en fin de protocole. L'expérience d'adaptation a, elle aussi, nécessité des ajustements, étant réalisée sur des volumes 1000 fois supérieurs au protocole habituellement suivi au laboratoire, et à partir de concentrations cellulaires 5 à 20 fois supérieures également.

Par ailleurs, d'autres ajustements ont été nécessaires au protocole d'Agnès Michel et de Benoît Kornmann, qui ont modifié la cinétique de l'expérience sur des souches cultivées à 30°C : nos souches *cdc13-1* étant thermosensibles, elles ont été cultivées à 23°C jusqu'à l'induction du dommage à l'ADN au moment de l'expérience d'adaptation, où la température a alors été augmentée à 32°C. Le protocole présenté ici contient les résultats que nous avons obtenus pour chaque étape.
1. Préparation de la banque de mutants en milieu liquide

1.1. Principe de l'expérience et aperçu des étapes

Figure 13. Schématisation des étapes de cultures jusqu'à l'enrichissement en cellules transposées. La division des cultures au moment de l'adaptation est donnée dans l'article 2, Fig. 1.

Le plasmide pBK625 contient le gène URA fonctionnel, permettant de sélectionner les cellules ayant intégré le plasmide lors de la transformation. Il contient aussi le gène LEU2, mais disrupté par la séquence du transposon MiniDS se situe au sein du gène LEU2, l'interrompant et rendant ainsi les cellules incapables de pousser sur milieu dépourvue de leucine. La délocalisation de ce transposon – transposition – se fait en surexprimant la transposase grâce à un promoteur inductible au galactose, donc en cultivant les cellules dans un milieu contenant du galactose. Lorsque le transposon quitte le plasmide, le gène LEU2 jusque-là interrompu peut se recombiner, permettant aux cellules de croitre sur milieu dépourvu de leucine. C'est ce milieu de culture qui permet de sélectionner les cellules transposées, seules à pouvoir s'y développer (Fig. 13). L'ensemble de ces étapes se font à 23°C. Après cette étape d'enrichissement en milieu *drop-out* -Leu, la culture est divisée en 3, l'une récoltée immédiatement (TO), la deuxième mise à 32°C pendant 3 h (T3) et la dernière mise à 32°C pendant 24 h (T24) avant collecte des cellules (voir article 2 Fig.1 pour la figure correspondante).

1.2. Sélection des clones sur lesquels démarrer l'expérience

Après transformation de la souche W303 *ura3-1 leu2-3,112 cdc5::cdc5-ad-3HA-TRP1 cdc13-1* par le plasmide pBK625, 6 clones sélectionnés sont striés sur milieu solide *drop out* -Leu et *drop out* -Ura. Après une incubation de 3 jours à 23°C, 3 clones par souche sont choisis en fonction des critères suivants : une bonne croissance sur milieu -Ura, indiquant que les cellules contiennent bien le plasmide, et environ une dizaine de clones présents sur milieu *drop-out* -Leu. (Fig. 14). Les quelques clones capables de pousser sur drop-out -Leu2 reflètent une fuite légère de la transposition, preuve que l'excision du transposon et la recombinaison du gène LEU2 sont possible.



Figure 14. Colonies formées sur boîtes *drop-out* -Leu et -Ura pour 6 transformants après 3 jours d'incubation à 23°C. En vert sont les 3 transformants sélectionnés pour la suite de l'expérience, selon les critères suivants : bonne croissance sur milieu -Ura et présence d'une dizaine de colonies sur milieu -Leu.

1.3. Précultures liquides

Après 3 à 4 jours d'incubation des clones repris de la boîte -Ura, 6 mL de *drop-out* -Ura, 0.2% glucose, 2% raffinose sont innoculés au matin, à une $DO_{600 \text{ nm}}$ de 0,2-0,4. Les précultures sont ensuite incubées à 23°C jusqu'à ce qu'elles atteignent $DO_{600 \text{ nm}} = 4$, c'est-à-dire au bout d'environ 24-30 heures (Table 2).

Clana	Préculture		
Cione	DO initiale	DO finale	Temps (h)
#1	0,39	4,0	30
#2	0,32	4,0	30
#3	0,30	4,2	30
#4	0,24	3,5	24
#5	0,24	3,4	24
#6	0,24	3,4	24
#7	0,27	3,6	24
#8	0,27	3,5	24
#9	0,25	3,8	24

Tableau 2. Mesures des DO_{600 nm} obtenues pendant la phase de préculture, d'une durée de 24 à 30 heures.

1.4. Induction de la transposition

Les précultures servent ensuite à innoculer 30 mL de milieu *drop-out* -Ura, 2% galactose à une DO₆₀₀ finale d'environ 0,2. Ces cultures sont ensuite incubées à 23°C. Le moment de l'induction est appelé temps 0 (T0). L'étape d'induction permet la transposition du transposon MiniDs du plasmide et son insertion unique dans le génome.

1.5. Réensemencement

Au bout de 80 heures (T80) d'induction de la transposition, seule une culture parmi les trois précédemment démarrées est réensemencée en milieu *drop-out* -Leu à $DO_{600} = 0,2$ (Table 3) dans un volume total ajusté de façon à réensemencer la totalité du volume issu de la phase d'induction, permettant de conserver la diversité des sites d'insertions de transposons. Les volumes généralement nécessaires à cette étape sont d'environ 1 à 2 L pour chaque culture ré-ensemencée.

Le choix d'une culture parmi les 3 est basé sur la culture pour laquelle la transposition semble avoir été la plus efficace : nous présenterons la méthode d'évaluation de l'efficacité de transposition en partie 1.6.

L'étape de réensemencement s'arrête quand les cultures atteignent une DO₆₀₀ d'environ 1-2. Contrairement au protocol initial de Michel et al., l'enrichissement ici n'a pas besoin d'être très important puisque l'ajout d'une expérience d'adaptation rallonge le temps de culture de deux jours. Par ailleurs, l'adaptation étant une expérience très sensible, habituellement démarrée à $DO_{600} = 0,1$, arrêter l'étape de réensemencement avant d'atteindre des concentrations trop importantes semble préférable.

Culture	Avant réensemencement	Réensemencement		
	DO	DO initiale	DO finale	Temps (h)
#1	8	0,2	1,4	80
#4	9,2	0,18	2,0	80
#7	~8	0,19	0,84	80
#8	~8	0,22	0,78	80
#9	~8	0,22	1,38	80

Tableau 3. Mesures des DO₆₀₀ obtenues pendant la phase de réensemencement.

1.6. Expérience d'adaptation au dommage à l'ADN

À la fin de l'étape de réensemencement, la culture est divisée en 3 volumes égaux. L'un est immédiatement collecté (temps 0 par rapport à l'induction du dommage à l'ADN) : le milieu de culture est éliminé par une centrifugation de 4 min à 4°C et 3200 g, et le culot cellulaire est congelé à -70°C. Les deux autres sous-échantillons restant sont incubés à 32°C, avec agitation pendant 3h et 24h respectivement (temps 3 et 24 heures après l'induction du dommage), puis le culot cellulaire est collecté et stocké comme décrit précédemment. Les DO₆₀₀ de chaque sous-échantillon sont mesurées avant collecte des cellules (Table 4).

Tableau 4. DO₆₀₀ prises au moment de la collecte des cellules après l'expérience d'adaptation, mesurées au spectrophotomètre (WPA CO 8000).

Sous ásbantillan	Adaptation		
Sous-echantinon	DO finale	Temps à 32°C (h)	
#4a	4,9	3	
#4b	3,7	24	
#7a	0,95	3	
#7b	2,4	24	
#8a	0,85	3	
#8b	2,2	24	
#9a	1,7	3	
#9b	4,2	24	

1.7. Evaluation du bruit de fond et de l'efficacité de la transposition

Aux temps T0, T30 et T80 après induction de la transposition, 200 μL de culture sont étalés sur boîtes *drop-out* -Leu, *drop-out* -Ura et YPD, selon les dilutions suivantes (Table 5) :

Tableau 5. Dilutions appliquées lors de l'étalement sur boîtes *drop-out* -IEU, *drop-out* -URA et YPD, à différents temps d'induction de la transposition.

Milieu solide	Dilution appliquée selon lemps après induction de la transposition		
	то	Т30	T80
drop-out -LEU	1/100 ^e	1/100 ^e	1/5000 ^e
drop-out -URA	1/10000 ^e	1/400000 ^e	1/100000 ^e
YPD	1/10000 ^e	1/400000 ^e	1/100000 ^e

Les colonies issues de ces boîtes ont été comptées après 2 à 3 jours d'incubation à 23°C. Au cours de l'induction, le nombre de cellules Leu+ normalisé par rapport aux colonies sur YPD augmente (Fig. 15) pour deux raisons : d'une part l'induction de la transposition délocalise le transposon MiniDs du gène *LEU2* du plasmide qui peut alors se recombiner, d'autre part les cellules Leu+ ainsi formées se divisent. Le nombre de cellules Leu+ à T30 est environ 7% du nombre de cellules à T80.

Note : dans le protocole initial d'Agnès Michel et de Benoît Kornmann, le nombre de cellules à T20 est environ 10% du nombre de cellules à T54, T20 et T54 étant le nombre d'heures après induction de la transposition selon leur cinétique de croissance à 30°C.

L'exemple donné ici (Fig. 15) est représentatif d'une expérience ayant fonctionné et pour laquelle le comptage sur boîte *drop-out* -Leu était en adéquation avec l'augmentation attendue du nombre de cellules Leu+. Mais de façon étonnante, alors que les mêmes dilutions étaient appliquées d'une fois à l'autre, une proportion importante de boîtes se sont avérées contenir un nombre de colonies extrêmement variable, rendant parfois le comptage impossible, soit par manque de cellules, soit par saturation des boîtes. Fréquemment, le comptage sur boîte a donné des résultats surprenants, comme par exemple une diminution du nombre de cellules Leu+ ou Ura+ entre T0 et T30 ou entre T30 et T80. Ces résultats ne sont pourtant pas corrélés à l'échec de l'expérience, puisque certaines se sont avérées contenir une bonne saturation en transposons malgré tout. Inversement, une bonne croissance du

Jeanne Le Peillet

nombre de cellules Leu+ au cours de la phase d'induction n'a pas nécessairement été gage de succès de l'expérience.



Figure 15. Courbe de croissance du nombre de cellules LEU+ normalisé, évalué par comptage sur boîtes *drop-out* -LEU, à différents temps d'induction de la transposition : 0h (T0), 30h (T30) et 80h (T80).

2. Préparation de l'ADN pour le séquençage

2.1. Principe de l'expérience et aperçu des étapes



Figure 16. Etapes récapitulatives depuis l'extraction d'ADN génomique jusqu'au séquençage. En bleu l'ADN, en orange le transposon.

Après collecte des cellules, l'ADN génomique total est extrait et préparé de façon à amplifier les sites d'insertion de transposons par PCR. La préparation de l'ADN avant PCR se fait par digestions multiples permettant de générer un très grand nombre de petits fragments d'ADN. Ces enzymes coupent aussi dans la séquence du transposon. Ensuite, ces fragments

sont circularisés et la PCR se fait grâce à des amorces reconnaissant le transposon et orientées vers l'extérieur, permettant d'amplifier le site d'insertion (Fig. 16).

2.2. Extraction de l'ADN

Nous avons essayé plusieurs techniques d'extraction de l'ADN génomique pour limiter la perte de matériel génétique : extraction sur colonnes 20G et 500G de Qiagen et extraction au phénol-chroloforme. Finalement, l'extraction avec laquelle nous avons eu les meilleurs résultats était celle utilisant les colonnes 500G de Qiagen. La quantité d'ADN à extraire provient de cultures d'environ 500 mL presque arrivées à saturation, soit une quantité de cellules de l'ordre de 10¹⁰ cellules. Une seule colonne est donc nécessaire pour l'extraction selon les recommandations de Qiagen, mais nous avons observé de meilleurs résultats en utilisant 4 colonnes par échantillon au total. D'ailleurs, avons observé que l'extraction de l'ADN de la moitié de chaque échantillon suffit à obtenir des résultats satisfaisants, permettant de garder des cellules en réserve en cas d'imprévu.

L'ADN extrait selon le protocole de Qiagen est ensuite précipité à l'isopropanol et lavé avec 500 μ L d'éthanol 70% à -20°C. Le culot d'ADN est laissé séché sur la nuit puis re-suspendu dans 100 μ L d'H₂O Milli-Q et incubé à 55°C pendant 1 à 2 heures. La quantité d'ADN est ensuite mesurée par fluorométrie (Qubit, Invitrogen). Les expériences fructueuses ont donnée des concentrations de 500-1500 ng/ μ L. Seuls 4 μ g au total sont utilisés par échantillon pour la suite de la préparation des ADN.

2.3. Digestions enzymatiques

Sur les 4 µL prélevés, la moitié est digérée par Mbol et l'autre par Hin1II (ThermoFisher Scientific *FastDigest* FD0814 et FD1834 respectivement). Ces digestions permettent de fragmenter l'ADN génomique, en plus d'un site de coupure unique dans les séquences de transposons insérés. Chaque digestion se fait dans un volume total de 50 µL, dont 30 unités d'enzyme et 5 µL de tampon FD 10X (ThermoFisher Scientific B64), à 37°C sur la nuit. Après inactivation de la digestion par une incubation de 20 min à 65°C, les profils de digestions sont ensuite révélés sur gel d'agarose 0,8%, et montrent un *smear* allant de 300 à 10000 paires de bases (Fig. 17).



échelle (pb) MboI Hind1II MboI Hind1II

Figure 17. Profils de digestion de l'ADN génomique par Mbol ou Hin1II. Gel d'agarose 0,8%. 0,5 μg de GeneRuler 1 kb Plus. 2 μL d'échantillon. Les puits 1 et 3 contiennent l'ADN digéré par Mbol, et les puits 2 et 4 par Hin1II.

2.4. Circularisation de l'ADN

La circularisation par ligation des fragments d'ADN générés permet de préparer l'ADN à l'amplification des sites d'insertions de transposons par PCR. La réaction de ligation se produit directement dans les tubes de digestion, dans lesquels sont ajoutés 70 µL de tampon de ligature rapide 5X (ThermoFisher Scientific, *Rapid Kit* K1422), 5 unités de T4 DNA ligase (ThermoFisher Scientific, *Rapid Kit* K1422) dans un volume final de 400 uL, incubé pendant 6 heures à 22°C.

2.5. Précipitation de l'ADN circularisé

Immédiatement après la réaction de ligation, l'ADN est précipité à l'isopropanol volume à volume, puis lavé à l'éthanol 70% à -20°C. L'ADN purifié est ensuite resuspendu dans 100 μ L d'H₂O Milli-Q. Les culots sont à peine détectables à l'œil.

2.6. Amplification des sites d'insertions de transposons

Les 100 μ L de chaque échantillon sont ensuite répartis dans 10 tubes de PCR contenant chacun 10 μ L de tampon (NH₄)₂SO₄ 10X (ThermoFisher Scientific EPO404), 8 μ L de MgCl₂ 10X (ThermoFisher Scientific EPO404), 200 μ M de dNTP, 100 pmol d'amorce P5 (utilisée pour tous les échantillons) et 100 pmol d'amorce P7, 2,5 unités de Taq polymérase (ThermoFisher Scientific EPO404), dans un volume total de 100 μ L. Pour une culture donnée, la même amorce P7 est utilisée à la fois pour l'échantillon digéré par Mbol et pour celui digéré par Hin1II. Les amorces utilisées dans nos différentes expériences sont résumées dans le tableau 4. **Tableau 6.** Séquences des amorces P5 et P7 utilisées, avec les index Illumina correspondants. Les séquencessoulignées correspondent aux index.

Amorce	Séquence 5'-3'	Index Illumina
P5	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACTCCGTCCCGCAAGTTAAATA	/
P7 #1	CAACCACAACACCCCATACCACATCCACTAATACCAAAACCAACCCCATAAA	D701 RC :
	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGAT <u>CGAGTAAT</u> ACGAAAACGAACGGGATAAA	<u>CGAGTAAT</u>
P7 #2		D702 RC :
	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGAT <u>TCTCCGGA</u> ACGAAAACGAACGGGATAAA	<u>TCTCCGGA</u>
D7 #2		D703 RC :
P7#3 CAAC	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGAT <u>AATGAGCG</u> ACGAAAACGAACGGGATAAA	AATGAGCG
P7 #4	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGAT <u>GGAATCTC</u> ACGAAAACGAACGGGATAAA	D704 RC :
		GGAATCTC
P7 #5		D705 RC :
	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGAT <u>TTCTGAAT</u> ACGAAAACGAACGGGATAAA	<u>TTCTGAAT</u>

Le programme de PCR suivi est 95°C 1 min – 35x (95°C 30 s – 55°C 30 s – 72°C 3 min) – 72°C 10 min. La qualité des produits de PCR obtenus sont analysés sur gel d'agarose 1,5% (Fig. 18).

échelle (pb) Mbol Hind111 Mbol Hind111



Figure 18. Profil de migration des échantillons après amplification des sites d'insertions de transposons par PCR. Gel d'agarose 1,5%. 1,5 μg de GeneRuler 1 kb Plus, 2 μL d'échantillon déposé. Les puits 1 et 3 contiennent l'ADN digéré par Mbol, les puits 2 et 4 par Hin1II. Les réplicas proviennent de deux cultures différentes. Les bandes observées correspondent *LEU2*-MiniDs non transposés, attendues à ~450 et ~700 pb pour Mbol et Hin1II respectivement.

Enfin, après purification des PCR sur colonnes (Macherey-Nagel NucleoSpin Gel and PCR Clean-up), les quantités d'ADN sont mesurées au Nanodrop. Sur l'ensemble de nos expériences nous avons obtenu des concentrations comprises entre 400 et 600 ng/µL.

Les échantillons sont ensuite séquencés à la plateforme de séquençage de l'ICM, en utilisant la cartouche NextSeq 500 Mid Output Kit V2 (150 cycles) de 130 millions de *reads* en

paired-end 75 pb, ainsi que l'amorce de séquençage notée 688_minidsSEQ1210 et l'amorce pour séquencer le barcode Custom_index1 (Tab.6).

Tableau 7. Séquences des amorces de séquençage.

Nom de l'amorce	Séquence 5'-3'
688_minidsSEQ1210	TTTACCGACCGTTACCGACCGTTTTCATCCCTA
Custom_index1	GGTTTTCGATTACCGTATTTATCCCGTTCGTTTCGT

* * *

Malgré les multiples optimisations apportées, le taux de succès de l'obtention d'un génome saturé en transposons a été de ½ en moyenne pour ces souches. Un point important dans la complexité de ces expériences est l'instabilité des plasmides et des souches. Le plasmide pBK625, de même que le plasmide pBK549, a tendance à se recombiner avec la transposase d'*Escherichia coli* lors de la transformation bactérienne, par homologies de séquences. Ces recombinaisons privent le plasmide de la transposase et d'une partie du gène *LEU2*, le rendant inapte à générer des cellules Leu+ par la suite. Le profil attendu d'un plasmide non recombiné est présenté en (Fig. 19). Quant à l'instabilité des souches, elle provoque un fort taux de fuite de transposition en l'absence de toute induction, sur des souches conservées à 4°C ou même congelées, quelques mois seulement après leur transformation (Fig. 20), obligeant la création de nouvelles souches à chaque début d'expérience.



Figure 19. Profils de digestion par EcoRV du plasmide pBK625. Gel d'agarose 0,8%. 0,5 μg de GeneRuler 1 kb Plus, 2 μL d'échantillon déposé. Les puits 1 à 5 contiennent 1 μg de plasmide pBK625 provenant de différent extractions miniprep digéré par EcoRV (ThermoFisher Scientific). Tailles attendues : 6248 pb, 2166 pb, 1905 pb.



Figure 20. Comparaison de la capacité de croissance sur milieu *drop-out* -LEU des souches nouvelles transformées et des souches stockées à 4°C et -70°C pendant plusieurs mois. Les photos ont été prises après 2-3 jours d'incubation à 23°C.

Par ailleurs, dans le cadre d'un autre projet de recherche, j'ai appliqué ce protocole sur des souches de levures à chromosome unique linéaire ou circulaire. Malgré l'utilisation d'une souche témoin W303 ou BY4742, mes trois tentatives ont échouées. Les raisons d'échec de cette expérience complexe ne nous sont pas encore tout à fait claires et semblent être multiples, pouvant intervenir à la fois au cours des multiples étapes de cultures ou lors de la préparation des ADN génomiques.

Discussion

Ì

o,°

Ø

R

وم

U N

Discus



Figure 21. Les rôles de Cdc5 dans le cycle cellulaire et les facteurs impliquées dans l'adaptation au dommage à l'ADN. En bleu foncé sont les rôles de Cdc5 connus de la littérature, ainsi que sa localisation dans la cellule. En nuages gris sont les voies métaboliques et complexes ayant un rôle dans l'adaptation, déjà connus de la littérature. En nuages bleu clair sont les voies et complexes pour lesquels nous avons révélé une implication dans l'adaptation au dommage à l'ADN, en lien ou non de Cdc5.

Cette partie démarre par une discussion sur notre approche expérimentale, puis sera suivie par une analyse de la complexité de l'adaptation au dommage à l'ADN à la lumière de nos résultats majeurs, avant de conclure sur l'ensemble de ce manuscrit.

1. Cribler les mutants d'adaptation par des méthodes indirectes

Mener un crible spécifique révélant des mutants déficients en adaptation est une tâche complexe, car le phénotype que l'on souhaite analyser est l'absence de croissance. Heureusement, nous avons la chance de disposer d'un mutant ponctuel qui semble exclusivement déficient en adaptation, cdc5-ad (Toczyski et al., 1997) (article 2), nous permettant à la place d'étudier les phénotypes capables de restaurer l'adaptation, et donc d'analyser les populations de mutants viables. Le crible global que nous avons mené sur ce mutant à l'échelle du génome entier nous permet de chercher des gènes impliqués dans l'adaptation sans aucun biais issu de la littérature ou de notre compréhension de l'adaptation - hormis le fait que nous réalisons l'étude sur cdc5-ad. La capacité de ce crible à fournir des informations concernant l'entièreté des processus moléculaires ayant lieu au cours de l'expérience réside en son caractère saturé en insertions de transposons dans tout le génome (Michel et al., 2017). Mais un tel crible fait aussi ressortir des processus non spécifiques de l'adaptation qu'il faut donc savoir discriminer, et c'est peut-être là une étape où l'on risque de perdre l'intérêt d'une méthode sans biais de connaissance. Nous avons déjà proposé un certain nombre d'analyses et d'hypothèses concernant nos résultats, mais nous n'avons encore analysé qu'une partie de nos données. Une des études que nous aurions souhaité ajouter est l'implication des régions intergéniques dans l'adaptation au dommage à l'ADN, en cherchant par exemple des régions non codantes dans lesquelles le nombre de transposons insérés évoluerait de manière significative chez les cellules capables de restaurer l'adaptation chez cdc5-ad. Les données obtenues par nos cribles renferment encore beaucoup d'informations insoupçonnées et pourront servir de base à de futures investigations.

Les analyses menées sur les données issues de nos cribles ont parfois donné des résultats difficiles à interpréter. Lorsque nous avons conceptualisé l'expérience, nous nous attendions à retrouver un certain nombre de témoins correspondant à des mutants du *checkpoint* de dommage à l'ADN (*rad53, chk1, rad9, bfa1*), qui auraient été enrichis dans notre

crible en supprimant l'arrêt en G2/M. Or nous avons observé, à l'inverse, que ces mutants sont globalement appauvris, à la fois en *reads* et en transposons. Cet appauvrissement peut s'expliquer néanmoins très simplement : des cellules ayant des dommages irréparables fortement cytotoxiques sont plus susceptibles de mourir si la progression de leur cycle cellulaire est maintenue. Cette possibilité de pouvoir apporter une explication cohérente quel que soit le résultat obtenu, a rendu l'interprétation de nos résultats parfois ardue, mais nous a aussi poussés à trouver des indicateurs de robustesse plus convaincants, par exemple en recherchant des complexes constitués de gènes au comportement cohérent et en s'appuyant sur des variations statistiquement significatives.

Concernant les enrichissements, nous nous attendions à observer un nombre de transposons stable entre les différents temps de l'expérience d'adaptation, puisque la transposition se fait en amont de l'adaptation et qu'une fois inséré le transposon est maintenu au même endroit dans le génome. Nous avions donc prévu de focaliser nos observations sur les enrichissements en *reads* seuls. Or nous nous sommes rendu compte que le nombre de transposons ressortant au séquençage variait tout autant que le nombre de reads, et que leurs fluctuations étaient en général corrélées positivement. Ce phénomène peut être expliqué de plusieurs façons. D'une part, la perte de sites de transposons entre deux temps de l'expérience peut être due à l'échantillonnage, puisque nous ne séquençons qu'une très faible partie de la quantité d'ADN totale. D'autre part la corrélation entre *reads* et transposons peut être due à la sensibilité du séquenceur, puisque plus il y a de *reads* pour un transposon plus celui-ci a de chances d'être détecté. Un point intéressant qui ressort de ces expériences est que les paramètres considérés pour chaque analyse changent drastiquement la liste des gènes obtenus : très peu de gènes sont communs à la liste des gènes enrichis en reads d'un facteur 1.5 pour tous les transposons, à la liste des gènes enrichis en reads d'un facteur 1.5 pour les transposons en communs entre 3 heures et 24 heures, ou à la liste des gènes enrichis en transposons du même facteur. Et pourtant, des gènes impliqués dans les mêmes complexes ressortent d'une liste à l'autre, nous amenant à considérer que ces analyses, au lieu d'être excluantes les unes par rapport aux autres, apportent au contraire chacune des éléments cohérents dans leur ensemble, et qui nous ont permis d'obtenir les différents résultats qui seront résumés dans la partie suivante.

Nous avons aussi travaillé à la conception d'un protocole pour conduire un autre crible des mutants d'adaptation, mais cette fois-ci directement sur *CDC5*, en effectuant une PCR génératrice d'erreurs sur la séquence du gène *CDC5* et en comparant la croissance des mutants obtenus sur boîtes soumises à une expérience de *microcolony assay*. La conduite de ce protocole nécessite un travail minutieux de repiquage et de séquençage des mutants obtenus pour caractériser les mutations impactant l'adaptation. Ce crible pourrait révéler de nouveaux mutants d'adaptation de *cdc5*, donnant des indices sur les sites précis de *CDC5* spécifiquement impliqués dans l'adaptation.

2. L'adaptation au dommage à l'ADN est un mécanisme extrêmement complexe

La complexité de l'adaptation sera discutée ici, d'abord de manière indépendante de Cdc5 puis liée à l'activité de Cdc5. Cette partie sera aussi l'occasion de discuter de l'intrigante dégradation de Cdc5 au cours de l'adaptation et de vous proposer un modèle de régulation de l'adaptation au dommage à l'ADN.

2.1. L'adaptation concerne de multiples voies métaboliques

Le *checkpoint* de dommage à l'ADN se situe à l'intersection entre les mécanismes de progression du cycle cellulaire et ceux de signalisation d'un dommage. Il enclenche l'arrêt d'un ensemble de voies métaboliques impliquées dans la progression du cycle cellulaire, et maintient cet arrêt tant que la signalisation du dommage est activée.

Bien qu'il soit très contrôlé, le *checkpoint* de dommage à l'ADN présente en réalité un certain nombre de propriétés qui permettent la reprise du cycle cellulaire malgré la persistance du dommage, en enclenchant l'adaptation au dommage à l'ADN.

L'étude des mutants d'adaptation a permis de révéler l'implication d'un nombre impressionnant de facteurs – par ailleurs connus pour leurs fonctions indépendantes de l'adaptation –, régulant la capacité des cellules à s'adapter. En analysant de manière globale l'ensemble des résultats fournis par la littérature, nous avons exploré, à travers l'introduction de ce manuscrit, les différents aspects de l'adaptation, qui incluent la déphosphorylation et la déacétylation de Rad53 (Leroy et al., 2003; Memisoglu et al., 2019; Sun, 1998; Tao et al., 2013; Toczyski et al., 1997; Vaze et al., 2002; Vidanes, 2010) ; l'amplitude de la résection au site du dommage (Clerici et al., 2006b; Clifford et al., 2008; Lee et al., 2001; Leroy et al., 2003; Mimitou, 2010) ; les modifications de la chromatine (Eapen et al., 2012; Nakanishi et al., 2009) ; la perturbation des dynamiques de séquestration et de dégradation des protéines mitotiques et des protéines impliquées dans la ségrégation des chromosomes (Dotiwala et al., 2013; Eapen and Haber, 2013); et les changements d'expression de gènes en réponse au dommage à l'ADN (Edenberg et al., 2014; Yelamanchi et al., 2014). Parmi les gènes concernés par ces changements d'expression se trouvent ceux du cluster CLB2, réprimé en réponse à une lésion de l'ADN. En forçant son expression dans un contexte de dommage persistant, nous avons découvert que l'augmentation de l'expression des gènes du cluster CLB2 favorise grandement l'adaptation, et ce de manière indépendante de Cdc5 qui en fait pourtant partie (article 1) (Coutelier et al., 2021) (Fig. 21). Ce résultat est renforcé par un ensemble de gènes du cluster que nous avons retrouvés impliqués dans le contournement du défaut d'adaptation de cdc5-ad (article 2). L'expression de ce cluster est régulée par le complexe Mcm1-Fkh2-Ndd1, et il s'est avéré que le gène FKH2 est ressorti enrichi dans notre crible, que ce soit en nombre de reads ou de transposons (article 2). Ce résultat peut paraître étonnant, puisque la délétion de FKH2 diminue le niveau de ARNm du cluster CLB2 (Hollenhorst et al., 2000), mais il renforce néanmoins l'importance du rôle de la régulation du cluster CLB2 dans l'adaptation au dommage à l'ADN.

Alors que nous avons focalisé nos recherches sur le rôle de Cdc5 dans l'adaptation, dont nous parlerons plus loin, c'est en investiguant son implication que nous avons révélé un certain nombre de voies et facteurs impliqués dans l'adaptation sans lien direct avec Cdc5. Parmi les facteurs concernés se trouvent les phosphatases PP2A Cdc55 et Rts1, qui jouent chacune des effets opposés sur l'adaptation, respectivement négatif et positif (article 1) (Coutelier et al., 2021) (Fig. 21). Ces protéines participent à la cytokinèse, à l'inhibition de la voie FEAR et à la transition G1/S, ajoutant ainsi autant de voies potentiellement impliquées dans l'adaptation au dommage à l'ADN, et dont il faut désormais vérifier l'implication réelle. Pour pouvoir caractériser les mécanismes d'action des PP2A dans l'adaptation, nous pourrions commencer par chercher les facteurs par lesquels Cdc55 défavorise l'adaptation en vérifiant si des phosphomimétiques de ses substrats (Chs2 et Net1 par exemple, en mutant les sites de phosphorylation en acide glutamique, Fig. 21) auraient le même effet que la délétion de Cdc55. Concernant le rôle de Rts1 dans l'adaptation, nous pourrons tester l'implication des substrats connus de Rts1 dans l'adaptation en réalisant des *microcolony assay* sur des mutants de délétion de ses substrats.

*

Nos recherches ont donc apporté des preuves supplémentaires de la multiplicité des voies métaboliques et des facteurs concernés par l'adaptation au dommage à l'ADN indépendamment de Cdc5, en révélant que PP2A et les gènes mitotiques du cluster *CLB2* ont un rôle important dans ce processus.

2.2. Cdc5 tient une place centrale dans l'adaptation en interagissant avec un grand nombre de facteurs

Une des constatations majeures de l'introduction de ce manuscrit, c'est à quel point Cdc5 est omniprésente tout au long du cycle cellulaire et même en réponse à un dommage à l'ADN, interagissant avec un nombre impressionnant de facteurs.

Malgré les nombreuses fonctions bien caractérisées de Cdc5 au cours du cycle cellulaire, les mécanismes par lesquels Cdc5 permet aux cellules de s'adapter restent hypothétiques. Il semblerait que l'adaptation en lien avec Cdc5 dépende d'un ensemble de facteurs, telle que la localisation de Cdc5 (Nakashima, 2008; Ratsima et al., 2016; Rawal et al., 2016), la désactivation Cdc5-dépendante de Rad53 potentiellement *via* Mec1 (Donnianni et al., 2010; Melo et al., 2001; Pellicioli et al., 2001), l'activation Cdc5-dépendante de la protéolyse opérée par APC/C-Clb2, le rôle de Cdc5 en sortie de mitose, le bon fonctionnement de son activité kinase et de son domaine PBD (Ratsima et al., 2016), la quantité de Cdc5 (Vidanes, 2010), ou encore son état de phosphorylation (Rawal et al., 2016; Rodriguez-Rodriguez, 2016).

Nous avons pu atteindre l'objectif que nous nous étions fixés de révéler des substrats de Cdc5 spécifiques de l'adaptation au dommage à l'ADN (article 2). Parmi les substrats trouvés, certains sont impliqués dans des complexes connus comme ayant des rôles en réponse à un dommage à l'ADN, et d'autres substrats s'avèrent être les sous-unités d'un même complexe, renforçant la robustesse de nos découvertes.

Par ailleurs, la littérature apporte de nombreuses preuves de la régulation fine du cycle cellulaire par des événements de phosphorylations et de déphosphorylations coordonnés, notamment en réponse à un dommage à l'ADN. Cdc5 elle-même est régulée par son état de phosphorylation. Nous avons donc cherché à déceler les régulations propres à l'adaptation et à comprendre comment les modifications post-traductionnelles de Cdc5 sont impliquées dans ce processus. Nous sommes parvenus à mettre en évidence que Cdc5 est phosphorylée de manière spécifique en réponse à un dommage à l'ADN et que certains sites de phosphorylation ont un effet positif sur l'adaptation. Le niveau protéique de Cdc5 en réponse à un dommage est quant à lui régulé négativement, fait étonnant qui sera discuté ci-après. Nous avons cependant rencontré des obstacles dans la création des souches permettant la réalisation de cette expérience difficultés techniques qui pourront je pense être surmontées pour enfin mener à bien cette expérience. De façon fortuite, alors que nous souhaitions observer l'effet de l'inhibition de la dégradation de Cdc5 sur la cinétique d'adaptation, nous avons découvert que la dégradation de Cdc5 en réponse à un dommage à l'ADN ne se fait pas selon les voies canoniques décrites dans la littérature et restent donc à caractériser (Arnold et al., 2015; Charles, 1998). Nos études permettent toutefois de confirmer l'implication du protéasome et de proposer un certain nombre de candidats potentiels jouant un rôle à la fois dans des processus de protéolyse et dans l'adaptation (article 2) (Fig. 21). Par la suite, nous pourrons plus précisément étudier les mécanismes de dégradation de Cdc5 en réponse à un dommage persistant, en mutant les ubiquitines ligases pour tenter d'observer une stabilisation des niveaux protéigues de Cdc5.

Nous sommes parvenus à caractériser les régulations de Cdc5 en réponse à un dommage persistant et avons révélés l'implication de complexes non soupçonnés (Cvt, GARP, Cytochrome C, MRX) dans l'adaptation au dommage à l'ADN en lien avec les rôles de Cdc5 (Fig. 21). Ces complexes pourront faire l'objet d'études plus approfondies pour élucider les mécanismes par lesquels ils permettent l'adaptation, après avoir vérifié les phénotypes d'adaptation des mutants de délétion correspondants par des méthodes standards de *microcolony assay*, comme nous l'avons fait pour le complexe MRX. Les expériences menées

ensuite seront spécifiques de chaque complexe : on pourra par exemple étudier la localisation du complexe par rapport à Cdc5 en réponse à un dommage par des méthodes de microscopie à fluorescence ; ou chercher des interactions protéine-protéine et ADN-protéine en lien avec Cdc5, par *pull-down* ou ChIP, notamment pour regarder si Cdc5 est spécifiquement recrutée au niveau d'un dommage à l'ADN.

2.3. Cdc5 est dégradée au cours de l'adaptation selon des voies non canoniques, tout en étant essentielle à ce processus

Etonnement, alors que Cdc5 est essentielle à l'adaptation, son niveau protéique en réponse à un dommage est régulé négativement. Plusieurs hypothèses sont proposées cidessous pour expliquer ce phénomène intrigant.

Il a été montré qu'en l'absence de dommage, Cdc5 est capable d'assurer ses différentes fonctions en fin de division cellulaire, même en réduisant son activité de 98%, laissant supposer que Cdc5 est en quantité excessive en fin de cycle (Ratsima et al., 2011). Or de telles quantités pourraient entraver l'arrêt au *checkpoint* de dommage à l'ADN : nous avons d'ailleurs montré qu'en surexprimant *CDC5* en réponse à un dommage, l'adaptation est accélérée, preuve d'un temps d'arrêt en G2/M réduit. Dans cette hypothèse, les quantités de Cdc5 restantes au cours de l'adaptation seraient suffisantes pour enclencher les mécanismes d'adaptation, même après 8 à 12 heures d'arrêt.

Une autre explication possible serait que Cdc5 joue son rôle décisif dans l'adaptation de manière ponctuelle : Cdc5 interviendrait par exemple en début d'arrêt, lorsque ses niveaux protéiques sont encore hauts. Cette hypothèse pourrait être testée *via* un protocole que nous avons déjà mis au point et pour lequel nous avons commencé à construire les souches, permettant d'induire la dégradation de Cdc5 à différents temps de l'adaptation pour déceler le moment précis de l'adaptation où Cdc5 jouerait son rôle déterminant – à supposer qu'un tel rôle ponctuel existe. Les résultats de cette expérience apporteront une précision temporelle du rôle de Cdc5 : si la dégradation de Cdc5 se fait avant l'accomplissement de son rôle dans l'adaptation, les cellules ne s'adapteront pas, tandis que si sa dégradation survient après, les cellules activeront irrémédiablement les mécanismes d'adaptation. En induisant la dégradation de Cdc5 à plusieurs moments de l'adaptation, entre 0 et 24 heures, nous

pourrons connaitre à quel instant exactement Cdc5 enclencherait de manière irréversible les mécanismes d'adaptation. Grâce à cette indication temporelle, nous pourrons discriminer des substrats spécifiquement exprimés à ce moment précis de l'adaptation, affinant notre connaissance des gènes potentiellement impliqués dans l'adaptation au dommage à l'ADN.

Il se pourrait par ailleurs que l'adaptation soit permise, à l'échelle de la cellule unique, par une augmentation transitoire des quantités de Cdc5 au moment de l'adaptation. Cette hypothèse pourrait être testée en quantifiant la fluorescence émise par Cdc5 tagguée à l'échelle d'une cellule unique jusqu'à l'adaptation. Des tentatives ont été menées par l'équipe, mais la difficulté du choix d'un marqueur fluorescent approprié reste à surmonter pour permettre la détection des faibles taux protéiques de Cdc5 tout en minimisant la phototoxicité liée au temps d'acquisition. Dans le cas où il s'agirait d'un pic d'activité et non de quantité, on pourrait s'inspirer d'un système existant pour Plk1, basé sur un biosenseur FRET permettant l'émission d'une fluorescence lorsque Cdc5 exercerait son activité kinase (Macůrek et al., 2008).

* * *

L'introduction de ce manuscrit nous a fourni une première appréciation de la complexité de l'adaptation, que nous avons ensuite développée dans l'article 1, en révélant l'implication de nouveaux facteurs liés ou non à Cdc5. Dans l'article 2 nous avons commencé à caractériser les grandes voies potentiellement impliquées dans l'adaptation et propres à Cdc5-ad. Au fur et à mesure que nous progressons dans la compréhension des mécanismes d'adaptation au dommage à l'ADN, nous ne cessons d'être impressionnés par le nombre de voies métaboliques impliquées, et par la complexité de ce mécanisme. A la lumière de ce que nous connaissons aujourd'hui, peut-être le terme unique d'adaptation ne concerne pas une seule voie de signalisation, mais reflète plutôt un phénotype global caractérisant des cellules endommagées de manière permanente parvenant néanmoins à reprendre leur division cellulaire après un arrêt au *checkpoint* G2/M. Sous ce nouvel angle de vue, l'adaptation serait l'aboutissement d'un ensemble de mécanismes indépendants les uns des autres, mais dont une partie significative requiert l'action de Cdc5. La coordination de l'ensemble de ces mécanismes semble nécessaire à la reprise du cycle cellulaire, et Cdc5 semble orchestrer cette coordination.

Malgré nos avancées, le mutant *cdc5-ad* continue de nous intriguer : le mécanisme précis par lequel il empêche l'adaptation n'est toujours pas complètement élucidé.

2.4. Proposition d'un modèle liant les complexes cohésine, MRX et APC/C



Figure 22. Hypothèse de la régulation de l'adaptation par la cohésine de manière MRX- et APC/C-dépendante. En bleu est indiqué ce qui est connu dans la littérature (énoncé dans le texte) et en orange ce qui est issu de nos analyses.

Parmi les voies que nous avons révélées comme étant impliquées dans l'adaptation au dommage à l'ADN, certaines apparaissent potentiellement connectées dans la littérature, ce qui m'a amenée à proposer une hypothèse attrayante : la régulation de la cohésine de manière dépendante de MRX et d'APC/C en réponse à l'arrêt au *checkpoint* G2/M favoriserait l'adaptation, et Cdc5 serait le facteur commun à tous ces processus (Fig. 22).

Le facteur associé à MRX, Sae2, est connu pour interagir avec Cdc5, et l'orthologue de Cdc5, Plk1, interagit avec Mre11 (Donnianni et al., 2010; Li et al., 2017). Le complexe MRX-Sae2 est recruté au niveau du site du dommage. L'interaction Plk1-CtIP – orthologue de Sae2 – promeut la réparation par MMEJ en favorisant la résection et inactive le *checkpoint* G2/M. Quant à l'interaction Plk1-Mre11, elle permet de délocaliser MRN du site du dommage et d'éteindre prématurément le *checkpoint* de dommage à l'ADN (Li et al., 2017; Wang et al.,

2018). Nos données indiquent que les sous-unités Xrs2 et Mre11 de MRX sont impliquées dans l'adaptation de manière dépendante de Cdc5 (article 2). En s'appuyant sur l'ensemble de ces résultats, nous postulons que Cdc5 interagit directement avec Mre11, et que cette interaction, en plus de celle avec Sae2, permettrait à Cdc5 d'être recrutée au niveau du site du dommage (Fig. 22). Ce recrutement pourrait favoriser l'extinction de la signalisation du checkpoint, soit en délocalisant MRX – à l'image de l'interaction Plk1-Mre11 –, soit en permettant le MMEJ – à l'image de Plk1-CtIP. D'ailleurs l'adaptation peut aussi être vue comme un moyen pour la cellule de solliciter d'autres voies de réparations que celles possibles en phase G2/M, en permettant l'entrée dans d'autres phases du cycle cellulaire. Cdc5-ad pourrait alors être déficient dans son interaction avec Mre11 et Sae2, l'empêchant de désactiver le checkpoint, hypothèse vérifiable en étudiant le niveau de phosphorylation de MRX-Sae2 en présence de Cdc5 sauvage ou Cdc5-ad, par Western blot si la différence de phosphorylation change suffisamment la migration électrophorétique, ou par spectrométrie de masse ce qui permettrait d'identifier précisément les sites de phosphorylation. L'interaction directe Mre11-Cdc5 pourrait être vérifiée par des méthodes in vitro ou de double-hybride, et les sites spécifiques d'interaction pourraient être décelés en étudiant des portions de ces protéines et en se basant sur le site de phosphorylation connu de Mre11 par Plk1 (Li et al., 2017).

D'autre part, Cdc5 interagit directement avec Scc1, une sous-unité de la cohésine (Alexandru et al., 2001) (Fig. 22). La cohésine est un complexe maintenant les chromatides sœurs ensemble, recruté au site du dommage grâce au facteur de liaison Scc4 et à la protéine du kinétochore Mif2, tous deux impliqués dans l'adaptation au dommage à l'ADN (article 2) (Ünal et al., 2004; Wu and Yu, 2012). Par ailleurs, Cdc5 régule négativement la cohésine en phosphorylant Cse4 ce qui permet l'inhibition de la sous-unité Scc1 (Mishra et al., 2019). D'après nos analyses (article 2), Scc1 semble directement impliquée dans l'adaptation au dommage à l'ADN, de même que Rec8, une autre sous-unité de la cohésine et qui joue le même rôle en méiose que Scc1 en mitose, à savoir la stabilisation des sous-unités de la cohésine (Sakuno and Hiraoka, 2022). L'ensemble de ces données suggèrent que la cohésine joue un rôle déterminant dans l'adaptation en empêchant la progression du cycle cellulaire : l'interaction Cdc5-cohésine pourrait d'une part entraver la séparation des chromatides sœurs sur l'ensemble du génome, mais pourrait aussi refléter un mécanisme supplémentaire spécifique du site du dommage à l'ADN.

Il s'avère que la délétion de la sous-unité Rec8 de la cohésine produit le même phénotype que la délétion de la sous-unité Mnd2 du complexe APC/C, induisant une perte de cohésion des chromatides sœurs (Penkner et al., 2005). Mnd2 est d'ailleurs requise pour le maintien de la cohésine (Oelschlaegel et al., 2005). Or à la fois REC8 et MND2 semblent impliquées dans l'adaptation au dommage à l'ADN d'après nos analyses (article 2), ce qui nous amène à proposer qu'un des rôles majeurs d'APC/C dans la promotion de l'adaptation concernerait sa fonction dans le recrutement de la cohésine. Nous pourrions tester le phénotype d'adaptation en microcolony assay du double mutant Δmnd2 Δrec8. Rec8 est inhibée par la séparase Esp1 (Fig. 22). Cdc5 a été décrite comme formant un complexe avec Esp1 (Rahal and Amon, 2008). Ces deux protéines favorisent le FEAR, mais leur interaction joue un rôle plus tôt dans le cycle cellulaire en permettant la transition métaphase-anaphase. L'ensemble de ces informations permet de suggérer que l'interaction directe entre Cdc5 et Esp1 induirait la déstabilisation de la cohésine et favoriserait l'adaptation. Esp1 elle-même est inhibée par la sécurine Pds1, dont la dégradation permet l'activation de Esp1. Pds1 est activée par Cdc55 (Khondker et al., 2020), ce qui est cohérent avec l'effet limitant de Cdc55 sur l'adaptation que nous avons observé dans l'article 1. Pds1 est par ailleurs inhibée par la sousunité Cdc20 du complexe APC/C, complexe dont la sous-unité Mnd2 a quant à elle l'effet contraire puisqu'elle inhibe l'interaction entre Cdc20 et Pds1. La régulation de la cohésine par APC/C semble donc avoir deux fonctions, l'une inhibitrice et l'autre activatrice, permettant ou non la ségrégation des chromosomes et donc l'adaptation. Un test des phénotypes d'adaptation en microcolony assay de mutants viables de cdc20 et mnd2 permettrait de vérifier cette double régulation. Nous suggérons que Cdc5 serait recrutée au site du dommage par la cohésine et déstabiliserait la cohésine au niveau du site du dommage et que Cdc5-ad serait déficient dans cette activité. Mais l'interaction entre Cdc5 et la cohésine concerne aussi la cohésine présente sur le génome entier, d'autant que des analyses de ChIP ont révélé que Cdc5 est elle aussi recrutée sur l'ensemble du génome (Mishra et al., 2016b; Pakchuen et al., 2016). La mise en évidence d'un recrutement accentué de Cdc5 au niveau de la cohésine du site du dommage pourrait constituer une première étape de la validation des hypothèses présentées ici.

Dans l'ensemble, nos analyses en regard de la littérature nous permettent de postuler que l'état de la cohésine est déterminant pour l'adaptation au dommage à l'ADN, et que sa régulation dépendrait de Cdc5, MRX et APC/C. Nous proposons aussi que Cdc5 permettrait la délocalisation de MRX du site du dommage et la dégradation de la cohésine en cet endroit, désactivant la signalisation du *checkpoint* et promouvant l'adaptation (Fig. 22).

3. Conclusion

Nos travaux au cours de ces 3 ans de thèse ont permis d'apporter de nouveaux éléments caractérisant l'adaptation au dommage à l'ADN ainsi que les rôles et régulations de Cdc5 spécifiques à ce processus. Cdc5 est régulée de manière spécifique de l'adaptation, au niveau post-traductionnel par les phosphatases PP2A entre autres, et au niveau transcriptionnel par Mcm1-Fkh2-Ndd1 et Rad53 au sein du cluster *CLB2* dont la régulation impacte l'adaptation. Par ailleurs, nous avons révélé que le complexe MRX est impliqué dans l'adaptation, selon un mécanisme qui semble lié à Cdc5. D'autres complexes et voies directement liés à Cdc5 ou non semblent également jouer un rôle dans l'adaptation, tels que le complexe APC/C, la cohésine, les voies Cvt, GARP et TORC1 (Fig. 21).

Dans son ensemble, ce manuscrit véhicule un message clair : l'adaptation est un phénomène d'une grande complexité, impliquant une diversité surprenante de mécanismes et de facteurs (Fig. 21). L'étude de l'adaptation de manière globale s'apparente donc à un travail de titan, et pourrait être poursuivie par la suite en isolant un complexe pour démêler son implication spécifique, et élucider ainsi une des voies impliquées dans l'adaptation. En répétant cette méthode sur d'autres complexes, nous parviendrons à établir une cartographie précise de l'implication de chaque facteur dans le processus d'adaptation au dommage à l'ADN.

Références

0

Õ

000000

Ω

Ø

Ro

0

٥h

IO

0

þ

0

0

0

0

0

0

9 0 10

0

g

0

5

2000

U N

Référe

Alexandrov, L.B., Ju, Y.S., Haase, K., Van Loo, P., Martincorena, I., Nik-Zainal, S., Totoki, Y., Fujimoto, A., Nakagawa, H., Shibata, T., Campbell, P.J., Vineis, P., Phillips, D.H., Stratton, M.R., 2016. Mutational signatures associated with tobacco smoking in human cancer. Science 354, 618–622. https://doi.org/10.1126/science.aag0299

Alexandru, G., Uhlmann, F., Mechtler, K., Poupart, M.-A., Nasmyth, K., 2001. Phosphorylation of the Cohesin Subunit Scc1 by Polo/Cdc5 Kinase Regulates Sister Chromatid Separation in Yeast. Cell 105, 459–472. https://doi.org/10.1016/S0092-8674(01)00362-2

Almawi, A.W., Langlois-Lemay, L., Boulton, S., Rodríguez González, J., Melacini, G., D'Amours, D., Guarné, A., 2020. Distinct surfaces on Cdc5/PLK Polo-box domain orchestrate combinatorial substrate recognition during cell division. Sci Rep 10, 3379. https://doi.org/10.1038/s41598-020-60344-4

Amigoni, L., Colombo, S., Belotti, F., Alberghina, L., Martegani, E., 2015. The transcription factor Swi4 is target for PKA regulation of cell size at the G1 to S transition in Saccharomyces cerevisiae. Cell Cycle 14, 2429–2438. https://doi.org/10.1080/15384101.2015.1055997

Archambault, V., Carmena, M., 2012. Polo-like kinase-activating kinases. Cell Cycle 11, 1490–1495. https://doi.org/10.4161/cc.19724

Archambault, V., D'Avino, P.P., Deery, M.J., Lilley, K.S., Glover, D.M., 2008. Sequestration of Polo kinase to microtubules by phosphopriming-independent binding to Map205 is relieved by phosphorylation at a CDK site in mitosis. Genes Dev 22, 2707–2720. https://doi.org/10.1101/gad.486808

Archambault, V., Lépine, G., Kachaner, D., 2015. Understanding the Polo Kinase machine. Oncogene 34, 4799–4807. https://doi.org/10.1038/onc.2014.451

Argunhan, B., Leung, W.-K., Afshar, N., Terentyev, Y., Subramanian, V.V., Murayama, Y., Hochwagen, A., Iwasaki, H., Tsubouchi, T., Tsubouchi, H., 2017. Fundamental cell cycle kinases collaborate to ensure timely destruction of the synaptonemal complex during meiosis. EMBO J 36, 2488–2509. https://doi.org/10.15252/embj.201695895

Arnold, L., Höckner, S., Seufert, W., 2015. Insights into the cellular mechanism of the yeast ubiquitin ligase APC/C-Cdh1 from the analysis of in vivo degrons. MBoC 26, 843–858. https://doi.org/10.1091/mbc.E14-09-1342

Asano, S., Park, J.-E., Sakchaisri, K., Yu, L.-R., Song, S., Supavilai, P., Veenstra, T.D., Lee, K.S., 2005. Concerted mechanism of Swe1/Wee1 regulation by multiple kinases in budding yeast. EMBO J 24, 2194–2204. https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600683

Attner, M.A., Miller, M.P., Ee, L., Elkin, S.K., Amon, A., 2013. Polo kinase Cdc5 is a central regulator of meiosis I. Proceedings of the National Academy of Sciences 110, 14278–14283. https://doi.org/10.1073/pnas.1311845110

Azzam, 2004. Phosphorylation by Cyclin B-Cdk Underlies Release of Mitotic Exit Activator Cdc14 from the Nucleolus. https://www.science.org/doi/abs/10.1126/science.1099402

Bardin, A.J., Amon, A., 2001. MEN and SIN: what's the difference? Nat Rev Mol Cell Biol 2, 815–826. https://doi.org/10.1038/35099020

Baro, B., Queralt, E., Monje-Casas, F., 2017. Regulation of Mitotic Exit in Saccharomyces cerevisiae, in: Monje-Casas, F., Queralt, E. (Eds.), The Mitotic Exit Network: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology. Springer, New York, NY, pp. 3–17. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6502-1_1

Barr, F.A., Silljé, H.H.W., Nigg, E.A., 2004. Polo-like kinases and the orchestration of cell division. Nat Rev Mol Cell Biol 5, 429–441. https://doi.org/10.1038/nrm1401

Beyer, T., Weinert, T., 2014. Mec1 and Tel1: an arresting dance of resection. EMBO J 33, 176–178. https://doi.org/10.1002/embj.201387440

Bonetti, 2015. Escape of Sgs1 from Rad9 inhibition reduces the requirement for Sae2 and functional MRX in DNA end resection. EMBO reports 16, 351–361. https://doi.org/10.15252/embr.201439764

Booher, R.J. Deshaies, M.W. Kirschner, 1993. Properties of Saccharomyces cerevisiae wee1 and its differential regulation of p34CDC28 in response to G1 and G2 cyclins. EMBO J. https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1993.tb06016.x

Booth, C., Griffith, E., Brady, G., Lydall, D., 2001. Quantitative amplification of single-stranded DNA (QAOS) demonstrates that cdc13-1 mutants generate ssDNA in a telomere to centromere direction. Nucleic Acids Research 29, 4414–4422. https://doi.org/10.1093/nar/29.21.4414

Bordelet, H., Dubrana, K., 2019. Keep moving and stay in a good shape to find your homologous recombination partner. Curr Genet 65, 29–39. https://doi.org/10.1007/s00294-018-0873-1

Botchkarev, V.V., Garabedian, M.V., Lemos, B., Paulissen, E., Haber, J.E., 2017. The budding yeast Polo-like kinase localizes to distinct populations at centrosomes during mitosis. Mol Biol Cell 28, 1011–1020. https://doi.org/10.1091/mbc.E16-05-0324

Botchkarev, V.V., Haber, J.E., 2018. Functions and regulation of the Polo-like kinase Cdc5 in the absence and presence of DNA damage. Curr Genet 64, 87–96. https://doi.org/10.1007/s00294-017-0727-2

Brewer, B.J., Chlebowicz-Sledziewska, E., Fangman, W.L., 1984. Cell cycle phases in the unequal mother/daughter cell cycles of Saccharomyces cerevisiae. Mol Cell Biol 4, 2529–2531. https://doi.org/10.1128/mcb.4.11.2529-2531.1984

Campos, A., Clemente-Blanco, A., 2020. Cell Cycle and DNA Repair Regulation in the Damage Response: Protein Phosphatases Take Over the Reins. International Journal of Molecular Sciences 21, 446. https://doi.org/10.3390/ijms21020446

Caydasi, A.K., Kurtulmus, B., Orrico, M.I., Hofmann, A., Ibrahim, B., Pereira, G., 2010. Elm1 kinase activates the spindle position checkpoint kinase Kin4. Journal of Cell Biology 190, 975–989. https://doi.org/10.1083/jcb.201006151.

Cerrito, M.G., Grassilli, E., 2021. Identifying Novel Actionable Targets in Colon Cancer. Biomedicines 9, 579. https://doi.org/10.3390/biomedicines9050579

Challa, K., Shinohara, M., Shinohara, A., 2019. Meiotic prophase-like pathway for cleavage-independent removal of cohesin for chromosome morphogenesis. Curr Genet 65, 817–827. https://doi.org/10.1007/s00294-019-00959-x

Chambers, A.L., Downs, J.A., 2012. The RSC and INO80 chromatin-remodeling complexes in DNA double-strand break repair. Prog Mol Biol Transl Sci 110, 229–261. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-387665-2.00009-2

Chang, Y.C., Lee, Y.S., Tejima, T., Tanaka, K., Omura, S., Heintz, N.H., Mitsui, Y., Magae, J., 1998. Mdm2 and bax, downstream mediators of the p53 response, are degraded by the ubiquitin-proteasome pathway. Cell Growth Differ 9, 79–84. PMID: 9438391

Charles, J.F., Jaspersen, S.L., Tinker-Kulberg, R.L., Hwang, L., Szidon, A., Morgan, D.O., 1998. The Polo-related kinase Cdc5 activates and is destroyed by the mitotic cyclin destruction machinery in S. cerevisiae. Current Biology 8, 497–507. https://doi.org/10.1016/S0960-9822(98)70201-5

Chatterjee, N., Walker, G.C., 2017. Mechanisms of DNA damage, repair, and mutagenesis. Environmental and Molecular Mutagenesis 58, 235–263. https://doi.org/10.1002/em.22087

Chen, S., Guttridge, D.C., You, Z., Zhang, Z., Fribley, A., Mayo, M.W., Kitajewski, J., Wang, C.-Y., 2001. WNT-1 Signaling Inhibits Apoptosis by Activating β -Catenin/T Cell Factor–Mediated Transcription. Journal of Cell Biology 152, 87–96. https://doi.org/10.1083/jcb.152.1.87

Cheng, L., Hunke, L., Hardy, C.F.J., 1998. Cell Cycle Regulation of the Saccharomyces cerevisiae Polo-Like Kinase Cdc5p. Mol. Cell. Biol. 18, 7360–7370. https://doi.org/10.1128/MCB.18.12.7360

Chi, X., Li, Y., Qiu, X., 2020. V(D)J recombination, somatic hypermutation and class switch recombination of immunoglobulins: mechanism and regulation. Immunology 160, 233–247. https://doi.org/10.1111/imm.13176

Chin, C.F., Bennett, A.M., Ma, W.K., Hall, M.C., Yeong, F.M., 2012. Dependence of Chs2 ER export on dephosphorylation by cytoplasmic Cdc14 ensures that septum formation follows mitosis. Mol Biol Cell 23, 45–58. https://doi.org/10.1091/mbc.E11-05-0434 Chung, W.-H., Zhu, Z., Papusha, A., Malkova, A., Ira, G., 2010. Defective Resection at DNA Double-Strand Breaks Leads to De Novo Telomere Formation and Enhances Gene Targeting. PLOS Genetics 6, e1000948. https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000948

Ciccia, A., Elledge, S.J., 2010. The DNA Damage Response: Making It Safe to Play with Knives. Molecular Cell 40, 179–204. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.09.019

Ciosk, R., Zachariae, W., Michaelis, C., Shevchenko, A., Mann, M., Nasmyth, K., 1998. An ESP1/PDS1 Complex Regulates Loss of Sister Chromatid Cohesion at the Metaphase to Anaphase Transition in Yeast. Cell 93, 1067–1076. https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81211-8

Clerici, 2014. Mec1/ATR regulates the generation of single-stranded DNA that attenuates Tel1/ATM signaling at DNA ends. The EMBO Journal 33, 198–216. https://doi.org/10.1002/embj.201386041

Clerici, M., Mantiero, D., Lucchini, G., Longhese, M.P., 2006. The Saccharomyces cerevisiae Sae2 protein negatively regulates DNA damage checkpoint signalling. EMBO Rep 7, 212–218. https://doi.org/10.1038/sj.embor.7400593

Clerici, M., Mantiero, D., Lucchini, G., Longhese, M.P., 2005. The Saccharomyces cerevisiae Sae2 Protein Promotes Resection and Bridging of Double Strand Break Ends. Journal of Biological Chemistry 280, 38631–38638. https://doi.org/10.1074/jbc.M508339200

Clifford, D.M., Chen, C.-T., Roberts, R.H., Feoktistova, A., Wolfe, B.A., Chen, J.-S., McCollum, D., Gould, K.L., 2008. The role of Cdc14 phosphatases in the control of cell division. Biochemical Society Transactions 36, 436–438. https://doi.org/10.1042/BST0360436

Cohen-Fix, O., Koshland, D., 1997. The anaphase inhibitor of Saccharomyces cerevisiae Pds1p is a target of the DNA damage checkpoint pathway. Proc Natl Acad Sci U S A 94, 14361–14366. https://doi.org/10.1073/pnas.94.26.14361

Costanzo, M., Nishikawa, J.L., Tang, X., Millman, J.S., Schub, O., Breitkreuz, K., Dewar, D., Rupes, I., Andrews, B., Tyers, M., 2004. CDK Activity Antagonizes Whi5, an Inhibitor of G1/S Transcription in Yeast. Cell 117, 899–913. https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.05.024

Coutelier, H., Ilioaia, O., Peillet, J.L., Hamon, M., D'Amours, D., Teixeira, M.T., Xu, Z., 2021. The Polo kinase Cdc5 is regulated at multiple levels in the adaptation response to telomere dysfunction. bioRxiv. https://doi.org/10.1101/2021.10.20.465143

Coutelier, H., Xu, Z., Morisse, M.C., Lhuillier-Akakpo, M., Pelet, S., Charvin, G., Dubrana, K., Teixeira, M.T., 2019. Corrigendum: Adaptation to DNA damage checkpoint in senescent telomerase-negative cells promotes genome instability. Genes Dev 33, 378. https://doi.org/10.1101/gad.324459.119

Coutelier, H., Xu, Z., Morisse, M.C., Lhuillier-Akakpo, M., Pelet, S., Charvin, G., Dubrana, K., Teixeira, M.T., 2018. Adaptation to DNA damage checkpoint in senescent telomerase-negative cells promotes genome instability. Genes Dev. 32, 1499–1513. https://doi.org/10.1101/gad.318485.118

Crasta, K., Huang, P., Morgan, G., Winey, M., Surana, U., 2006. Cdk1 regulates centrosome separation by restraining proteolysis of microtubule-associated proteins. EMBO J 25, 2551–2563. https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601136

Cross, N.L., Meizel, S., 1989. Methods for Evaluating the Acrosomal Status of Mammalian Sperm1. Biology of Reproduction 41, 635–641. https://doi.org/10.1095/biolreprod41.4.635

Daley JM, Palmbos PL, Wu D, Wilson TE. Nonhomologous end joining in yeast. Annu Rev Genet. 2005;39:431-51. doi: 10.1146/annurev.genet.39.073003.113340. PMID: 16285867.

D'Amours, D., Stegmeier, F., Amon, A., 2004. Cdc14 and Condensin Control the Dissolution of Cohesin-Independent Chromosome Linkages at Repeated DNA. Cell 117, 455–469. https://doi.org/10.1016/S0092-8674(04)00413-1

Darieva, Z., Bulmer, R., Pic-Taylor, A., Doris, K.S., Geymonat, M., Sedgwick, S.G., Morgan, B.A., Sharrocks, A.D., 2006. Polo kinase controls cell-cycle-dependent transcription by targeting a coactivator protein. Nature 444, 494–498. https://doi.org/10.1038/nature05339

Darieva, Z., Pic-Taylor, A., Boros, J., Spanos, A., Geymonat, M., Reece, R.J., Sedgwick, S.G., Sharrocks, A.D., Morgan, B.A., 2003. Cell Cycle-Regulated Transcription through the FHA Domain of Fkh2p and the Coactivator Ndd1p. Current Biology 13, 1740–1745. https://doi.org/10.1016/j.cub.2003.08.053

De Cárcer, G., Manning, G., Malumbres, M., 2011. From Plk1 to Plk5: Functional evolution of polo-like kinases. Cell Cycle 10, 2255–2262. https://doi.org/10.4161/cc.10.14.16494

De Cárcer, G., Venkateswaran, S.V., Salgueiro, L., El Bakkali, A., Somogyi, K., Rowald, K., Montañés, P., Sanclemente, M., Escobar, B., de Martino, A., McGranahan, N., Malumbres, M., Sotillo, R., 2018. Plk1 overexpression induces chromosomal instability and suppresses tumor development. Nat Commun 9, 3012. https://doi.org/10.1038/s41467-018-05429-5

De Munter, S., Köhn, M., Bollen, M., 2013. Challenges and opportunities in the development of protein phosphatase-directed therapeutics. ACS Chem Biol 8, 36–45. https://doi.org/10.1021/cb300597g

Dewar, J.M., Lydall, D., 2012. Similarities and differences between "uncapped" telomeres and DNA double-strand breaks. Chromosoma 121, 117–130. https://doi.org/10.1007/s00412-011-0357-2

Dewitte, W., Murray, J.A.H., 2003. The Plant Cell Cycle. Annual Review of Plant Biology 54, 235–264. https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.54.031902.134836

Dibitetto, D., Ferrari, M., Rawal, C.C., Balint, A., Kim, T., Zhang, Z., Smolka, M.B., Brown, G.W., Marini, F., Pellicioli, A., 2016. Slx4 and Rtt107 control checkpoint signalling and DNA resection at double-strand breaks. Nucleic Acids Research 44, 669–682. https://doi.org/10.1093/nar/gkv1080

Dobbelaere, J., Gentry, M.S., Hallberg, R.L., Barral, Y., 2003. Phosphorylation-Dependent Regulation of Septin Dynamics during the Cell Cycle. Developmental Cell 4, 345–357. https://doi.org/10.1016/S1534-5807(03)00061-3

Donnianni, R.A., Ferrari, M., Lazzaro, F., Clerici, M., Tamilselvan Nachimuthu, B., Plevani, P., Muzi-Falconi, M., Pellicioli, A., 2010. Elevated Levels of the Polo Kinase Cdc5 Override the Mec1/ATR Checkpoint in Budding Yeast by Acting at Different Steps of the Signaling Pathway. PLoS Genet 6, e1000763. https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000763

Dotiwala, F., Eapen, V.V., Harrison, J.C., Arbel-Eden, A., Ranade, V., Yoshida, S., Haber, J.E., 2013. DNA damage checkpoint triggers autophagy to regulate the initiation of anaphase. Proceedings of the National Academy of Sciences 110, E41–E49. https://doi.org/10.1073/pnas.1218065109

Dotiwala, F., Haase, J., Arbel-Eden, A., Bloom, K., Haber, J.E., 2007. The yeast DNA damage checkpoint proteins control a cytoplasmic response to DNA damage. Proc Natl Acad Sci U S A 104, 11358–11363. https://doi.org/10.1073/pnas.0609636104

Dotiwala, F., Harrison, J.C., Jain, S., Sugawara, N., Haber, J.E., 2010. Mad2 prolongs DNA damage checkpoint arrest caused by a double-strand break via a centromere-dependent mechanism. Curr Biol 20, 328–332. https://doi.org/10.1016/j.cub.2009.12.033

Doudna, J.A., Charpentier, E., 2014. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. Science 346, 1258096. https://doi.org/10.1126/science.1258096

Dresser, M.E., Ewing, D.J., Conrad, M.N., Dominguez, A.M., Barstead, R., Jiang, H., Kodadek, T., 1997. Dmc1 Functions in a Saccharomyces Cerevisiae Meiotic Pathway That Is Largely Independent of the Rad51 Pathway. Genetics 147, 533. https://doi.org/10.1093/genetics/147.2.533

Eapen, V.V., Haber, J.E., 2013. DNA damage signaling triggers the cytoplasm-to-vacuole pathway of autophagy to regulate cell cycle progression. Autophagy 9, 440–441. https://doi.org/10.4161/auto.23280

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, 4727–4740. https://doi.org/10.1128/MCB.00566-12

Edenberg, E.R., Vashisht, A., Benanti, J.A., Wohlschlegel, J., Toczyski, D.P., 2014. Rad53 Downregulates Mitotic Gene Transcription by Inhibiting the Transcriptional Activator Ndd1. Mol Cell Biol 34, 725–738. https://doi.org/10.1128/MCB.01056-13 Elia, A.E.H., Cantley, L.C., Yaffe, M.B., 2003. Proteomic Screen Finds pSer/pThr-Binding Domain Localizing Plk1 to Mitotic Substrates. Science 299, 1228–1231. https://doi.org/10.1126/science.1079079

Elledge, S.J., Zhou, Z., Allen, J.B., Navas, T.A., 1993. DNA damage and cell cycle regulation of ribonucleotide reductase. Bioessays 15, 333–339. https://doi.org/10.1002/bies.950150507

Elserafy, M., Šarić, M., Neuner, A., Lin, T., Zhang, W., Seybold, C., Sivashanmugam, L., Schiebel, E., 2014. Molecular Mechanisms that Restrict Yeast Centrosome Duplication to One Event per Cell Cycle. Current Biology 24, 1456–1466. https://doi.org/10.1016/j.cub.2014.05.032

Emerson, C.H., Bertuch, A.A., 2016. Consider the workhorse: Nonhomologous end-joining in budding yeast. Biochem. Cell Biol. 94, 396–406. https://doi.org/10.1139/bcb-2016-0001

Emili, A., 1998. MEC1-Dependent Phosphorylation of Rad9p in Response to DNA Damage. Molecular Cell 2, 183– 189. https://doi.org/10.1016/S1097-2765(00)80128-8

Epum, E.A., Mohan, M.J., Ruppe, N.P., Friedman, K.L., 2020. Interaction of yeast Rad51 and Rad52 relieves Rad52mediated inhibition of de novo telomere addition. PLoS Genet 16, e1008608. https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1008608

Evans, S.K., Lundblad, V., 1999. Est1 and Cdc13 as Comediators of Telomerase Access. Science 286, 117–120. https://doi.org/10.1126/science.286.5437.117

Ewald, J.C., 2018. How yeast coordinates metabolism, growth and division. Current Opinion in Microbiology, Antimicrobials Microbial systems biology https://doi.org/10.1016/j.mib.2017.12.012

Fiorani, S., Mimun, G., Caleca, L., Piccini, D., Pellicioli, A., 2008. Characterization of the activation domain of the Rad53 checkpoint kinase. Cell Cycle 7, 493–499. https://doi.org/10.4161/cc.7.4.5323

Foiani, M., Pellicioli, A., Lopes, M., Lucca, C., Ferrari, M., Liberi, G., Muzi Falconi, M., Plevani1, P., 2000. DNA damage checkpoints and DNA replication controls in Saccharomyces cerevisiae. Mutat Res 451, 187–196. https://doi.org/10.1016/s0027-5107(00)00049-x

Foster, S.S., Zubko, M.K., Guillard, S., Lydall, D., 2006. MRX protects telomeric DNA at uncapped telomeres of budding yeast cdc13-1 mutants. DNA Repair 5, 840–851. https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2006.04.005

Fraschini, R., Raspelli, E., Cassani, C., 2012. Protein Phosphorylation is an Important Tool to Change the Fate of Key Players in the Control of Cell Cycle Progression in Saccharomyces cerevisiae, Protein Phosphorylation in Human Health. IntechOpen. https://doi.org/10.5772/47809

Furuya, K., Poitelea, M., Guo, L., Caspari, T., Carr, A.M., 2004. Chk1 activation requires Rad9 S/TQ-site phosphorylation to promote association with C-terminal BRCT domains of Rad4TOPBP1. Genes Dev. 18, 1154–1164. https://doi.org/10.1101/gad.291104

Galgoczy, D.J., Toczyski, D.P., 2001. Checkpoint adaptation precedes spontaneous and damage-induced genomic instability in yeast. Mol Cell Biol 21, 1710–1718. https://doi.org/10.1128/MCB.21.5.1710-1718.2001

Garvik, B., Carson, M., Hartwell, L., 1995. Single-stranded DNA arising at telomeres in cdc13 mutants may constitute a specific signal for the RAD9 checkpoint. Molecular and Cellular Biology 15, 6128–6138. https://doi.org/10.1128/MCB.15.11.6128

Gasch, A.P., Huang, M., Metzner, S., Botstein, D., Elledge, S.J., Brown, P.O., 2001. Genomic Expression Responses to DNA-damaging Agents and the Regulatory Role of the Yeast ATR Homolog Mec1p. MBoC 12, 2987–3003. https://doi.org/10.1091/mbc.12.10.2987

Geymonat, M., Spanos, A., Walker, P.A., Johnston, L.H., Sedgwick, S.G., 2003. In Vitro Regulation of Budding Yeast Bfa1/Bub2 GAP Activity by Cdc5 *. Journal of Biological Chemistry 278, 14591–14594. https://doi.org/10.1074/jbc.C300059200

Glotzer, M., Murray, A.W., Kirschner, M.W., 1991. Cyclin is degraded by the ubiquitin pathway. Nature 349, 132–138. https://doi.org/10.1038/349132a0

Gonzalez-Arranz, 2021. The N-Terminal Region of the Polo Kinase Cdc5 Is Required for Downregulation of the Meiotic Recombination Checkpoint. Cells, 10, 2561. https://doi.org/10.3390/cells10102561

Gordon, D.M., Roof, D.M., 2001. Degradation of the kinesin Kip1p at anaphase onset is mediated by the anaphasepromoting complex and Cdc20p. Proc Natl Acad Sci U S A 98, 12515–12520. https://doi.org/10.1073/pnas.231212498

Granata, M., Lazzaro, F., Novarina, D., Panigada, D., Puddu, F., Abreu, C.M., Kumar, R., Grenon, M., Lowndes, N.F., Plevani, P., Muzi-Falconi, M., 2010. Dynamics of Rad9 Chromatin Binding and Checkpoint Function Are Mediated by Its Dimerization and Are Cell Cycle–Regulated by CDK1 Activity. PLOS Genetics 6, e1001047. https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1001047

Greider, C.W., Blackburn, E.H., 1987. The telomere terminal transferase of Tetrahymena is a ribonucleoprotein enzyme with two kinds of primer specificity. Cell 51, 887–898. https://doi.org/10.1016/0092-8674(87)90576-9

Grenon, M., Gilbert, C., Lowndes, N.F., 2001. Checkpoint activation in response to double-strand breaks requires the Mre11/Rad50/Xrs2 complex. Nat Cell Biol 3, 844–847. https://doi.org/10.1038/ncb0901-844

Guarino, E., Salguero, I., Kearsey, S.E., 2014. Cellular regulation of ribonucleotide reductase in eukaryotes. Seminars in Cell & Developmental Biology 30, 97–103. https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2014.03.030

Guillemain, G., Ma, É., Mauger, S., Miron, S., Thai, R., Guérois, R., Ochsenbein, F., Marsolier-Kergoat, M.-C., 2007. Mechanisms of Checkpoint Kinase Rad53 Inactivation after a Double-Strand Break in Saccharomyces cerevisiae. Molecular and Cellular Biology 27, 3378–3389. https://doi.org/10.1128/MCB.00863-06

Gutteridge, R.E.A., Ndiaye, M.A., Liu, X., Ahmad, N., 2016. Plk1 Inhibitors in Cancer Therapy: From Laboratory to Clinics. Molecular Cancer Therapeutics 15, 1427–1435. https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-15-0897

Haber, J.E., 2016. A Life Investigating Pathways That Repair Broken Chromosomes. Annual Review of Genetics 50, 1–28. https://doi.org/10.1146/annurev-genet-120215-035043

Habibian, J., Ferguson, B.S., 2018. The Crosstalk between Acetylation and Phosphorylation: Emerging New Roles for HDAC Inhibitors in the Heart. Int J Mol Sci 20, 102. https://doi.org/10.3390/ijms20010102

Hanks, S.K., 1991. Eukaryotic protein kinases. Current Opinion in Structural Biology 1, 369–383. https://doi.org/10.1016/0959-440X(91)90035-R

Hansen, D.V., Loktev, A.V., Ban, K.H., Jackson, P.K., 2004. Plk1 regulates activation of the anaphase promoting complex by phosphorylating and triggering SCFbetaTrCP-dependent destruction of the APC Inhibitor Emi1. Mol Biol Cell 15, 5623–5634. https://doi.org/10.1091/mbc.e04-07-0598

Hartwell, L.H., 1974. Saccharomyces cerevisiae cell cycle. BACTERIOL. REV. 38, 35.

Hartwell, L.H., Kastan, M.B., 1994. Cell cycle control and cancer. Science 266, 1821–1828. https://doi.org/10.1126/science.7997877

Hartwell, L.H., Mortimer, R.K., Culotti, J., Culotti, M., 1973. Genetic Control of the Cell Division Cycle in Yeast: V. Genetic Analysis of cdc Mutants. Genetics 74, 267–286. https://doi.org/10.1093/genetics/74.2.267

Hartwell, L.H., Weinert, T.A., 1989. Checkpoints: controls that ensure the order of cell cycle events. Science 246, 629–634. https://doi.org/10.1126/science.2683079

Hass, E.P., Zappulla, D.C., 2015. The Ku subunit of telomerase binds Sir4 to recruit telomerase to lengthen telomeres in S. cerevisiae. eLife 4, e07750. https://doi.org/10.7554/eLife.07750

Hildebrandt, E.R., Hoyt, M.A., 2001. Cell Cycle-dependent Degradation of the Saccharomyces cerevisiae Spindle Motor Cin8p Requires APCCdh1 and a Bipartite Destruction Sequence. MBoC 12, 3402–3416. https://doi.org/10.1091/mbc.12.11.3402

Hinshaw, S.M., Harrison, S.C., 2018. Kinetochore Function from the Bottom Up. Trends in Cell Biology 28, 22–33. https://doi.org/10.1016/j.tcb.2017.09.002 Holder, J., Poser, E., Barr, F.A., 2019. Getting out of mitosis: spatial and temporal control of mitotic exit and cytokinesis by PP1 and PP2A. FEBS Letters 593, 2908–2924. https://doi.org/10.1002/1873-3468.13595

Hollenhorst, P., Bose, M., Mielke, M., Müller, U., Fox, C., 2000. Forkhead genes in transcriptional silencing, cell morphology and the cell cycle. Overlapping and distinct functions for FKH1 and FKH2 in Saccharomyces cerevisiae. Genetics 154, 1533–48. https://doi.org/10.1093/genetics/154.4.1533

Hopfner, K.P., Karcher, A., Craig, L., Woo, T.T., Carney, J.P., Tainer, J.A., 2001. Structural biochemistry and interaction architecture of the DNA double-strand break repair Mre11 nuclease and Rad50-ATPase. Cell 105, 473–485. https://doi.org/10.1016/s0092-8674(01)00335-x

Hoyt, M.A., He, L., Loo, K.K., Saunders, W.S., 1992. Two Saccharomyces cerevisiae kinesin-related gene products required for mitotic spindle assembly. J Cell Biol 118, 109–120. https://doi.org/10.1083/jcb.118.1.109

Hsu, J.Y., Sun, Z.W., Li, X., Reuben, M., Tatchell, K., Bishop, D.K., Grushcow, J.M., Brame, C.J., Caldwell, J.A., Hunt, D.F., Lin, R., Smith, M.M., Allis, C.D., 2000. Mitotic phosphorylation of histone H3 is governed by lpl1/aurora kinase and Glc7/PP1 phosphatase in budding yeast and nematodes. Cell 102, 279–291. https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)00034-9

Hu, F., Elledge, S.J., 2002. Bub2 is a cell cycle regulated phospho-protein controlled by multiple checkpoints. Cell Cycle 1, 351–355. PMID: 12461298.

Hu, F., Wang, Y., Liu, D., Li, Y., Qin, J., Elledge, S.J., 2001. Regulation of the Bub2/Bfa1 GAP Complex by Cdc5 and Cell Cycle Checkpoints. Cell 107, 655–665. https://doi.org/10.1016/S0092-8674(01)00580-3

Hu, H., Zhou, Q., Han, X., Li, Z., 2017. CRL4WDR1 Controls Polo-like Kinase Protein Abundance to Promote Bilobe Duplication, Basal Body Segregation and Flagellum Attachment in Trypanosoma brucei. PLoS Pathog 13, e1006146. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006146

Huang, M., Zhou, Z., Elledge, S.J., 1998. The DNA Replication and Damage Checkpoint Pathways Induce Transcription by Inhibition of the Crt1 Repressor. Cell 94, 595–605. https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81601-3

Humpal, S.E., Robinson, D.A., Krebs, J.E., 2009. Marks to stop the clock: histone modifications and checkpoint regulation in the DNA damage response. Biochem Cell Biol 87, 243–253. https://doi.org/10.1139/O08-109

Huyen, Y., Zgheib, O., Ditullio, R.A., Gorgoulis, V.G., Zacharatos, P., Petty, T.J., Sheston, E.A., Mellert, H.S., Stavridi, E.S., Halazonetis, T.D., 2004. Methylated lysine 79 of histone H3 targets 53BP1 to DNA double-strand breaks. Nature 432, 406–411. https://doi.org/10.1038/nature03114

Iliaki, S., Beyaert, R., Afonina, I.S., 2021. Polo-like kinase 1 (PLK1) signaling in cancer and beyond. Biochemical Pharmacology 193, 114747. https://doi.org/10.1016/j.bcp.2021.114747

Jaehnig, E.J., Kuo, D., Hombauer, H., Ideker, T.G., Kolodner, R.D., 2013. Checkpoint Kinases Regulate a Global Network of Transcription Factors in Response to DNA Damage. Cell Reports 4, 174–188. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2013.05.041

Jang, Y.-J., Ma, S., Terada, Y., Erikson, R.L., 2002. Phosphorylation of threonine 210 and the role of serine 137 in the regulation of mammalian polo-like kinase. J Biol Chem 277, 44115–44120. https://doi.org/10.1074/jbc.M202172200

Jia, X., Weinert, T., Lydall, D., 2004. Mec1 and Rad53 inhibit formation of single-stranded DNA at telomeres of Saccharomyces cerevisiae cdc13-1 mutants. Genetics 166 2, 753–64. https://doi.org/10.1534/GENETICS.166.2.753

Jin, F., Wang, Y., 2006. Budding yeast DNA damage adaptation mutants exhibit defects in mitotic exit. Cell Cycle 5, 2914–2919. https://doi.org/10.4161/cc.5.24.3570

Johnson, E.S., Ma, P.C., Ota, I.M., Varshavsky, A., 1995. A proteolytic pathway that recognizes ubiquitin as a degradation signal. J Biol Chem 270, 17442–17456. https://doi.org/10.1074/jbc.270.29.17442

Joukov, V., De Nicolo, A., 2018. Aurora-PLK1 cascades as key signaling modules in the regulation of mitosis. Science Signaling 11, eaar4195. https://doi.org/10.1126/scisignal.aar4195

Page | 250

Juang, Y.L., Huang, J., Peters, J.M., McLaughlin, M.E., Tai, C.Y., Pellman, D., 1997. APC-mediated proteolysis of Ase1 and the morphogenesis of the mitotic spindle. Science 275, 1311–1314. https://doi.org/10.1126/science.275.5304.1311

Kachaner, D., Garrido, D., Mehsen, H., Normandin, K., Lavoie, H., Archambault, V., 2017. Coupling of Polo kinase activation to nuclear localization by a bifunctional NLS is required during mitotic entry. Nat Commun 8, 1701. https://doi.org/10.1038/s41467-017-01876-8

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. Journal of Biological Chemistry 278, 23410–23417. https://doi.org/10.1074/jbc.M302995200

Kao, L., Wang, Y.-T., Chen, Y.-C., Tseng, S.-F., Jhang, J.-C., Chen, Y.-J., Teng, S.-C., 2014. Global Analysis of Cdc14 Dephosphorylation Sites Reveals Essential Regulatory Role in Mitosis and Cytokinesis. Mol Cell Proteomics 13, 594–605. https://doi.org/10.1074/mcp.M113.032680

Karanjawala, Z.E., Murphy, N., Hinton, D.R., Hsieh, C.-L., Lieber, M.R., 2002. Oxygen Metabolism Causes Chromosome Breaks and Is Associated with the Neuronal Apoptosis Observed in DNA Double-Strand Break Repair Mutants. Current Biology 12, 397–402. https://doi.org/10.1016/S0960-9822(02)00684-X

Katsuki, Y., Jeggo, P.A., Uchihara, Y., Takata, M., Shibata, A., 2020. DNA double-strand break end resection: a critical relay point for determining the pathway of repair and signaling. GENOME INSTAB. DIS. 1, 155–171. https://doi.org/10.1007/s42764-020-00017-8

Kauppi, L., Jasin, M., Keeney, S., 2013. How much is enough? Control of DNA double-strand break numbers in mouse meiosis. Cell Cycle 12, 2719–2720. https://doi.org/10.4161/cc.26079

Kaur, K., Kaur, R., 2018. Occupational Pesticide Exposure, Impaired DNA Repair, and Diseases. Indian J Occup Environ Med 22, 74–81. https://doi.org/10.4103/ijoem.IJOEM_45_18

Kaye, J.A., Melo, J.A., Cheung, S.K., Vaze, M.B., Haber, J.E., Toczyski, D.P., 2004. DNA Breaks Promote Genomic Instability by Impeding Proper Chromosome Segregation. Current Biology 14, 2096–2106. https://doi.org/10.1016/j.cub.2004.10.051

Keogh, M.-C., Kim, J.-A., Downey, M., Fillingham, J., Chowdhury, D., Harrison, J.C., Onishi, M., Datta, N., Galicia, S., Emili, A., Lieberman, J., Shen, X., Buratowski, S., Haber, J.E., Durocher, D., Greenblatt, J.F., Krogan, N.J., 2006. A phosphatase complex that dephosphorylates gammaH2AX regulates DNA damage checkpoint recovery. Nature 439, 497–501. https://doi.org/10.1038/nature04384

Khondker, S., Kajjo, S., Chandler-Brown, D., Skotheim, J., Rudner, A., Ikui, A., 2020. PP2ACdc55 dephosphorylates Pds1 and inhibits spindle elongation in S. cerevisiae. Journal of Cell Science 133, jcs243766. https://doi.org/10.1242/jcs.243766

Kim, J., Goshima, G., 2022. Mitotic spindle formation in the absence of Polo kinase. Proc Natl Acad Sci U S A 119, e2114429119. https://doi.org/10.1073/pnas.2114429119

Kim, J.-S., Xu, X., Li, H., Solomon, D., Lane, W.S., Jin, T., Waldman, T., 2011. Mechanistic analysis of a DNA damageinduced, PTEN-dependent size checkpoint in human cells. Mol Cell Biol 31, 2756–2771. https://doi.org/10.1128/MCB.01323-10

Kitada, K., Johnson, A.L., Johnston, L.H., Sugino, A., 1993. A multicopy suppressor gene of the Saccharomyces cerevisiae G1 cell cycle mutant gene dbf4 encodes a protein kinase and is identified as CDC5. Mol. Cell. Biol. 13, 4445–4457. https://doi.org/10.1128/MCB.13.7.4445

Klermund, J., Bender, K., Luke, B., 2014. High nutrient levels and TORC1 activity reduce cell viability following prolonged telomere dysfunction and cell cycle arrest. Cell Rep 9, 324–335. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.08.053

Kocakaplan, D., Karabürk, H., Dilege, C., Kirdök, I., Bektas, S.N., Caydasi, A.K., 2021. Protein phosphatase 1 in association with Bud14 inhibits mitotic exit in Saccharomyces cerevisiae. eLife 10, e72833. https://doi.org/10.7554/eLife.72833
Kõivomägi, M., Swaffer, M.P., Turner, J.J., Marinov, G., Skotheim, J.M., 2021. G1 cyclin–Cdk promotes cell cycle entry through localized phosphorylation of RNA polymerase II. Science 374, 347–351. https://doi.org/10.1126/science.aba5186

Koranda, M., Schleiffer, A., Endler, L., Ammerer, G., 2000. Forkhead-like transcription factors recruit Ndd1 to the chromatin of G2/M-specific promoters. Nature 406, 94–98. https://doi.org/10.1038/35017589

Korinek, W.S., Bi, E., Epp, J.A., Wang, L., Ho, J., Chant, J., 2000. Cyk3, a novel SH3-domain protein, affects cytokinesis in yeast. Current Biology 10, S1–S4. https://doi.org/10.1016/S0960-9822(00)00626-6

Kramer, E.R., Scheuringer, N., Podtelejnikov, A.V., Mann, M., Peters, J.-M., 2000. Mitotic Regulation of the APC Activator Proteins CDC20 and CDH1. MBoC 11, 1555–1569. https://doi.org/10.1091/mbc.11.5.1555

Kulkarni, D.S., Owens, S.N., Honda, M., Ito, M., Yang, Y., Corrigan, M.W., Chen, L., Quan, A.L., Hunter, N., 2020. PCNA activates the MutLy endonuclease to promote meiotic crossing over. Nature 586, 623–627. https://doi.org/10.1038/s41586-020-2645-6

Kumagai, A., Lee, J., Yoo, H.Y., Dunphy, W.G., 2006. TopBP1 Activates the ATR-ATRIP Complex. Cell 124, 943–955. https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.12.041

Lamothe, R., Costantino, L., Koshland, D.E., 2020. The spatial regulation of condensin activity in chromosome condensation. Genes Dev 34, 819–831. https://doi.org/10.1101/gad.335471.119

Landmann, C., Pierre-Elies, P., Goutte-Gattat, D., Montembault, E., Claverie, M.-C., Royou, A., 2020. The Mre11-Rad50-Nbs1 complex mediates the robust recruitment of Polo to DNA lesions during mitosis in Drosophila. Journal of Cell Science 133, jcs244442. https://doi.org/10.1242/jcs.244442

Lanz, M.C., Dibitetto, D., Smolka, M.B., 2019. DNA damage kinase signaling: checkpoint and repair at 30 years. EMBO J 38, e101801. https://doi.org/10.15252/embj.2019101801

Lara-Gonzalez, P., Pines, J., Desai, A., 2021. Spindle assembly checkpoint activation and silencing at kinetochores. Semin Cell Dev Biol 117, 86–98. https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2021.06.009

Larrivée, M., LeBel, C., Wellinger, R.J., 2004. The generation of proper constitutive G-tails on yeast telomeres is dependent on the MRX complex. Genes Dev. 18, 1391–1396. https://doi.org/10.1101/gad.1199404

Lee, C.-S., Haber, J.E., 2015. Mating-type Gene Switching in Saccharomyces cerevisiae, in: Mobile DNA III. John Wiley & Sons, Ltd, pp. 491–514. https://doi.org/10.1128/9781555819217.ch23

Lee, C.-S., Lee, K., Legube, G., Haber, J.E., 2014. Dynamics of yeast histone H2A and H2B phosphorylation in response to a double-strand break. Nat Struct Mol Biol 21, 103–109. https://doi.org/10.1038/nsmb.2737

Lee, K., Myung, K., 2008. PCNA Modifications for Regulation of Post-Replication Repair Pathways. Mol Cells 26, 5–11. PMCID: PMC3518309.

Lee, K.S., Asano, S., Park, J.-E., Sakchaisri, K., Erikson, R.L., 2005. Monitoring the cell cycle by multi-kinasedependent regulation of Swe1/Wee1 in budding yeast. Cell Cycle 4, 1346–1349. https://doi.org/10.4161/cc.4.10.2049

Lee, S.E., Moore, J.K., Holmes, A., Umezu, K., Kolodner, R.D., Haber, J.E., 1998. Saccharomyces Ku70, Mre11/Rad50, and RPA Proteins Regulate Adaptation to G2/M Arrest after DNA Damage. Cell 94, 399–409. https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81482-8

Lee, S.E., Pellicioli, A., Malkova, A., Foiani, M., Haber, J.E., 2001. The Saccharomyces recombination protein Tid1p is required for adaptation from G2/M arrest induced by a double-strand break. Current Biology 11, 1053–1057. https://doi.org/10.1016/S0960-9822(01)00296-2

Lee, S.E., Pellicioli, A., Vaze, M.B., Sugawara, N., Malkova, A., Foiani, M., Haber, J.E., 2003. Yeast Rad52 and Rad51 Recombination Proteins Define a Second Pathway of DNA Damage Assessment in Response to a Single Double-Strand Break. Mol Cell Biol 23, 8913–8923. https://doi.org/10.1128/MCB.23.23.8913-8923.2003

Lemaire, S., Crozet, P., Xu, Z., Maes, A., Le Peillet, J., 2021. Biocompatible Nucleic Acids for Digital Data Storage. Publication Number WO/2021/064095

Page | 252

Leroy, C., Lee, S.E., Vaze, M., Ochsenbein, F., Guérois, R., Haber, J., Marsolier-Kergoat, M.-C., 2003. PP2C phosphatases Ptc2 and Ptc3 are required for DNA checkpoint inactivation after a double-strand break. Molecular cell 11 3, 827–35. https://doi.org/10.1016/S1097-2765(03)00058-3

Li, Z., Li, J., Kong, Y., Yan, S., Ahmad, N., Liu, X., 2017. Plk1 Phosphorylation of Mre11 Antagonizes the DNA Damage Response. Cancer Research 77, 3169–3180. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-16-2787

Liakopoulos, D., 2021. Coupling DNA Replication and Spindle Function in Saccharomyces cerevisiae. Cells 10, 3359. https://doi.org/10.3390/cells10123359

Liang, F., Wang, Y., 2007. DNA damage checkpoints inhibit mitotic exit by two different mechanisms. Mol Cell Biol 27, 5067–5078. https://doi.org/10.1128/MCB.00095-07

Limas, J.C., Cook, J.G., 2019. Preparation for DNA replication: the key to a successful S phase. FEBS Letters 593, 2853–2867. https://doi.org/10.1002/1873-3468.13619

Linke, C., Klipp, E., Lehrach, H., Barberis, M., Krobitsch, S., 2013. Fkh1 and Fkh2 associate with Sir2 to control CLB2 transcription under normal and oxidative stress conditions. Frontiers in Physiology 4.

Lisby, M., Barlow, J.H., Burgess, R.C., Rothstein, R., 2004. Choreography of the DNA Damage Response: Spatiotemporal Relationships among Checkpoint and Repair Proteins. Cell 118, 699–713. https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.08.015

Litwin, I., Pilarczyk, E., Wysocki, R., 2018. The Emerging Role of Cohesin in the DNA Damage Response. Genes 9, 581. https://doi.org/10.3390/genes9120581

Liu, J., Wang, L., Wang, Z., Liu, J.-P., 2019. Roles of Telomere Biology in Cell Senescence, Replicative and Chronological Ageing. Cells 8, 54. https://doi.org/10.3390/cells8010054

Liu, Z., Sun, Q., Wang, X., 2017. PLK1, A Potential Target for Cancer Therapy. Transl Oncol 10, 22–32. https://doi.org/10.1016/j.tranon.2016.10.003

Ljungman, M., Parks, L., Hulbatte, R., Bedi, K., 2017. The role of H3K79 methylation in transcription and the DNA damage response. Mutation Research/Reviews in Mutation Research 780. https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2017.11.001

Llamazares, S., Moreira, A., Tavares, A., Girdham, C., Spruce, B.A., Gonzalez, C., Karess, R.E., Glover, D.M., Sunkel, C.E., 1991. polo encodes a protein kinase homolog required for mitosis in Drosophila. Genes Dev 5, 2153–2165. https://doi.org/10.1101/gad.5.12a.2153

Longhese, M.P., Paciotti, V., Fraschini, R., Zaccarini, R., Plevani, P., Lucchini, G., 1997. The novel DNA damage checkpoint protein ddc1p is phosphorylated periodically during the cell cycle and in response to DNA damage in budding yeast. EMBO J 16, 5216–5226. https://doi.org/10.1093/emboj/16.17.5216

Lowery, D.M., Lim, D., Yaffe, M.B., 2005. Structure and function of Polo-like kinases. Oncogene 24, 248–259. https://doi.org/10.1038/sj.onc.1208280

Lown, J., Sim, S.-K., 1977. The mechanism of the bleomycin-induced cleavage of DNA. Biochemical and Biophysical Research Communications 77, 1150–1157. https://doi.org/10.1016/S0006-291X(77)80099-5

Loy, C.J., Lydall, D., Surana, U., 1999. NDD1, a high-dosage suppressor of cdc28-1N, is essential for expression of a subset of late-S-phase-specific genes in Saccharomyces cerevisiae. Mol Cell Biol 19, 3312–3327. https://doi.org/10.1128/MCB.19.5.3312

Lundblad, V., Szostak, J.W., 1989. A mutant with a defect in telomere elongation leads to senescence in yeast. Cell 57, 633–643. https://doi.org/10.1016/0092-8674(89)90132-3

Lustig, A.J., Petes, T.D., 1986. Identification of yeast mutants with altered telomere structure. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 83, 1398–1402. https://doi.org/10.1073/pnas.83.5.1398

Lydall, D., Weinert, T., 1995. Yeast Checkpoint Genes in DNA Damage Processing: Implications for Repair and Arrest. Science 270, 1488–1491. https://doi.org/10.1126/science.270.5241.1488

Machín, F., Quevedo, O., Ramos-Pérez, C., García-Luis, J., 2016. Cdc14 phosphatase: warning, no delay allowed for chromosome segregation! Curr Genet 62, 7–13. https://doi.org/10.1007/s00294-015-0502-1

Macůrek, L., Lindqvist, A., Lim, D., Lampson, M.A., Klompmaker, R., Freire, R., Clouin, C., Taylor, S.S., Yaffe, M.B., Medema, R.H., 2008. Polo-like kinase-1 is activated by aurora A to promote checkpoint recovery. Nature 455, 119–123. https://doi.org/10.1038/nature07185

Maes, A., Peillet, J.L., Julienne, A., Blachon, C., Cornille, N., Gibier, M., Arwani, E., Xu, Z., Crozet, P., Lemaire, S.D., 2022. La révolution de l'ADN: biocompatible and biosafe DNA data storage. https://doi.org/10.1101/2022.08.25.505104

Mah, A.S., Jang, J., Deshaies, R.J., 2001. Protein kinase Cdc15 activates the Dbf2-Mob1 kinase complex. Proceedings of the National Academy of Sciences 98, 7325–7330. https://doi.org/10.1073/pnas.141098998

Makharashvili, N., Paull, T.T., 2015. CtIP: A DNA damage response protein at the intersection of DNA metabolism. DNA Repair, Cutting-edge Perspectives in Genomic Maintenance II 32, 75–81. https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2015.04.016

Manning, G., Plowman, G.D., Hunter, T., Sudarsanam, S., 2002. Evolution of protein kinase signaling from yeast to man. Trends in Biochemical Sciences 27, 514–520. https://doi.org/10.1016/S0968-0004(02)02179-5

Manzano-López, J., Monje-Casas, F., 2020. The Multiple Roles of the Cdc14 Phosphatase in Cell Cycle Control. International Journal of Molecular Sciences 21, 709. https://doi.org/10.3390/ijms21030709

Mardin, B.R., Agircan, F.G., Lange, C., Schiebel, E., 2011. Plk1 controls the Nek2A-PP1y antagonism in centrosome disjunction. Curr Biol 21, 1145–1151. https://doi.org/10.1016/j.cub.2011.05.047

Maringele, L., Lydall, D., 2002. EXO1-dependent single-stranded DNA at telomeres activates subsets of DNA damage and spindle checkpoint pathways in budding yeast yku70∆ mutants. Genes Dev. 16, 1919–1933. https://doi.org/10.1101/gad.225102

Marini, V., Krejci, L., 2010. Srs2: The "Odd-Job Man" in DNA repair. DNA Repair, Helicase and translocases required for the maintenance of genome stability 9, 268–275. https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2010.01.007

Markiewicz-Potoczny, M., Lydall, D., 2016. Costs, benefits and redundant mechanisms of adaption to chronic lowdose stress in yeast. Cell Cycle 15, 2732–2741. https://doi.org/10.1080/15384101.2016.1218104

Maroc, L., Fairhead, C., 2021. Lessons from the Nakaseomyces: mating-type switching, DSB repair and evolution of Ho. Curr Genet 67, 685–693. https://doi.org/10.1007/s00294-021-01182-3

Martin, S.G., Laroche, T., Suka, N., Grunstein, M., Gasser, S.M., 1999. Relocalization of telomeric Ku and SIR proteins in response to DNA strand breaks in yeast. Cell 97, 621–633. https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)80773-4

Matellán, L., Monje-Casas, F., 2020. Regulation of Mitotic Exit by Cell Cycle Checkpoints: Lessons From Saccharomyces cerevisiae. Genes 11, 195. https://doi.org/10.3390/genes11020195

Matos, J., Lipp, J.J., Bogdanova, A., Guillot, S., Okaz, E., Junqueira, M., Shevchenko, A., Zachariae, W., 2008. Dbf4dependent CDC7 kinase links DNA replication to the segregation of homologous chromosomes in meiosis I. Cell 135, 662–678. https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.10.026

Meitinger, F., Boehm, M.E., Hofmann, A., Hub, B., Zentgraf, H., Lehmann, W.D., Pereira, G., 2011. Phosphorylationdependent regulation of the F-BAR protein Hof1 during cytokinesis. Genes Dev 25, 875–888. https://doi.org/10.1101/gad.622411

Melo, J.A., Cohen, J., Toczyski, D.P., 2001. Two checkpoint complexes are independently recruited to sites of DNA damage in vivo. Genes Dev. 15, 2809–2821. https://doi.org/10.1101/gad.903501

Memisoglu, G., Lanz, M.C., Eapen, V.V., Jordan, J.M., Lee, K., Smolka, M.B., Haber, J.E., 2019. Mec1ATR Autophosphorylation and Ddc2ATRIP Phosphorylation Regulates DNA Damage Checkpoint Signaling. Cell Reports 28, 1090-1102.e3. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.06.068

Michel, A.H., Hatakeyama, R., Kimmig, P., Arter, M., Peter, M., Matos, J., De Virgilio, C., Kornmann, B., 2017. Functional mapping of yeast genomes by saturated transposition. Elife 6, e23570. https://doi.org/10.7554/eLife.23570

Michel, A.H., Kornmann, B., 2022. SAturated Transposon Analysis in Yeast (SATAY) for Deep Functional Mapping of Yeast Genomes. Methods Mol Biol 2477, 349–379. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-2257-5_20

Millan-Zambrano, G., Santos-Rosa, H., Puddu, F., Robson, S.C., Jackson, S.P., Kouzarides, T., 2018. Phosphorylation of Histone H4T80 Triggers DNA Damage Checkpoint Recovery. Molecular Cell 72, 625-635.e4. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2018.09.023

Miller, M.P., Amon, A., Ünal, E., 2013. Meiosis I: when chromosomes undergo extreme makeover. Current Opinion in Cell Biology, Cell cycle, differentiation and disease 25, 687–696. https://doi.org/10.1016/j.ceb.2013.07.009

Milne, G.T., Jin, S., Shannon, K.B., Weaver, D.T., 1996. Mutations in two Ku homologs define a DNA end-joining repair pathway in Saccharomyces cerevisiae. Mol Cell Biol 16, 4189–4198. https://doi.org/10.1128/MCB.16.8.4189

Mimitou, 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, 3358–3369. https://doi.org/10.1038/emboj.2010.193

Mimitou, E.P., Symington, L.S., 2008. Sae2, Exo1 and Sgs1 collaborate in DNA double-strand break processing. Nature 455, 770–774. https://doi.org/10.1038/nature07312

Mishra, P.K., Ciftci-Yilmaz, S., Reynolds, D., Au, W.-C., Boeckmann, L., Dittman, L.E., Jowhar, Z., Pachpor, T., Yeh, E., Baker, R.E., Hoyt, M.A., D'Amours, D., Bloom, K., Basrai, M.A., 2016. Polo kinase Cdc5 associates with centromeres to facilitate the removal of centromeric cohesin during mitosis. Mol Biol Cell 27, 2286–2300. https://doi.org/10.1091/mbc.E16-01-0004

Mishra, P.K., Olafsson, G., Boeckmann, L., Westlake, T.J., Jowhar, Z.M., Dittman, L.E., Baker, R.E., D'Amours, D., Thorpe, P.H., Basrai, M.A., 2019. Cell cycle–dependent association of polo kinase Cdc5 with CENP-A contributes to faithful chromosome segregation in budding yeast. MBoC 30, 1020–1036. https://doi.org/10.1091/mbc.E18-09-0584

Mitra, J., Enders, G.H., Azizkhan-Clifford, J., Lengel, K.L., 2006. Dual Regulation of the Anaphase Promoting Complex in Human Cells by Cyclin A-Cdk2 and Cyclin A-Cdk1 Complexes. Cell Cycle 5, 662–667. https://doi.org/10.4161/cc.5.6.2604

Mohl, D.A., Huddleston, M.J., Collingwood, T.S., Annan, R.S., Deshaies, R.J., 2009. Dbf2-Mob1 drives relocalization of protein phosphatase Cdc14 to the cytoplasm during exit from mitosis. J Cell Biol 184, 527–539. https://doi.org/10.1083/jcb.200812022

Monteilhet, C., Perrin, A., Thierry, A., Colleaux, L., Dujon, B., 1990. Purification and characterization of the in vitro activity of I-Sce I, a novel and highly specific endonuclease encoded by a group I intron. Nucleic Acids Research 18, 1407–1413. https://doi.org/10.1093/nar/18.6.1407

Mortensen, E.M., Haas, W., Gygi, M., Gygi, S.P., Kellogg, D.R., 2005. Cdc28-dependent regulation of the Cdc5/Polo kinase. Curr Biol 15, 2033–2037. https://doi.org/10.1016/j.cub.2005.10.046

Moyano-Rodríguez, Y., Vaquero, D., Vilalta-Castany, O., Foltman, M., Sanchez-Diaz, A., Queralt, E., 2022. PP2A-Cdc55 phosphatase regulates actomyosin ring contraction and septum formation during cytokinesis. Cell. Mol. Life Sci. 79, 165. https://doi.org/10.1007/s00018-022-04209-1

Nakada, D., Matsumoto, K., Sugimoto, K., 2003. ATM-related Tel1 associates with double-strand breaks through an Xrs2-dependent mechanism. Genes Dev 17, 1957–1962. https://doi.org/10.1101/gad.1099003

Nakamura, T.M., Du, L.-L., Redon, C., Russell, P., 2004. Histone H2A phosphorylation controls Crb2 recruitment at DNA breaks, maintains checkpoint arrest, and influences DNA repair in fission yeast. Mol Cell Biol 24, 6215–6230. https://doi.org/10.1128/MCB.24.14.6215-6230.2004

Nakanishi, S., Lee, J.S., Gardner, K.E., Gardner, J.M., Takahashi, Y., Chandrasekharan, M.B., Sun, Z.-W., Osley, M.A., Strahl, B.D., Jaspersen, S.L., Shilatifard, A., 2009. Histone H2BK123 monoubiquitination is the critical determinant

for H3K4 and H3K79 trimethylation by COMPASS and Dot1. Journal of Cell Biology 186, 371–377. https://doi.org/10.1083/jcb.200906005

Nakashima, A., Maruki, Y., Imamura, Y., Kondo, C., Kawamata, T., Kawanishi, I., Takata, H., Matsuura, A., Lee, K.S., Kikkawa, U., Ohsumi, Y., Yonezawa, K., Kamada, Y., 2008. The Yeast Tor Signaling Pathway Is Involved in G2/M Transition via Polo-Kinase. PLoS One 3, e2223. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002223

Ngo, G.H.P., Lydall, D., 2015. The 9-1-1 checkpoint clamp coordinates resection at DNA double strand breaks. Nucleic Acids Research 43, 5017–5032. https://doi.org/10.1093/nar/gkv409

Ngo, H.-P., Lydall, D., 2010. Survival and growth of yeast without telomere capping by Cdc13 in the absence of Sgs1, Exo1, and Rad9. PLoS Genet 6, e1001072. https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1001072

Niida, H., Shimada, M., Murakami, H., Nakanishi, M., 2010. Mechanisms of dNTP supply that play an essential role in maintaining genome integrity in eukaryotic cells. Cancer Science 101, 2505–2509. https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2010.01719.x

Nyberg, K.A., Michelson, R.J., Putnam, C.W., Weinert, T.A., 2002. Toward Maintaining the Genome: DNA Damage and Replication Checkpoints. Annual Review of Genetics 36, 617–656. https://doi.org/10.1146/annurev.genet.36.060402.113540

Oelschlaegel, T., Schwickart, M., Matos, J., Bogdanova, A., Camasses, A., Havlis, J., Shevchenko, A., Zachariae, W., 2005. The Yeast APC/C Subunit Mnd2 Prevents Premature Sister Chromatid Separation Triggered by the Meiosis-Specific APC/C-Ama1. Cell 120, 773–788. https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.01.032

Offley, S.R., Schmidt, M.C., 2019. Protein phosphatases of Saccharomyces cerevisiae. Curr Genet 65, 41–55. https://doi.org/10.1007/s00294-018-0884-y

Oh, Y., Chang, K.-J., Orlean, P., Wloka, C., Deshaies, R., Bi, E., 2012. Mitotic exit kinase Dbf2 directly phosphorylates chitin synthase Chs2 to regulate cytokinesis in budding yeast. MBoC 23, 2445–2456. https://doi.org/10.1091/mbc.e12-01-0033

Ohkura, H., Hagan, I.M., Glover, D.M., 1995. The conserved Schizosaccharomyces pombe kinase plo1, required to form a bipolar spindle, the actin ring, and septum, can drive septum formation in G1 and G2 cells. Genes Dev 9, 1059–1073. https://doi.org/10.1101/gad.9.9.1059

Ohouo, P.Y., Bastos de Oliveira, F.M., Liu, Y., Ma, C.J., Smolka, M.B., 2013. DNA-repair scaffolds dampen checkpoint signalling by counteracting the adaptor Rad9. Nature 493, 120–124. https://doi.org/10.1038/nature11658

Okamura, E., Sakamoto, T., Sasaki, T., Matsunaga, S., 2017. A Plant Ancestral Polo-Like Kinase Sheds Light on the Mystery of the Evolutionary Disappearance of Polo-Like Kinases in the Plant Kingdom. Cytologia 82, 261–266. https://doi.org/10.1508/cytologia.82.261

Örd, M., Puss, K.K., Kivi, R., Möll, K., Ojala, T., Borovko, I., Faustova, I., Venta, R., Valk, E., Kõivomägi, M., Loog, M., 2020. Proline-Rich Motifs Control G2-CDK Target Phosphorylation and Priming an Anchoring Protein for Polo Kinase Localization. Cell Reports 31, 107757. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.107757

Oshima, Y., 1993. Homothallism, mating-type switching, and the controlling element model in Saccharomyces cerevisiae. The Early Days of Yeast Genetics 291–304.

Pakchuen, S., Ishibashi, M., Takakusagi, E., Shirahige, K., Sutani, T., 2016. Physical Association of Saccharomyces cerevisiae Polo-like Kinase Cdc5 with Chromosomal Cohesin Facilitates DNA Damage Response. J Biol Chem 291, 17228–17246. https://doi.org/10.1074/jbc.M116.727438

Papamichos-Chronakis, M., Krebs, J.E., Peterson, C.L., 2006. Interplay between Ino80 and Swr1 chromatin remodeling enzymes regulates cell cycle checkpoint adaptation in response to DNA damage. Genes Dev 20, 2437–2449. https://doi.org/10.1101/gad.1440206

Paulovich, A.G., Toczyski, D.P., Hartwell, L.H., 1997. When Checkpoints Fail. Cell 88, 315–321. https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81870-X Pellicioli, A., Lee, S.E., Lucca, C., Foiani, M., Haber, J.E., 2001. Regulation of Saccharomyces Rad53 Checkpoint Kinase during Adaptation from DNA Damage–Induced G2/M Arrest. Molecular Cell 7, 293–300. https://doi.org/10.1016/S1097-2765(01)00177-0

Pellicioli, A., Lucca, C., Liberi, G., Marini, F., Lopes, M., Plevani, P., Romano, A., Di Fiore, P.P., Foiani, M., 1999. Activation of Rad53 kinase in response to DNA damage and its effect in modulating phosphorylation of the lagging strand DNA polymerase. The EMBO journal 18, 6561–6572. https://doi.org/10.1093/emboj/18.22.6561.

Penkner, A.M., Prinz, S., Ferscha, S., Klein, F., 2005. Mnd2, an Essential Antagonist of the Anaphase-Promoting Complex during Meiotic Prophase. Cell 120, 789–801. https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.01.017

Peplowska, K., Wallek, A.U., Storchova, Z., 2014. Sgo1 Regulates Both Condensin and Ipl1/Aurora B to Promote Chromosome Biorientation. PLOS Genetics 10, e1004411. https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004411

Pereira, G., Manson, C., Grindlay, J., Schiebel, E., 2002. Regulation of the Bfa1p-Bub2p complex at spindle pole bodies by the cell cycle phosphatase Cdc14p. J Cell Biol 157, 367–379. https://doi.org/10.1083/jcb.200112085

Pereira, G., Schiebel, E., 2005. Kin4 Kinase Delays Mitotic Exit in Response to Spindle Alignment Defects. Molecular Cell 19, 209–221. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2005.05.030

Pfleger, C.M., Kirschner, M.W., 2000. The KEN box: an APC recognition signal distinct from the D box targeted by Cdh1. Genes Dev 14, 655–665.

Pintard, L., Archambault, V., 2018. A unified view of spatio-temporal control of mitotic entry: Polo kinase as the key. Open Biology 8, 180114. https://doi.org/10.1098/rsob.180114

Prugar, E., Burnett, C., Chen, X., Hollingsworth, N.M., 2017. Coordination of Double Strand Break Repair and Meiotic Progression in Yeast by a Mek1-Ndt80 Negative Feedback Loop. Genetics 206, 497–512. https://doi.org/10.1534/genetics.117.199703

Puddu, F., Granata, M., Nola, L.D., Balestrini, A., Piergiovanni, G., Lazzaro, F., Giannattasio, M., Plevani, P., Muzi-Falconi, M., 2008. Phosphorylation of the Budding Yeast 9-1-1 Complex Is Required for Dpb11 Function in the Full Activation of the UV-Induced DNA Damage Checkpoint. Molecular and Cellular Biology 28, 4782–4793. https://doi.org/10.1128/MCB.00330-08

Putnam, C.D., Jaehnig, E.J., Kolodner, R.D., 2009. Perspectives on the DNA damage and replication checkpoint responses in Saccharomyces cerevisiae. DNA Repair, Checkpoint response to DNA damage 8, 974–982. https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2009.04.021

Queralt, E., Lehane, C., Novak, B., Uhlmann, F., 2006. Downregulation of PP2ACdc55 Phosphatase by Separase Initiates Mitotic Exit in Budding Yeast. Cell 125, 719–732. https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.03.038

Rahal, R., Amon, A., 2008. The Polo-like kinase Cdc5 interacts with FEAR network components and Cdc14. Cell Cycle 7, 3262–3272. https://doi.org/10.4161/cc.7.20.6852

Ramos, F., Villoria, M.T., Alonso-Rodríguez, E., Clemente-Blanco, A., 2019. Role of protein phosphatases PP1, PP2A, PP4 and Cdc14 in the DNA damage response. Cell Stress 3, 70–85. https://doi.org/10.15698/cst2019.03.178

Ranjha, L., Howard, S.M., Cejka, P., 2018. Main steps in DNA double-strand break repair: an introduction to homologous recombination and related processes. Chromosoma 127, 187–214. https://doi.org/10.1007/s00412-017-0658-1

Ratsima, H., Ladouceur, A.-M., Pascariu, M., Sauvé, V., Salloum, Z., Maddox, P.S., D'Amours, D., 2011. Independent modulation of the kinase and polo-box activities of Cdc5 protein unravels unique roles in the maintenance of genome stability. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 108. https://doi.org/10.1073/pnas.1106448108

Ratsima, H., Serrano, D., Pascariu, M., D'Amours, D., 2016. Centrosome-Dependent Bypass of the DNA Damage Checkpoint by the Polo Kinase Cdc5. Cell Rep 14, 1422–1434. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.01.014

Rawal, C.C., Riccardo, S., Pesenti, C., Ferrari, M., Marini, F., Pellicioli, A., 2016. Reduced kinase activity of polo kinase Cdc5 affects chromosome stability and DNA damage response in S. cerevisiae. Cell Cycle 15, 2906–2919. https://doi.org/10.1080/15384101.2016.1222338 Richardson, C., Horikoshi, N., Pandita, T.K., 2004. The role of the DNA double-strand break response network in meiosis. DNA Repair, BRIDGE OVER BROKEN ENDS - The Cellular Response to DNA Breaks in Health and Disease 3, 1149–1164. https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2004.05.007

Rincón, A.M., Monje-Casas, F., 2020. A guiding torch at the poles: the multiple roles of spindle microtubuleorganizing centers during cell division. Cell Cycle 19, 1405–1421. https://doi.org/10.1080/15384101.2020.1754586

Robellet, X., Thattikota, Y., Wang, F., Wee, T.-L., Pascariu, M., Shankar, S., Bonneil, É., Brown, C.M., D'Amours, D., 2015. A high-sensitivity phospho-switch triggered by Cdk1 governs chromosome morphogenesis during cell division. Genes Dev. 29, 426–439. https://doi.org/10.1101/gad.253294.114

Rock, J.M., Amon, A., 2011. Cdc15 integrates Tem1 GTPase-mediated spatial signals with Polo kinase-mediated temporal cues to activate mitotic exit. Genes Dev. 25, 1943–1954. https://doi.org/10.1101/gad.17257711

Rodriguez-Rodriguez, J.-A., Moyano, Y., Játiva, S., Queralt, E., 2016. Mitotic Exit Function of Polo-like Kinase Cdc5 Is Dependent on Sequential Activation by Cdk1. Cell Rep 15, 2050–2062. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.04.079

Rouse, J., Jackson, S.P., 2002. Lcd1p Recruits Mec1p to DNA Lesions In Vitro and In Vivo. Molecular Cell 9, 857–869. https://doi.org/10.1016/S1097-2765(02)00507-5

Roux, P., Salort, D., Xu, Z., 2021. Adaptation to DNA damage as a bet-hedging mechanism in a fluctuating environment. Royal Society Open Science 8, 210460. https://doi.org/10.1098/rsos.210460

Rubenstein, E.M., Schmidt, M.C., 2007. Mechanisms Regulating the Protein Kinases of Saccharomyces cerevisiae. Eukaryotic Cell 6, 571–583. https://doi.org/10.1128/EC.00026-07

Russell, P., Moreno, S., Reed, S.I., 1989. Conservation of mitotic controls in fission and budding yeasts. Cell 57, 295–303. https://doi.org/10.1016/0092-8674(89)90967-7

Sakchaisri, K., Asano, S., Yu, L.-R., Shulewitz, M.J., Park, C.J., Park, J.-E., Cho, Y.-W., Veenstra, T.D., Thorner, J., Lee, K.S., 2004. Coupling morphogenesis to mitotic entry. Proc Natl Acad Sci U S A 101, 4124–4129. https://doi.org/10.1073/pnas.0400641101

Sakuno, T., Hiraoka, Y., 2022. Rec8 Cohesin: A Structural Platform for Shaping the Meiotic Chromosomes. Genes 13, 200. https://doi.org/10.3390/genes13020200

Sanchez, A., Adam, C., Rauh, F., Duroc, Y., Ranjha, L., Lombard, B., Mu, X., Wintrebert, M., Loew, D., Guarné, A., Gnan, S., Chen, C.-L., Keeney, S., Cejka, P., Guérois, R., Klein, F., Charbonnier, J.-B., Borde, V., 2020. Exo1 recruits Cdc5 polo kinase to MutLγ to ensure efficient meiotic crossover formation. Proceedings of the National Academy of Sciences 117, 30577–30588. https://doi.org/10.1073/pnas.2013012117

Sanchez, Y., Bachant, J., Wang, H., Hu, F., Liu, D., Tetzlaff, M., Elledge, S.J., 1999. Control of the DNA Damage Checkpoint by Chk1 and Rad53 Protein Kinases Through Distinct Mechanisms. Science 286, 1166–1171. https://doi.org/10.1126/science.286.5442.1166

Sanchez, Y., Desany, B.A., Jones, W.J., Liu, Q., Wang, B., Elledge, S.J., 1996. Regulation of RAD53 by the ATM-like kinases MEC1 and TeL1 in yeast cell cycle checkpoint pathways. Science 271, 357–360. https://doi.org/10.1126/science.271.5247.357

Sandell, L.L., Zakian, V.A., 1993. Loss of a yeast telomere: Arrest, recovery, and chromosome loss. Cell 75, 729–739. https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90493-A

Shampay, J., Szostak, J.W., Blackburn, E.H., 1984. DNA sequences of telomeres maintained in yeast. Nature 310, 154–157. https://doi.org/10.1038/310154a0

Shapiro, R., 1981. Damage to DNA Caused by Hydrolysis. Seeberg, E., Kleppe, K. (Eds.), Chromosome Damage and Repair, NATO Advanced Study Institutes Series. Springer US, New York, NY, pp. 3–18. https://doi.org/10.1007/978-1-4684-7956-0_1

Shen, X., Mizuguchi, G., Hamiche, A., Wu, C., 2000. A chromatin remodelling complex involved in transcription and DNA processing. Nature 406, 541–544. https://doi.org/10.1038/35020123

Page | 258

Shirayama, M., Zachariae, W., Ciosk, R., Nasmyth, K., 1998. The Polo-like kinase Cdc5p and the WD-repeat protein Cdc20p/fizzy are regulators and substrates of the anaphase promoting complex in Saccharomyces cerevisiae. EMBO J 17, 1336–1349. https://doi.org/10.1093/emboj/17.5.1336

Shore, D., 1994. RAP1: a protean regulator in yeast. Trends in Genetics 10, 408–412. https://doi.org/10.1016/0168-9525(94)90058-2

Shroff, R., Arbel-Eden, A., Pilch, D., Ira, G., Bonner, W.M., Petrini, J.H., Haber, J.E., Lichten, M., 2004. Distribution and Dynamics of Chromatin Modification Induced by a Defined DNA Double-Strand Break. Current Biology 14, 1703–1711. https://doi.org/10.1016/j.cub.2004.09.047

Snead, J.L., Sullivan, M., Lowery, D.M., Cohen, M.S., Zhang, C., Randle, D.H., Taunton, J., Yaffe, M.B., Morgan, D.O., Shokat, K.M., 2007. A Coupled Chemical-Genetic and Bioinformatic Approach to Polo-like Kinase Pathway Exploration. Chemistry & Biology 14, 1261–1272. https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2007.09.011

Song, S., Grenfell, T.Z., Garfield, S., Erikson, R.L., Lee, K.S., 2000. Essential function of the polo box of Cdc5 in subcellular localization and induction of cytokinetic structures. Molecular and Cellular Biology 20, 286–298. https://doi.org/10.1128/MCB.20.1.286-298.2000.

Sørensen, C.S., Lukas, C., Kramer, E.R., Peters, J.-M., Bartek, J., Lukas, J., 2001. A conserved cyclin-binding domain determines functional interplay between anaphase-promoting complex–Cdh1 and cyclin A-Cdk2 during cell cycle progression. Molecular and cellular biology 21, 3692–3703. https://doi.org/ 10.1128/MCB.21.11.3692-3703.2001

Sorger, P.K., Murray, A.W., 1992. S-phase feedback control in budding yeast independent of tyrosine phosphorylation of p34cdc28. Nature 355, 365–368. https://doi.org/10.1038/355365a0

Spellman, P.T., Sherlock, G., Zhang, M.Q., Iyer, V.R., Anders, K., Eisen, M.B., Brown, P.O., Botstein, D., Futcher, B., 1998. Comprehensive Identification of Cell Cycle–regulated Genes of the Yeast Saccharomyces cerevisiae by Microarray Hybridization. MBoC 9, 3273–3297. https://doi.org/10.1091/mbc.9.12.3273

Stegmeier, F., Amon, A., 2004. Closing Mitosis: The Functions of the Cdc14 Phosphatase and Its Regulation. Annual Review of Genetics 38, 203–232. https://doi.org/10.1146/annurev.genet.38.072902.093051

Strathern, J.N., Klar, A.J.S., Hicks, J.B., Abraham, J.A., Ivy, J.M., Nasmyth, K.A., McGill, C., 1982. Homothallic switching of yeast mating type cassettes is initiated by a double-stranded cut in the MAT locus. Cell 31, 183–192. https://doi.org/10.1016/0092-8674(82)90418-4

Sullivan, M., Higuchi, T., Katis, V.L., Uhlmann, F., 2004. Cdc14 Phosphatase Induces rDNA Condensation and Resolves Cohesin-Independent Cohesion during Budding Yeast Anaphase. Cell 117, 471–482. https://doi.org/10.1016/S0092-8674(04)00415-5

Sumara, I., Giménez-Abián, J.F., Gerlich, D., Hirota, T., Kraft, C., de la Torre, C., Ellenberg, J., Peters, J.-M., 2004. Roles of Polo-like Kinase 1 in the Assembly of Functional Mitotic Spindles. Current Biology 14, 1712–1722. https://doi.org/10.1016/j.cub.2004.09.049

Sun, L., Bai, S., Chen, J., Deng, D., Luo, Z., Wang, Y., Jin, Q., 2022. A dual mechanism of APC/C inhibition by MAP kinases. bioRxiv. https://doi.org/10.1101/2022.04.01.485959

Sun, Z., Hsiao, J., Fay, D.S., Stern, D.F., 1998. Rad53 FHA domain associated with phosphorylated Rad9 in the DNA damage checkpoint. Science 281, 272–274. https://doi.org/10.1126/science.281.5374.272

Sunkel, C.E., Glover, D.M., 1988. polo, a mitotic mutant of Drosophila displaying abnormal spindle poles J Cell Sci. https://doi.org/10.1242/jcs.89.1.25

Syljuåsen, R.G., Jensen, S., Bartek, J., Lukas, J., 2006. Adaptation to the ionizing radiation-induced G2 checkpoint occurs in human cells and depends on checkpoint kinase 1 and Polo-like kinase 1 kinases. Cancer Res 66, 10253–10257. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-2144

Talhaoui, I., Bernal, M., Mazón, G., 2016. The nucleolytic resolution of recombination intermediates in yeast mitotic cells. FEMS Yeast Research 16, fow065. https://doi.org/10.1093/femsyr/fow065

Tao, R., Xue, H., Zhang, J., Liu, J., Deng, H., Chen, Y.G., 2013. Deacetylase Rpd3 Facilitates Checkpoint AdaptationbyPreventingRad53Overactivation.MolecularandCellularBiology33,4212–4224.https://doi.org/10.1128/MCB.00618-13

Teixeira, M.T., 2013. Saccharomyces cerevisiae as a Model to Study Replicative Senescence Triggered by Telomere Shortening. Frontiers in Oncology 3:101. https://doi.org/10.3389/fonc.2013.00101

Toczyski, D.P., Galgoczy, D.J., Hartwell, L.H., 1997. CDC5 and CKII Control Adaptation to the Yeast DNA Damage Checkpoint. Cell 90, 1097–1106. https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80375-X

Tolliday, N., VerPlank, L., Li, R., 2002. Rho1 Directs Formin-Mediated Actin Ring Assembly during Budding Yeast Cytokinesis. Current Biology 12, 1864–1870. https://doi.org/10.1016/S0960-9822(02)01238-1

Torrents, E., 2014. Ribonucleotide reductases: essential enzymes for bacterial life. Front Cell Infect Microbiol 4, 52. https://doi.org/10.3389/fcimb.2014.00052

Touati, S.A., Hofbauer, L., Jones, A.W., Snijders, A.P., Kelly, G., Uhlmann, F., 2019. Cdc14 and PP2A Phosphatases Cooperate to Shape Phosphoproteome Dynamics during Mitotic Exit. Cell Reports 29, 2105-2119.e4. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.10.041

Umezu, K., Sugawara, N., Chen, C., Haber, J.E., Kolodner, R.D., 1998. Genetic analysis of yeast RPA1 reveals its multiple functions in DNA metabolism. Genetics 148, 989–1005. https://doi.org/10.1093/genetics/148.3.989

Ünal, E., Arbel-Eden, A., Sattler, U., Shroff, R., Lichten, M., Haber, J.E., Koshland, D., 2004. DNA Damage Response Pathway Uses Histone Modification to Assemble a Double-Strand Break-Specific Cohesin Domain. Molecular Cell 16, 991–1002. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2004.11.027

Usui, T., Ogawa, H., Petrini, J.H.J., 2001. A DNA Damage Response Pathway Controlled by Tel1 and the Mre11 Complex. Molecular Cell 7, 1255–1266. https://doi.org/10.1016/S1097-2765(01)00270-2

Valerio-Santiago, M., de los Santos-Velázquez, A.I., Monje-Casas, F., 2013. Inhibition of the Mitotic Exit Network in Response to Damaged Telomeres. PLoS Genet 9, e1003859. https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003859

Vaze, M.B., Pellicioli, A., Lee, S.E., Ira, G., Liberi, G., Arbel-Eden, A., Foiani, M., Haber, J.E., 2002. Recovery from Checkpoint-Mediated Arrest after Repair of a Double-Strand Break Requires Srs2 Helicase. Molecular Cell 10, 373–385. https://doi.org/10.1016/S1097-2765(02)00593-2

Vazquez, A., Bond, E.E., Levine, A.J., Bond, G.L., 2008. The genetics of the p53 pathway, apoptosis and cancer therapy. Nat Rev Drug Discov 7, 979–987. https://doi.org/10.1038/nrd2656

Veinot-Drebot, L.M., Johnston, G.C., Singer, R.A., 1991. The RSF1 gene regulates septum formation in Saccharomyces cerevisiae. J Bacteriol 173, 2556–2561. https://doi.org/10.1128/jb.173.8.2556-2561.1991

Verma, N., Franchitto, M., Zonfrilli, A., Cialfi, S., Palermo, R., Talora, C., 2019. DNA Damage Stress: Cui Prodest? International Journal of Molecular Sciences 20, 1073. https://doi.org/10.3390/ijms20051073

Vialard, 1998. The budding yeast Rad9 checkpoint protein is subjected to Mec1/Tel1-dependent hyperphosphorylation and interacts with Rad53 after DNA damage. The EMBO Journal 17, 5679–5688. https://doi.org/10.1093/emboj/17.19.5679

Vidanes, G.M., Sweeney, F.D., Galicia, S., Cheung, S., Doyle, J.P., Durocher, D., Toczyski, D.P., 2010. CDC5 inhibits the hyperphosphorylation of the checkpoint kinase Rad53, leading to checkpoint adaptation. PLoS Biol 8, e1000286. https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000286

Visintin, R., Hwang, E.S., Amon, A., 1999. Cfi1 prevents premature exit from mitosis by anchoring Cdc14 phosphatase in the nucleolus. Nature 398, 818–823. https://doi.org/10.1038/19775

Visintin, R., Stegmeier, F., Amon, A., 2003. The Role of the Polo Kinase Cdc5 in Controlling Cdc14 Localization. Mol Biol Cell 14, 4486–4498. https://doi.org/10.1091/mbc.E03-02-0095

Vodenicharov, M.D., Laterreur, N., Wellinger, R.J., 2010. Telomere capping in non-dividing yeast cells requires Yku and Rap1. EMBO J 29, 3007–3019. https://doi.org/10.1038/emboj.2010.155

Vugt, M.A.T.M. van, Medema, R.H., 2004. Checkpoint Adaptation and Recovery: Back with Polo after the Break. Cell Cycle 3, 1383–1386. https://doi.org/10.4161/cc.3.11.1248

Walters, A.D., May, C.K., Dauster, E.S., Cinquin, B.P., Smith, E.A., Robellet, X., D'Amours, D., Larabell, C.A., Cohen-Fix, O., 2014. The Yeast Polo Kinase Cdc5 Regulates the Shape of the Mitotic Nucleus. Current Biology 24, 2861– 2867. https://doi.org/10.1016/j.cub.2014.10.029

Wang, E., Kawaoka, S., Yu, M., Shi, J., Ni, T., Yang, W., Zhu, J., Roeder, R.G., Vakoc, C.R., 2013. Histone H2B ubiquitin ligase RNF20 is required for MLL-rearranged leukemia. Proceedings of the National Academy of Sciences 110, 3901–3906. https://doi.org/10.1073/pnas.1301045110

Wang, H., Liu, D., Wang, Y., Qin, J., Elledge, S.J., 2001. Pds1 phosphorylation in response to DNA damage is essential for its DNA damage checkpoint function. Genes Dev 15, 1361–1372. https://doi.org/10.1101/gad.893201

Wang, H., Qiu, Z., Liu, B., Wu, Y., Ren, J., Liu, Y., Zhao, Y., Wang, Y., Hao, S., Li, Z., Peng, B., Xu, X., 2018. PLK1 targets CtIP to promote microhomology-mediated end joining. Nucleic Acids Research 46, 10724–10739. https://doi.org/10.1093/nar/gky810

Ward, J.F., 1990. The Yield of DNA Double-strand Breaks Produced Intracellularly by Ionizing Radiation: A Review. International Journal of Radiation Biology 57, 1141–1150. https://doi.org/10.1080/09553009014551251

Ward, J.F., 1988. DNA Damage Produced by Ionizing Radiation in Mammalian Cells: Identities, Mechanisms of Formation, and Reparability, in: Cohn, W.E., Moldave, K. (Eds.), Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology. Academic Press, pp. 95–125. https://doi.org/10.1016/S0079-6603(08)60611-X

Waterman, D.P., Haber, J.E., Smolka, M.B., 2020. Checkpoint responses to DNA double-strand breaks. Annu Rev Biochem 89, 103–133. https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-011520-104722

Weinert, T.A., Hartwell, L.H., 1988. The RAD9 Gene Controls the Cell Cycle Response to DNA Damage in Saccharomyces cerevisiae. Science 241, 317–322. https://doi.org/10.1126/science.3291120

Wellinger, R.J., Zakian, V.A., 2012. Everything You Ever Wanted to Know About Saccharomyces cerevisiae Telomeres: Beginning to End. Genetics 191, 1073–1105. https://doi.org/10.1534/genetics.111.137851

Westmoreland, J.W., Mihalevic, M.J., Bernstein, K.A., Resnick, M.A., 2018. The global role for Cdc13 and Yku70 in preventing telomere resection across the genome. DNA Repair 62, 8–17. https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2017.11.010

Whibley, C., Pharoah, P.D.P., Hollstein, M., 2009. p53 polymorphisms: cancer implications. Nat Rev Cancer 9, 95–107. https://doi.org/10.1038/nrc2584

Winge, 1949. A gene for diploidization in yeasts. Comptes Rendus Des Travaux Du Laboratoire Carlsberg. Serie Physiologique 24:341–346.

Wolfe, K.H., Butler, G., 2022. Mating-Type Switching in Budding Yeasts, from Flip/Flop Inversion to Cassette Mechanisms. Microbiol Mol Biol Rev 86, e0000721. https://doi.org/10.1128/mmbr.00007-21

Wood, A.J., Lo, T.-W., Zeitler, B., Pickle, C.S., Ralston, E.J., Lee, A.H., Amora, R., Miller, J.C., Leung, E., Meng, X., Zhang, L., Rebar, E.J., Gregory, P.D., Urnov, F.D., Meyer, B.J., 2011. Targeted Genome Editing Across Species Using ZFNs and TALENs. Science 333, 307–307. https://doi.org/10.1126/science.1207773

Wright, W.E., Shay, J.W., 2000. Telomere dynamics in cancer progression and prevention: fundamental differences in human and mouse telomere biology. Nat Med 6, 849–851. https://doi.org/10.1038/78592

Wu, L., Luo, K., Lou, Z., Chen, J., 2008. MDC1 regulates intra-S-phase checkpoint by targeting NBS1 to DNA doublestrand breaks. Proceedings of the National Academy of Sciences 105, 11200–11205. https://doi.org/10.1073/pnas.0802885105

Wu, N., Yu, H., 2012. The Smc complexes in DNA damage response. Cell Biosci 2, 5. https://doi.org/10.1186/2045-3701-2-5 Wulff, D.L., Rupert, C.S., 1962. Disappearance of thymine photodimer in ultraviolet irradiated DNA upon treatment with a photoreactivating enzyme from Baker's yeast. Biochemical and Biophysical Research Communications 7, 237–240. https://doi.org/10.1016/0006-291X(62)90181-X

Wullschleger, S., Loewith, R., Hall, M.N., 2006. TOR signaling in growth and metabolism. Cell 124, 471–484. https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.01.016

Wyatt, M.D., Pittman, D.L., 2006. Methylating Agents and DNA Repair Responses: Methylated Bases and Sources of Strand Breaks. Chem. Res. Toxicol. 19, 1580–1594. https://doi.org/10.1021/tx060164e

Xu, J., Shen, C., Wang, T., Quan, J., 2013. Structural basis for the inhibition of Polo-like kinase 1. Nat Struct Mol Biol 20, 1047–1053. https://doi.org/10.1038/nsmb.2623

Yamamoto, A., Guacci, V., Koshland, D., 1996. Pds1p, an inhibitor of anaphase in budding yeast, plays a critical role in the APC and checkpoint pathway(s). J Cell Biol 133, 99–110. https://doi.org/10.1083/jcb.133.1.99

Yelamanchi, S.K., Veis, J., Anrather, D., Klug, H., Ammerer, G., 2014. Genotoxic Stress Prevents Ndd1-Dependent Transcriptional Activation of G 2 /M-Specific Genes in Saccharomyces cerevisiae. Mol Cell Biol 34, 711–724. https://doi.org/10.1128/MCB.01090-13

Yolanda, H., Krajaejun, T., 2020. Review of methods and antimicrobial agents for susceptibility testing against Pythium insidiosum. Heliyon 6, e03737. https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e03737

Yoo, H.Y., Kumagai, A., Shevchenko, Anna, Shevchenko, Andrej, Dunphy, W.G., 2004. Adaptation of a DNA Replication Checkpoint Response Depends upon Inactivation of Claspin by the Polo-like Kinase. Cell 117, 575–588. https://doi.org/10.1016/S0092-8674(04)00417-9

Yoshida, 2002. Budding yeast Cdc5 phosphorylates Net1 and assists Cdc14 release from the nucleolus - ScienceDirect https://doi.org/10.1016/S0006-291X(02)00544-2

Yoshida, K., Fujita, M., 2021. DNA damage responses that enhance resilience to replication stress. Cell. Mol. Life Sci. 78, 6763–6773. https://doi.org/10.1007/s00018-021-03926-3

Zapata, J., Dephoure, N., MacDonough, T., Yu, Y., Parnell, E.J., Mooring, M., Gygi, S.P., Stillman, D.J., Kellogg, D.R., 2014. PP2ARts1 is a master regulator of pathways that control cell size. Journal of Cell Biology 204, 359–376. https://doi.org/10.1083/jcb.201309119

Zhang, T., Nirantar, S., Lim, H.-H., Sinha, I., Surana, U., 2009. DNA damage checkpoint maintains CDH1 in an active state to inhibit anaphase progression. Developmental cell 17 4, 541–51. https://doi.org/10.1016/j.devcel.2009.09.006

Zhao, Y., Boguslawski, G., Zitomer, R.S., DePaoli-Roach, A.A., 1997. Saccharomyces cerevisiae Homologs of Mammalian B and B' Subunits of Protein Phosphatase 2A Direct the Enzyme to Distinct Cellular Functions. Journal of Biological Chemistry 272, 8256–8262. https://doi.org/10.1074/jbc.272.13.8256

Zheng, X.F., Florentino, D., Chen, J., Crabtree, G.R., Schreiber, S.L., 1995. TOR kinase domains are required for two distinct functions, only one of which is inhibited by rapamycin. Cell 82, 121–130. https://doi.org/10.1016/0092-8674(95)90058-6

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, 981–994. https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.08.037

Zou, L., Elledge, S.J., 2003. Sensing DNA damage through ATRIP recognition of RPA-ssDNA complexes. Science 300, 1542–1548. https://doi.org/10.1126/science.1083430

Zubko, M.K., Guillard, S., Lydall, D., 2004. Exo1 and Rad24 Differentially Regulate Generation of ssDNA at Telomeres of Saccharomyces cerevisiae cdc13-1 Mutants. Genetics 168, 103–115. https://doi.org/10.1534/genetics.104.027904

Annexes

o)

O

O °

ρ

Ø

b

) م

ر کار

Jr.

l N



Dessin créé pour le carton d'invitation de la Conférence de Presse organisée par les Archives Nationales pour placer les capsules contenant les textes-ADN dans l'Armoire de Fer, aux côtés du texte original de La déclaration des droits de l'homme et du citoyen.

Aux côtés de mes travaux de thèse menés sur ces trois années, j'ai aussi travaillé à la rédaction d'un article issu de résultats de recherches que j'avais menées avant mon doctorat, au sein de l'équipe de Stéphane Lemaire à l'IBPC. Zhou Xu, travaillant alors dans une autre équipe, a contribué à ces travaux. C'est en raison de la double participation de Zhou Xu et de moimême, mais aussi de ma forte implication dans ce projet, en tant que co-premier autrice du papier, que figure ici l'article en question. Il s'agit de la présentation de notre DNA Drive - technologie que nous avons brevetée (Lemaire, Crozet, Xu, Maes et Le Peillet, 2021) (WO/2021/064095) qui permet de stocker de l'information numérique sous forme d'ADN et d'accéder ensuite à l'information stockée de manière similaire à un disque dur. La preuve de concept que nous avons présentée s'appuie sur l'encodage et la restitution des textes de La déclaration des droits de l'homme et du citoyen (1789) et de La déclaration des droits de la femme et de la citoyenne (Olympe de Gouges 1791) (Maes, Le Peillet et al., 2022).

Ces recherches ont été médiatisées auprès du grand public et une remise de ces textes-ADN aux Archives Nationales de Paris a été célébrée en novembre 2021.

La révolution de l'ADN: biocompatible and biosafe DNA data storage

Alexandre Maes^{1†}, Jeanne Le Peillet^{1,2†}, Achille Julienne^{2,3}, Clémence Blachon², Nicolas

Cornille^{2,3}, Mariette Gibier², Erfane Arwani³, Zhou Xu^{1,2}, Pierre Crozet^{1,2,3,4*}, Stéphane D.

Lemaire1,2,3*

¹Sorbonne Université, CNRS, UMR8226, Institut de Biologie Physico-Chimique, Laboratoire de Biologie Moléculaire et Cellulaire des Eucaryotes; Paris, France

²Sorbonne Université, CNRS, UMR7238, Institut de Biologie Paris-Seine, Laboratoire de Biologie Computationnelle et Quantitative; Paris, France

³Biomemory; Paris, France

⁴Polytech Sorbonne, Sorbonne Université; Paris, France

*Corresponding authors:

stephane.lemaire@sorbonne-universite.fr pierre.crozet@sorbonne-universite.fr

⁺These authors contributed equally to this work

Abstract:

DNA data storage is an emerging technology that has the potential to replace bulky, fragile and energy-intensive current digital data storage media. Here, we report a storage strategy called DNA Drive, that organizes data on long double stranded replicative DNA molecules. The DNA Drive has unlimited storage capacity, and its encoding scheme ensures the biosafety of the process by limiting the potential of the DNA sequence to code for mRNA and proteins. Using our approach, we encoded two historical texts from the French Revolution, the Declaration of the Rights of Man and of the Citizen of 1789 and the Declaration of the Rights of Woman and of the Female Citizen published in 1791. In contrast to previous DNA storage strategies, the biocompatibility of the DNA Drive enables biological manipulation of the data including low cost copy.

One-Sentence Summary:

The DNA Drive is a biosafe and biocompatible DNA data storage strategy with unlimited storage capacity.

Main Text:

The storage of digital data is a major challenge in our modern societies. Current digital media stored in data centers are fragile, bulky and energy-intensive. The lifespan of current digital media storage systems (optical media, magnetic tapes, hard disk drives or flash memory) does not exceed 5 seven years on average. Hence, these data must be regularly copied and kept at constant temperature and humidity resulting in a colossal energy cost. Data centers consume 2% of the world's electricity, and their carbon footprint exceeds that of civil aviation (1). The ongoing digital transformation of our societies requires a major disruption of digital storage technologies. DNA is the media used by living organisms to store genetic information. DNA data storage is an emerging technology that is stable for thousands of years, extremely compact and energy-efficient. DNA stability outcompetes any man-made media, as exemplified by the recovery of a near-complete genome from a 1-million-year-old mammoth (2). With a maximal density of 4.5 x 10^{20} bytes, *i.e.* 0.45 Zettabytes (ZB) equivalent to 450 x 10^6 Terabytes (TB) per gram of DNA, all of humanity's digital data in 2019 (45 ZB) could fit in 100 g of DNA (3). Moreover, DNA storage does not 15 require energy since these molecules are perfectly stable at room temperature under appropriate conditions (4, 5).

The first significant demonstration of DNA data storage was published in 2012 (6). Since then a number of studies improved encoding algorithms and barcoding, enabling error correction, direct access and compression (7-13). Until now, DNA storage has been carried out mainly using 20 chemically synthesized oligonucleotide pools (short single stranded DNA sequences < 200 bases), which are stored and read *in vitro*. While this approach validated the feasibility of

DNA data storage, it has several limitations including a low density and rather limited and expensive editing and copying capabilities. In order to overcome these limitations, we aim at using the biological processes and properties of living organisms to meet the challenges of storing data on DNA.

Our original DNA storage strategy, named DNA Drive, uses long replicative double stranded DNA molecules as a physical support compatible with both *in vitro* and *in vivo* manipulation (Fig.1).

Once built, the molecules can be introduced in living organisms, enabling their manipulation using *in vivo* processes, *e.g.* for copy or edition. The DNA Drive allows an ordered physical multi-scale organization of the data on DNA molecules supporting theoretically unlimited drive size, enabling random access and facilitating assembly after sequencing (Fig. 2).

Several studies reported the storage of data on replicative DNA molecules (14-17), but none have considered the possibility that the DNA sequence could encode unwanted biological information as recently demonstrated (18). This could represent a risk for the host organism, resulting in data loss, or even a risk for the manipulator or the environment. Accordingly, we developed for the DNA Drive an encoding algorithm that limits the coding potential of the sequence by removal of transcription and translation initiation sequences, and addition of translation termination signals (Fig. 1 and 3). Hence, encoding and assembly are performed using a biocompatible and biosafe algorithm named RISE (Random In-Silico Evolution), which allows conversion of binary data into nucleotide sequences while ensuring the compatibility of the sequence with (i) DNA synthesis and sequencing technologies, (ii) the physical assembly of DNA molecules from isolated data blocks, and (iii) the biosafe manipulation of these biocompatible molecules in living organisms. Structurally, the DNA Drive is composed of storage units called sectors (Fig. 2). Each sector is composed of a data-block (DB) of adjustable length (B) were the digital information is stored. This DB is flanked by two system blocks (SB, length S), two index blocks (IB, length I), and two fusion sites (FS, length F). Sectors are assembled into circular replicative molecules called tracks, using the flanking fusion sites. The size of a track (TS) is the number of sectors per track. Multiple tracks are pooled together and the pool size (PS) is determined by the number of available index blocks in the DNA Drive. The DNA Drive is sequenced at the pool level to recover data. Pools are physically organized into arrays of size AS, numbered from 1 to A, and their total number is theoretically unlimited. The structure of the DNA Drive is described by the B-I-F-TS-PS-AS-A parameters (Fig. 2).

Each bit of the binary file is converted into DNA using the one bit per base Church-Gao-Kosuri (CGK) encoding scheme (4) attributing randomly A or C for 0 and T or G for 1. Combinatorial effect of the CGK method confers flexibility in the conversion of binary information into DNA, allowing to apply multiple constraints on the final sequence, which are necessary for (i) DNA 10 synthesis and sequencing (limitation of homopolymer length, controlled GC content), (ii) DNA assembly (forbidden restriction sites) and (iii) DNA biosafety (limiting transcription and translation). The amount of conversion alternatives (2ⁿ DNA sequences for one binary sequence of length n) and the variety of constraints requires a random exploratory method, described in this study as the Random Iterative in-Silico Evolution (RISE).

To demonstrate the efficiency of our DNA storage system, we physically constructed two DNA Drives containing historical founding texts from the French Revolution: "La Déclaration des droits de l'homme et du citoyen" (1789) (The Declaration of the Rights of Man and of the Citizen) and "La Déclaration des droits de la femme et de la citoyenne" (Olympe de Gouges, 1791), i.e. the Declaration of the Rights of Woman and of the Female Citizen. The two DNA Drives were assembled and stored dried in metallic minicapsules (DNAshell[®] from Imagene) ensuring their stability for thousands of years (4). The data could be read many times with 100% fidelity. "La Déclaration des droits de l'homme et du citoyen" (DDHC.txt, 5,253 bytes) and "La Déclaration des droits de la femme et de la citoyenne" (DDFC.txt, 28,763 bytes) were used to illustrate file storage into a DNA Drive of 3.24 Gb, structurally described as B3000S1I25TS9PS10000AS96A1 using the B-I-F-TS-PS-AS-A parameters (Fig. 2). Both files were compressed using the Lempel-Ziv-Markov chain algorithm (LZMA) to limit file size and bit repetitions. Chunks of 375 bytes (3,000 bits) were contiguously allocated to DNA Drive sectors (7 sectors on one track for DDHC.lzma, 2,293 bytes, and 31 sectors on 4 tracks for DDFC.lzma, 11,377 bytes, Fig. S1 and S2 respectively) and converted to DNA by an initial random CGK conversion. However, the DNA sequences generated from the binary file by random CGK draws do not meet the constraints in terms of coding potential, GC content, homopolymers or absence of specific restriction sites (Fig. S3 to S9). The RISE algorithm was designed to iteratively modify the nucleotide sequence and allow convergence towards a biocompatible and biosafe sequence without modification of the binary data (Fig. S10). The RISE constraint parameters employed are detailed in Fig. 2. The coding potential was decreased by removing *E. coli* σ^{70} and σ^{54} -10 motifs to limit RNA production (*19*), by removing translation start codons (ATG, GTG, CTG), and by addition of translation stop codons to yield a DB sequence with at least one stop codon every 180 nucleotides in all 6 reading frames. To limit read and write errors, the GC content was locally adjusted to that of E. coli and the maximum homopolymer length was limited to 3 nucleotides. Specific restriction site sequences were also removed to facilitate in vitro DNA manipulation. Practically, the RISE algorithm scans for the presence or absence of specific features, which are then removed or added respectively without altering the binary data, by replacing a nucleotide by its binary synonym, *i.e.* either A by C, or G by T, or C by A, or T by G (Fig. S10). For feature removal, one random nucleotide is swapped in the sequence. For feature addition, a random synonymous sequence is swapped around a seeding position. Because random synonymous modifications can create new incompatible features, multiple iterations are necessary to produce a complete biocompatible sequence that follows the specifications of the DNA Drive (Fig. S11 and S12). During RISE, hotspots of compatibilization changes are observed along sectors on both strands, with a dominance in GC content adjustment and translation start codon removal (Fig. 3A, Fig. S13). These two constraints are highly predominant during the initial steps of sequence evolution (Fig. 3E). Relaxation of homopolymer length threshold results in a slight increase of RISE efficiency (Fig. 3B). Extreme GC constraints induce a deeper combinatory exploration, resulting in a large increase of RISE cycles and swaps (Fig. S12B). Therefore, GC adjustment is allowed in a large GC window from 40% to 70% GC (Fig. 3C). Multiple RISE simulations on the same initial draw results in various final compatible sequences indicating that random driven processes of RISE allow various paths of compatibilization (Fig. S11). Still, overall compatibilization is homogeneously spread along all the sectors. Successful RISE is reached for all sectors and both files independently of the initial random draw with a mean of 1.84 and 1.78 swaps/base for DDHC and DDFC respectively (Fig. 3, Fig. S11, S12A, S13). To provide random access to each DB through PCR amplification and facilitate sequence assembly after sequencing, each DB is flanked by a pair of 25-mers barcodes named index blocks (IB, Fig. 2). An ordered collection of 90,000 pairs of IB (Table S1), devoid of homopolymers and forbidden restriction sites, was established by filtering of a previously published library of 240,000 barcodes (20). This ordered collection enables random access to any sector in a pool of tracks containing a total of 90,000 DB, for instance a pool size of 10,000 plasmids of 9 sectors. System blocks (SB) are attributed to a random nucleotide, used as a wild card to overcome unsolvable combinations at the junction between data-blocks and ordered barcodes (Fig. 2). Ten 4-mer sequences were used as fusion sites to assemble 9 sectors in a single plasmid. These specifications confer a storage density of 0.98 bit per base. Each sector was synthesized chemically, assembled and cloned by Twist Bioscience (San Francisco, USA), together with its flanking fusion sites and a Bsal restriction site allowing releaseof the sector with protruding fusion sites. Each track was assembled using Golden Gate cloning (21) in a replicative plasmid, which was amplified in E. coli and extracted using DNA maxipreparations to obtain billions of copies of each track. These low-cost copies enabled generation of 250 copies of each DNA Drive, composed of one track for DDHC (50 µg of plasmid DNA, *i.e.* 2500 billion copies of the file per DNA Drive) and 4 tracks for DDFC (5 µg, i.e. 100 billion copies per DNA Drive). The DNA of each DNA Drive was lyophilized and encapsulated in DNAShell[®] metallic minicapsules by Imagene SA (Evry, France) to ensure their conservation at ambient temperatures for thousands of years (4, 5). After conservation of the capsules at ambient temperatures for several months (up to 6 months), a capsule was opened, DNA was resuspended in pure water and a fraction was sequenced using an Oxford Nanopore MinION[™] sequencer (Oxford Nanopore Technologies, Oxford, UK) (Fig. S14). Basecalled reads were mapped to tracks according to their barcodes. Assembled and polished sequences were then used to generate high accuracy DB sequences. The nucleotide sequence of each DB was converted to binary sequences using the CGK decoding scheme (A=C=0, G=T=1) and the binary file obtained by combining contiguous chunks was then uncompressed with the LZMA algorithm. The original file could be recovered at 100% with no error for each DNA Drive sequenced, demonstrating the robustness of the DNA preservation in DNAShell minicapsules and the efficiency and reliability of the DNA Drive storage strategy. To explore the storage ability of the DNA Drive, experimental and simulated sequencing depth revealed that the B3000S1I25TS9PS10000AS96A1 configuration is suitable for MinION sequencer for complete data recovery (Fig. S14). Future qualitative and quantitative advances in long-read sequencing (basecalling, read length, sequence coverage, assembly and polishing) will allow to continuously increase the storage ability of the DNA Drive pools.

The two capsules containing the DNA Drives of the Declaration of the Rights of Man and of the Citizen (1789) and the Declaration of the Rights of Woman and of the Female Citizen (1791) were registered officially at the French National Archives on November the 23rd, 2021.

They were deposited in the 1790 safe, *"l'Armoire de fer"*, next to the original paper version of the Declaration of the Rights of Man and of the Citizen from 1789. These two texts are now preserved for thousands of years with no energy input.

References and notes:

- 1. Académie des Technologies, "Archiving big data beyond 2040: DNA as a candidate," (Académie des Technologies, Paris, France, 2020).
- 2. T. van der Valk *et al.*, Million-year-old DNA sheds light on the genomic history of mammoths. *Nature* **591**, 265-269 (2021).

3. D. Reinsel, J. Gantz, J. Rydning, "The Digitization of the World From Edge to Core," (International Data Corporation, 2020).

- 4. D. Coudy, M. Colotte, A. Luis, S. Tuffet, J. Bonnet, Long term conservation of DNA at ambient temperature. Implications for DNA data storage. *PLoS One* **16**, e0259868 (2021).
- 5. L. Organick *et al.*, An Empirical Comparison of Preservation Methods for Synthetic DNA Data Storage.

Small Methods 5, e2001094 (2021).

- 6. G. M. Church, Y. Gao, S. Kosuri, Next-generation digital information storage in DNA. *Science* **337**, 1628 (2012).
- 7. N. Goldman *et al.*, Towards practical, high-capacity, low-maintenance information storage in synthesized DNA. *Nature* **494**, 77-80 (2013).

8. R. N. Grass, R. Heckel, M. Puddu, D. Paunescu, W. J. Stark, Robust chemical preservation of digital information on DNA in silica with error-correcting codes. *Angew Chem Int Ed Engl* **54**, 2552-2555 (2015).

- 9. M. Blawat *et al.*, Forward Error Correction for DNA Data Storage. *Procedia Computer Science* **80**, 10111022 (2016).
- Y. Erlich, D. Zielinski, DNA Fountain enables a robust and efficient storage architecture. *Science* 355, 950-

954 (2017).

- 11. S. Yazdi, R. Gabrys, O. Milenkovic, Portable and Error-Free DNA-Based Data Storage. *Scientific reports* **7**, 5011 (2017).
- L. Organick *et al.*, Random access in large-scale DNA data storage. *Nat Biotechnol* **36**, 242-248 (2018).
 J. Koch *et al.*, A DNA-of-things storage architecture to create materials with embedded memory. *Nat Biotechnol* **38**, 39-43 (2020).
- 14. W. Chen *et al.*, An artificial chromosome for data storage. *Natl Sci Rev* **8**, nwab028 (2021).
- 15. M. Hao *et al.*, A mixed culture of bacterial cells enables an economic DNA storage on a large scale. *Commun Biol* **3**, 416 (2020).
- 16. S. L. Shipman, J. Nivala, J. D. Macklis, G. M. Church, CRISPR-Cas encoding of a digital movie into the 40 genomes of a population of living bacteria. *Nature* **547**, 345-349 (2017).
- 17. J. Davis *et al., In vivo* multi-dimensional information-keeping in *Halobacterium salinarum*. *bioRxiv*, 2020.2002.2014.949925 (2020).
- 18. J. Zhou *et al.*, Exogenous artificial DNA forms chromatin structure with active transcription in yeast. *Sci China Life Sci*, (2021).
- 19. R. R. Burgess, in *Encyclopedia of Genetics,* S. Brenner, J. H. Miller, Eds. (Academic Press, New York, 2001), pp. 1831-1834.

20. Q. Xu, M. R. Schlabach, G. J. Hannon, S. J. Elledge, Design of 240,000 orthogonal 25mer DNA barcode probes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 2289-2294 (2009).

- 21. C. Engler, R. Kandzia, S. Marillonnet, A one pot, one step, precision cloning method with high throughput capability. *PLoS One* **3**, e3647 (2008).
- 22. N. J. Patron *et al.*, Standards for plant synthetic biology: a common syntax for exchange of DNA parts.

New Phytol 208, 13-19 (2015).

- 23. E. Weber, C. Engler, R. Gruetzner, S. Werner, S. Marillonnet, A modular cloning system for standardized assembly of multigene constructs. *PLoS One* **6**, e16765 (2011).
- 24. S. Werner, C. Engler, E. Weber, R. Gruetzner, S. Marillonnet, Fast track assembly of multigene constructs using Golden Gate cloning and the MoClo system. *Bioengineered bugs* **3**, 38-43 (2012).

Acknowledgments:

The authors would like to thank Bruno Ricard, Françoise Banat-Berger and their colleagues from Archives Nationales for their strong and enthusiastic support for this work. We also thank Dr. Geneviève Fraisse, Pr. Raphaël Ersham, Olivier Blanc, and Marcel Gauchet for their help for digitization of the texts. We thank Marthe Colotte and Sophie Tuffet from Imagene for encapsulation of the DNA Drive. We thank Emily Leproust and Twist Bioscience for synthesis of the DNA Drive fragments. We also thank Claire de Thoisy-Méchin and Marion Valzy for their help with communication. Overall, we thank all the persons that have provided their enthusiastic support for this project.

Funding:

This work was funded by grant "DNA Drive" from SATT Lutech to SDL, by emergence grant "DNA SYSTEM" from Sorbonne Université to SDL and by special funding from Sorbonne Université Faculté des Sciences and from Mission pour l'interdisciplinarité du CNRS to SDL.

Author contributions:

Conceptualization: AM, JLP, ZX, SDL, PC Methodology: AM, JLP, AJ, SDL, PC Investigation: AM, JLP, AJ, CB, NC, MG, PC Visualization: AM, JLP, AJ, CB Funding acquisition: SDL, PC, EA Project administration: SDL, PC, EA Supervision: SDL, PC Writing – original draft: AM, JLP, AJ, SDL, PC

Competing interests:

SDL, PC, ZX, AM and JLP have filed a patent application for the DNA Drive technology presented in this work. EA, PC and SDL declare the following competing interests: founders of Biomemory. AJ and NC declare the following competing interests: employed by Biomemory.

JLP declares the following competing interests: founder of BeInk. Other authors declare that they have no competing interests.

Data and materials availability:

All important data are available in the main text or the supplementary materials. Plasmids and raw data will be made available upon request. Code is available at https://github.com/alexmaes/RISE.



Fig. 1. Overall DNA Drive storage process from file to file.

The binary file is converted to a biosafe and biocompatible DNA sequence, synthesized, assembled on plasmids, amplified biologically, extracted and stored. Reading of the file is performed by DNA sequencing and conversion of the obtained sequence to the binary file.



Fig. 2. Structure and constraints of the DNA Drive.

Binary data are converted to DNA by CGK conversion and stored into DNA Drive datablocks of size B. Each datablock is flanked by two system blocks (SB), two index blocks (IB) and two fusion sites (FS) located upstream (up) or downstream (dw) of the datablock. TS (Track Size) sectors are assembled into replicative molecules called tracks. PS (Pool Size) tracks corresponding to a unique set of index blocks are grouped into a pool. AS (Array Size) pools are physically assembled into A arrays to constitute the DNA Drive. Compatibilization is performed by removing motifs (r), adding motifs (a) or adjusting GC content (g) to ensure optimal DNA synthesis/sequencing (s), DNA construction (c) and biosafety (b).



Fig. 3 Biosafe and biocompatible encoding of DDHC.

Full biocompatibilization of the 7 sectors of DDHC by adding or removing motifs on both strands and adjusting GC content. During RISE, nucleotides can be swapped into their binary synonym without altering digital information. A. Number and nature of swap positions (inner circle, mean number of swaps in a sliding window of 30 bp; see legend insert for colors) and GC content evolution (outer circle) during RISE. The color scale indicates whether the swaps for GC content were performed early or late during RISE. B. Parameters of RISE simulations of DDHC for various repeat length thresholds (N=40). The Hamming distance (H distance) was computed between the initial and the final fully compatible sequence. Swaps are the number of nucleotide exchanges during all iterations. The cycles indicate the number of RISE iterations. C. Parameters of RISE simulations for various final GC content +/- 10 % (N=20). D. RISE report for all sectors of track 1 for independent initial CGK random draws

(N=40). Note that sector 7 is smaller than the others. E. Number of swaps performed for each constraint during iterative evolution of RISE on DDHC. For A, D and E the constraints are described in Fig. 2. The box and whisker plots show the 10th (lower whisker), 25th (base of box), 75th (top of box) and 90th (top whisker) percentiles. Outliers are plotted as individual data points. Hamming (H) distance is computed between the initial and final fully compatible sequence.

Jeanne Le Peillet

Résumé en français

Lorsque l'ADN d'une cellule est endommagé, des mécanismes de protection détectent le dommage et arrêtent le cycle cellulaire en phase G2/M, donnant du temps pendant lequel la cellule peut réparer le dommage. Lorsque la réparation est impossible, un autre processus permet de contourner l'arrêt de ce point de contrôle et de reprendre la division cellulaire malgré la persistance du dommage : il s'agit de l'adaptation au dommage à l'ADN. L'adaptation peut être vue comme une dernière chance de survie pour la cellule, mais provoque mutations et instabilités génomiques chez les cellules filles. L'équipe a récemment découvert que l'adaptation, en permettant aux cellules de survivre malgré la présence d'un dommage à l'ADN, est un facteur important de l'augmentation du taux de mutation en sénescence. De plus, les cellules cancéreuses pourraient avoir des mécanismes d'adaptation renforcés, contribuant à l'accumulation de mutations nécessaires à la progression des tumeurs et à la résistance à la chimiothérapie. Chez la levure bourgeonnante, la polo-kinase Cdc5, protéine essentielle assurant de multiples fonctions au cours du cycle cellulaire, est un acteur clef de l'adaptation au dommage à l'ADN.

Nos travaux s'organisent autour de deux axes principaux, le premier visant à déterminer les régulations de Cdc5 spécifiques de l'adaptation, et le second à élucider les voies impliquées dans ce processus. L'ensemble de nos résultats nous à permet de montrer que Cdc5 est régulée de manière spécifique à l'adaptation, que ce soit au niveau post-traductionnel par phosphorylation, ou au niveau transcriptionnel par Mcm1-Fkh2-Ndd1 et Rad53 au sein du cluster *CLB2*. Par ailleurs, nous avons révélé que le complexe MRX est impliqué dans l'adaptation, selon un mécanisme qui semble lié à Cdc5. D'autres complexes et voies, qu'ils soient ou non directement liés à Cdc5, jouent également un rôle dans l'adaptation : c'est le cas tels que le complexe APC/C, la cohésine, les voies Cvt, GARP et TORC1.

L'adaptation est un phénomène d'une grande complexité, impliquant une diversité surprenante de mécanismes et de facteurs. Nos travaux proposent un ensemble de pistes pour poursuivre l'investigation de l'adaptation au dommage à l'ADN.

Mots clefs : dommage à l'ADN ; Cdc5 ; polo kinase ; adaptation ; checkpoint

Résumé en anglais

When the DNA of a cell is damaged, protective mechanisms detect the damage and stop the cell cycle in the G2/M phase, providing time for the cell to repair the damage. When repair is not possible, another process allows the cell to bypass this checkpoint arrest and resume cell division despite the persistence of the damage: adaptation to DNA damage. Adaptation can be seen as a last chance for the cell to survive, but causes mutations and genomic instabilities in the daughter cells. The team recently found that adaptation, by allowing cells to survive in the presence of DNA damage, contributes to the increase of mutation rate in senescence. In addition, cancer cells may have enhanced adaptative mechanisms, contributing to the accumulation of mutations necessary for tumour progression and resistance to chemotherapy. In budding yeast, the polo kinase Cdc5, an essential protein with multiple functions during the cell cycle, is a key player in adaptation to DNA damage.

Our work is organised around two main axes, the first aiming to determine the specific regulations of Cdc5 during adaptation, and the second to elucidate the pathways involved in this process. Our results show that Cdc5 is specifically regulated during adaptation, either at the post-translational level by phosphorylation or at the transcriptional level by Mcm1-Fkh2-Ndd1 and Rad53 within the *CLB2* cluster. Furthermore, we revealed that the MRX complex is involved in adaptation through a mechanism that seems to be linked to Cdc5. Other complexes and pathways, whether or not they are directly linked to Cdc5, also play a role in adaptation, such as the APC/C complex, cohesin, Cvt, GARP and TORC1 pathways.

Adaptation is a highly complex phenomenon, involving a surprising diversity of mechanisms and factors. Our work proposes new avenues for further investigation of adaptation to DNA damage.

Key words: DNA damage ; Cdc5 ; polo kinase ; adaptation ; checkpoint