



HAL
open science

Mécanismes de production d'ADN cytosoliques après radiations ionisantes

Simon Willaume

► **To cite this version:**

Simon Willaume. Mécanismes de production d'ADN cytosoliques après radiations ionisantes. Biologie moléculaire. Université Paris-Saclay, 2021. Français. NNT : 2021UPASL099 . tel-04739025

HAL Id: tel-04739025

<https://theses.hal.science/tel-04739025v1>

Submitted on 16 Oct 2024

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

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

Mécanismes de production d'ADN
cytosoliques après radiations ionisantes

*Mechanisms of cytosolic DNA production after ionizing
radiation*

Thèse de doctorat de l'université Paris-Saclay

École doctorale n° 577, structure et dynamique des systèmes vivants (SDSV)
Spécialité de doctorat : Sciences de la vie et de la santé
Graduate School: Life Sciences and Health (GS LSH).
Réfèrent : Faculté des sciences d'Orsay

Thèse préparée dans l'unité de recherche : SGCSR (Université Paris-Saclay, Inserm,
(CEA), France.

Sous la direction de **Pascale Bertrand**, DR
Sous le co-encadrement de **Emilie RASS**, CR

Thèse soutenue à Paris-Saclay, le 14 décembre 2021, par

Simon WILLAUME

Composition du Jury

Anna CAMPALANS

DR, CEA, Université Paris-Saclay, IRCM, Présidente
LCE, UMR1274, Fontenay-aux-Roses

François PARIS

DR, CRCINA, UMR892, Nantes Rapporteur & Examineur

Philippe PASERO

DR, IGH, UMR9002, Montpellier Rapporteur & Examineur

Pascale BERTRAND

DR, CEA, Université Paris-Saclay, IRCM, Directrice de thèse
LREV, UMR1274, Fontenay-aux-Roses

Titre : Mécanismes de production d'ADN cytosoliques après radiations ionisantes

Mots clés : ADN cytosolique, Stress réplcatif, Radiation ionisante, Dommages oxydatifs, Inflammation, Dommages de l'ADN

Les perturbations de la progression des fourches de réplication et la persistance de dommages peuvent mener à la libération de fragments d'ADN dans le cytosol des cellules. L'ADN cytosolique est présent dans le cytoplasme de nombreuses cellules cancéreuses et peut être détecté par le senseur de l'ADN cGAS. La détection de l'ADN cytosolique permet l'activation de la voie cGAS-STING du système immunitaire inné, et la production d'interférons de type I. Les radiations ionisantes (IR) sont aussi connues pour activer le système immunitaire inné via la production et la détection d'ADN cytosoliques. Étant donné qu'il a été proposé que l'activation de la voie STING participe à l'efficacité de la radiothérapie, il est important de comprendre précisément les mécanismes de production d'ADN cytosoliques. Au cours de ma thèse, j'ai étudié les mécanismes moléculaires de production d'ADN cytosoliques après IR. Mes résultats suggèrent l'implication d'un stress réplcatif radio-induit et j'ai pu identifier des acteurs clef de la maintenance du génome et de la gestion des fourches de réplcations bloquées dans le mécanisme de production d'ADN cytosolique. Dans ce manuscrit, je présente l'identification de nouveaux acteurs moléculaires participant à la production d'ADN cytosoliques. De plus, je décris un nouveau modèle de production d'ADN cytosoliques radio-induits, intégrant l'ensemble de mes données

Title : Mechanisms of cytosolic DNA production after ionizing radiation

Keywords : Cytosolic DNA, Replicative stress, ionising radiation, Oxidative damage, Inflammation, DNA damages

Perturbation of the replication fork progression and DNA damage persistence, may lead to the release of DNA fragments into the cytoplasm of the cell. Cytosolic DNA, present in the cytoplasm of many cancerous cells, can promote interferon type I production via its sensing by the cGAS-STING pathway and the activation of the innate immune response. Ionizing radiation (IR) is also known to activate the innate immune system through cytosolic DNA production and sensing. Since it has been proposed that STING pathway activation participates to radiotherapy efficacy, it is of importance to understand the precise mechanisms of cytosolic DNA production. During my thesis, I studied the molecular mechanisms of cytosolic DNA production after IR. My study suggests the contribution of a radio-induced replicative stress and I identified key players in the maintenance of genome stability and replication fork processing, as actors of cytosolic DNA production. In this manuscript, I present the identification of different new molecular players involved in cytosolic DNA production. In addition, I describe a novel model of radiation-induced cytosolic DNA production, integrating all my data.

Remerciements

Je tiens à remercier les membres de mon jury, Philippe Pasero, François Paris et Anna Campalans, d'avoir accepté d'évaluer mes travaux de Thèse et de participer à ma soutenance de thèse. Les membres de mon comité de thèse, François Paris, Jean-Luc Perfettini et Guillaume Pinna, qui m'ont suivi au cours de ma thèse.

Je remercie le CEA pour avoir financé mes 3 premières années de thèses et la Fondation ARC pour ma quatrième année.

Je remercie ma directrice de thèse, Pascale Bertrand, pour m'avoir donné l'opportunité de réaliser une thèse au sein du LREV, de m'avoir trouvé un financement CEA, et m'avoir encadré durant ces 4 années et permis de participer à de nombreuses discussions fun et intéressantes.

Je remercie Emilie Rass, de m'avoir encadré tout au long de ma thèse (et de M2), de m'avoir appris quasi toutes les manip que je connais et d'avoir supporté toutes mes âneries, même si tu m'as fait pas mal tourner en bourrique aussi à me faire croire n'importe quoi. Merci pour les yogures et les cookies, on s'est bien marré pendant toutes ces années. Tu es top comme encadrante.

Merci Benoit, de m'avoir encadré lors de mon arrivée en stage de M1, de m'avoir initié au laboratoire et surtout à l'analyse d'image par cellprofiler, le logiciel suprême lorsqu'on fait un projet avec beaucoup de microscopie.

Merci Caroline pour l'aide que tu m'as apportée au cours de ma thèse et les moments sympas à se marrer dans le bureau avec Emilie. Merci aussi pour les sachets d'oignons frits. Merci Gaëlle c'était très sympa de t'avoir comme voisine de paillasse et amusant de t'entendre parler en manipant. Merci pour les viennoiseries surprises le matin.

Les étudiants du labo, Paul, Pauline et Julien, merci, on fait un super groupe étudiant. Merci pour les bières ensemble, les séances d'escalade et les farces au labo, j'ai passé un super moment. Paul merci de m'avoir aidé et de continuer mon projet, puissent les dieux de l'ADN cytosolique être avec toi. Pauline, merci pour l'aide aussi, je suis sûr que tu vas nous faire un beau crible, à mon départ, ne te laisse pas embêter par Paul et Julien. Coach Julien, le petit jeune, tu es bien parti pour nous faire un nouveau beau projet, j'espère pouvoir goûter des fritons un jour. J'en profite pour remercier les étudiants des autres laboratoires, pour ces

soirées détentes et les Student Life Forum (SLF). Il y a une super ambiance dans l'institut, j'espère pouvoir reprendre des pintes avec vous.

Merci à ma petite loutre pour ton soutien durant ces 4 années et m'avoir donné plein de gâteaux. Merci à mes parents pour m'avoir fourni en pâté en croute, mes frères et mes grands-parents pour toujours avoir été là pour moi. Merci Mémé pour le tiramisu toutes ces années.

Merci aux poteaux, Alex, Martin et Elodie, pour toutes ces soirées essentielles pour garder le moral au fil des années. Merci, à Ruben et Juliette, sans vous, je me serais bien ennuyé à Paris. Ruben, grâce à toi, j'ai pu rencontrer plein de gens sur Paris, rencontrer Pauline et passer d'inoubliables soirées et vacances avec toi, merci.

Merci à Marie, AKA Bernard le démon, toujours joyeuse, tes fourberies m'ont permis de rencontrer un bon nombre de gars bizarre, avec qui j'ai passé de longues soirées à lancer des dés à 20 faces dans des caves. Du coup merci aux copains, Hugo, Stan et Victou entre autres, et les nouveaux aussi, pour toutes les parties de Donjons & Dragons les soirs pendant la thèse, on a bien rigolé.

Je remercie les Grands Anciens et les auto-stoppeurs dont je me suis servi pour les sacrifices humains. Sans la bénédiction de Cthulhu et des dieux de l'ADN cytosolique, les expériences ne marcheraient pas aussi bien.

Merci aux gars de l'Istanbul Grill, pour l'approvisionnement en kebab tous les jeudis midi, vous nous avez sauvé la vie à de nombreuses reprises.

Finalement, je remercie la base de mon alimentation, les oignons, la bière et le pâté en croûte, sans vous, je ne tiendrais même pas debout.

Table des matières

Index des figures	9
Index des tableaux.....	10
Index des équations	10
Abréviations	11
Avant-propos.....	16
I : INTRODUCTION	18
1 Les différentes sources et types de dommages à l'ADN et leur réparation	18
1.1 Les Radiations ionisantes.....	18
1.2 Le stress oxydant	20
1.2.1 Sources endogènes de stress oxydant	20
1.2.2 Sources exogènes de stress oxydant.....	21
1.2.3 Impact du stress oxydant sur l'ADN	21
1.2.4 Réparation des modifications de base par le stress oxydant.	23
1.2.5 Mécanisme du BER.....	23
1.3 Cassures Doubles Brin : Source, signalisation et réparation.....	26
1.3.1 Sources de cassures double brin.....	26
1.3.2 La réponse aux dommages à l'ADN.....	27
1.3.3 Voies de réparation des CDB.....	31
2 Le stress réplicatif.....	39
2.1 Le cycle cellulaire	39
2.1.1 Régulation du cycle cellulaire.....	39
2.1.2 Les bases de la réplication de l'ADN	40
2.1.3 Points de contrôle du cycle cellulaire	42
2.2 Les différentes sources de stress réplicatif	44
2.2.1 Oncogènes.....	45

2.2.2	Facteurs limitants	45
2.2.3	Lésions préexistantes	46
2.2.4	Stress réplcatif radio-induit	47
2.2.5	Stress Oxydant et BER	47
2.2.6	Obstacles à la progression des fourches de réplcation.....	50
2.2.7	Interférence entre transcription et réplcation.....	50
2.3	Gestion du stress réplcatif	53
2.3.1	Signalisation par la voie ATR	53
2.3.2	Mécanismes de redémarrage des fourches de réplcation.....	54
2.4	SLX4 et ses partenaires.....	63
2.4.1	Description de la protéine SLX4	64
2.4.2	Rôle de SLX4 dans les mécanismes de réparation des ICL.....	65
2.4.3	Rôle de SLX4 au niveau des Télomères	67
2.4.4	Rôle de SLX4 dans la recombinaison homologue	68
2.4.5	Rôle de SLX4 dans le stress réplcatif	68
2.4.6	Rôle de SLX4 dans la gestion des conflits transcription réplcation.....	70
3	Réponse immunitaire à l'ADN cytosolique	71
3.1	Détection des acides nucléiques cytoplasmiques.....	71
3.1.1	Mécanismes de détection des ADN cytosoliques	72
3.1.2	Détection des ARN cytosoliques	75
3.1.3	Dégradation de l'ADN cytosolique.....	76
3.2	Sources et acteurs connus de la production d'ADN cytosoliques.....	77
3.3	Impact de la détection des acides nucléiques en thérapie	85
3.3.1	Rôle anti-tumoral de la voie STING	85
3.3.2	Rôle pro-tumoral de la voie STING.....	88
	Objectifs de thèse.....	89

II : Résultats	90
1 Résumé des résultats de l'article	130
1.1 La production d'ADN cytosoliques à lieu majoritairement en phase S/G2/M.....	130
1.2 SLX4, un nouvel acteur de la production d'ADN cytosoliques radio-induits.....	130
1.3 Les ROS et le mécanisme du BER sont impliqués dans la production d'ADN cytosoliques.....	131
1.4 La réversion de fourche, mécanisme essentiel de la production d'ADN cytosoliques	131
1.5 Conclusions.....	131
2 Résultats supplémentaires et préliminaires	133
2.1 Rôle de RTEL1 dans la production d'ADN cytosoliques après IR.....	133
2.2 Libération de Thymine Glycol dans le cytoplasme après irradiation.	134
2.3 Participation à un projet de crible à haut débit de la production d'ADN cytosoliques après IR.....	135
2.4 Participation à l'étude de l'impact de la surexpression de la Lamine B1 sur la stabilité du génome.....	137
III : Discussion	138
1 SLX4 est nécessaire à la production d'ADN cytosoliques après irradiation.....	139
2 La production d'ADN cytosoliques est réalisée au niveau des fourches bloquées	140
3 La réversion des fourches de réplication : l'origine de la production d'ADN cytosoliques ou juste une étape ?.....	142
4 Nécessité d'une étape de résection pour la production d'ADN cytosoliques ?	144
5 Nouveau rôle des ROS dans la production d'ADN cytosoliques	145
6 Rôle potentiel des conflits transcription-réplication	147
7 Impact sur l'inflammation et le cancer	148
8 Les différents modèles de production d'ADN cytosoliques après radiations.....	150
Conclusion	152

Matériels et méthodes supplémentaires.....	153
Culture cellulaire	153
Immunofluorescence	153
Annexes	154
A link between Replicative stress, Lamin proteins, and inflammation.....	154
Le vieillissement Une histoire de dommages de l'ADN d'enveloppe nucléaire altérée et d'inflammation ?	201
Lamin B1 sequesters 53BP1 to control its recruitment to DNA damage.....	212
Bibliographie	245

Index des figures

Figure 1: Schéma représentatif de CDB et CDB complexes	19
Figure 2 : Lésions de l'ADN formées par attaque radicalaire du patrimoine génétique des cellules ...	22
Figure 3 : La voie du BER	24
Figure 4 : Modèle de recrutement et d'activation des PIKK en réponse à des dommages à l'ADN	28
Figure 5 L'activation d'ATM à la cassure	29
Figure 6 : Mécanismes de réparation des CDB.....	31
Figure 7 Le NHEJ alternatif et canonique	33
Figure 8 La recombinaison homologue	34
Figure 9 : La régulation du cycle cellulaire par les Cyclines et les CDK	39
Figure 10 : La fourche de réplication.....	41
Figure 11 : Les principaux acteurs moléculaires participants à la mise en place des points de contrôles suite à des dommages.....	43
Figure 12 : Les principales sources de stress réplcatif	45
Figure 13 : La transcription.....	50
Figure 14 : Collisions frontales et co-directionnelles entre transcription et réplication	51
Figure 15 : Condition pouvant affecter la fréquence des collisions réplication-transcription.....	52
Figure 16 : Mécanismes de redémarrage des fourches de réplication.....	55
Figure 17 :Protéines participant à la réversion et dégradation des fourches reversées	58
Figure 18 : Remodelage de la fourche de réplication	63
Figure 19 : Représentation schématique de SLX4 et ses partenaires	64
Figure 20 : SLX4 et la réparation des ICL	66
Figure 21 : Possibilités de clivage des fourches par SLX4-MUS81-SLX1	69
Figure 22 : Détection des acides nucléiques issus de pathogènes.....	72
Figure 23 : La voie canonique de signalisation des interférons de type I	73
Figure 24 :Activation Non-canonique de la voie STING	74
Figure 25 : Activation de la voie MAVS	76
Figure 26 : Activation canonique de la voie STING après stress réplcatif ou dommages à l'ADN	79
Figure 27: Rôle de RTEL1 dans la production d'ADN cytosoliques radio-induite.....	134
Figure 28 : Production de thymine glycol (TG) cytosoliques après IR.....	135
Figure 29: Projet de crible à haut débit de la production d'ADN cytosoliques après IR.....	136
Figure 30 : modèle de production d'ADN cytosolique après IR	138
Figure 31 : Modèle de NEIL1 agissant comme un « cow catcher ».....	146
Figure 32 : Modèle de production d'ADN cytosoliques après IR	151

Index des tableaux

Tableau 1 : Nombre et type de lésions induites par des radiations ionisantes.	22
Tableau 2 : Liste des principales ADN glycosylases chez les mammifères.	25

Index des équations

Équation 1 : Production des ROS	21
---------------------------------------	----

Abréviations

53BP1	Tumor Protein P53 Binding Protein 1
5-OHC	5-hydroxycytosine
5-OHU	5-hydroxyuracile
8oxoG	8 oxoguanine
ADN	acide désoxyribonucléique
ADNdb	acide désoxyribonucléique double brin
ADNsb	acide désoxyribonucléique simple brin
AGS	Aicardi-Goutières syndrome
AIM2	Absent In Melanoma 2
ALT	Alternative Lengthening of Telomeres
A-NHEJ	NHEJ alternatif
APE1	Apurinic/Apyrimidinic Endodeoxyribonuclease 1
APH	aphidicoline
ARA-C	cytosine β -D-arabinofuranoside hydrochloride
ARN	acide ribonucléique
ARNdb	acide ribonucléique double brin
ARNsb	acide ribonucléique simple brin
AT	Ataxie Telangiectasie
ATM	ataxia telangiectasia mutated
ATP	adénosine triphosphate
ATR	ataxia telangiectasia mutated rad3 related
ATRIP	ATR Interacting Protein
BARD1	BRCA1 Associated RING Domain 1
BER	Base Excision Repair
BIR	break-induced replication
BLM	Bloom Syndrome RecQ Like Helicase
BRCA1/2	Breast Cancer Type 1/2 Susceptibility Protein
BrdU	bromodésoxyuridine
CDB	Cassure double brin
CDKs	cell cycle dependant kinases
CG	conversion génique
cGAMP	GMP-AMP cyclique
cGAS	Cyclic GMP-AMP Synthase
CISP	Cisplatine
CKi	Cyclin dependent kinase inhibitory proteins
CldU	chlorodeoxyuridine
C-NHEJ	NHEJ canonique

CO	Crossover
Cow catcher	pare buffle
CPT	camptothécine
CSB	Cassure simple brin
CtIP	C-terminal binding protein 1 (CtBP1) interacting protein
CytoDNA	ADN cytosolique
DAMP	Damage associated molecular pattern
DAPI	Di Aminido Phenyl Indol
DDKs	Dbf4-dependent kinases
DDR	DNA damage response
DDT	DNA Damage Tolerance
DDX41	DEAD-BOX Helicase 41
D-Loop	boucle D ou Displacement loop
DNA2	DNA Replication Helicase/Nuclease 2
DNAase	désoxyribonucléases
DNA-PK	DNA dependent protein kinase
dNTP	Desoxy Nucléotide triphosphate
ECTR	ExtraChromosomal Telomere Repeat
EdU	5-ethynyl-2'-deoxyuridine
EME1/2	Essential Meiotic Structure-Specific Endonuclease 1/2
EMT	transition épithélio-mésenchymateuse
ERCC1	Excision Repair Cross Complementation Group 1
EXO1	Exonuclease 1
FA	Fanconi anemia
Fapy	Formamidopyrimidine
FBH1	F-Box DNA Helicase 1
FEN1	Flap Endonucléase 1
FEN1	Flap Structure-Specific Endonuclease 1
Gy	Gray
H ₂ O ₂	peroxyde d'hydrogène
HGPS	syndrome de la progéria Hutchinson Gilford
HTLF	Helicase Like Transcription Factor
HU	HydroxyUrea
ICL	interstrand crosslinks
IdU	iododeoxyuridine
IF	Immunofluorescence
IFI16	InterFeron Inducible protein 16
IFN	interféron

IPOND	isolation of Proteins On Nascent DNA
IR	Radiations ionisantes
IR/RI	Radiations ionisantes
IRF3	Interferon Regulatory Factor 3
ISGs	interferon stimulated genes
JAK1	Janus Kinase 1
KO	Knock-out
LET	Linear energy transfert
Lig IIIa	ADN ligase IIIa
LINE-1	Long interspersed Nuclear Element
MAVS	Mitochondrial AntiViral Signaling protein
MDA5	Melanoma Differentiation Associated gene 5
MDC1	Mediator Of DNA Damage Checkpoint 1
MEF	Mouse embryonic fibroblast
MIDAS	mitotic DNA synthesis
MMC	Mitomycine C
MRN	comprenant MRE11, Rad50 et NSB1
MRN	Mre11/Rad50/Nbs1
MUS81	MUS81 Structure-Specific Endonuclease Subunit
MYH	MutYH
NEIL1-3	Nei Like DNA Glycosylase 1-3
NER	Nucleotide Excision Repair
NHEJ	Non Homologous End Joining
NK	Natural Killer
NTH1	Nth Like DNA Glycosylase 1
NTP	Nucléotide triphosphate
O ₂	Oxygène
O ₂ ⁻	anions superoxydes
OGG1	8-Oxoguanine DNA Glycosylase
OH°	radical hydroxyle
ORC	Origin recognition complex
p16	protein 16
p21	protein 21
P53	Tumor Protein P53
PAMP	pathogen-associated-molecular-pattern
PARP	poly(ADP)ribose polymérase
PCNA	Proliferating Cell Nuclear Antigen
PIKKs	phosphatidylinositols 3 kinases like protéines kinases

PLA	Proximity ligation assay
PPR	pattern recognition receptors
PTIP	PAX-interacting protein 1
RAD51	RAD51 Recombinase
RE	Réticulum endoplasmique
RECQ	RecQ Like Helicase
REDOX	oxydant-réducteur
RFC	facteur de réplication
RH	recombinaison homologue
RIF1	RAP1-interacting factor 1
RIG-I	Retinoic acid Inducible Gene I
RNAse	Ribonuclease
RNR	ribonucléotide réductase
rNTP	ribonucléotides
ROS	espèce réactive de l'oxygène
RPA	Replication Protein A
RT	Radiothérapie
RTEL1	Regulator Of Telomere Elongation Helicase 1
SAMHD1	SAM And HD Domain Containing Deoxynucleoside Triphosphate
SASP	senescence associated secretory phenotype
SDSA	synthesis-dependant strand annealing
SIRF	in situ analysis of protein interactions at DNA replication forks
siRNA	Interférence à ARN
site AP	site apurinique/apyrimidique
SLX1	Structure-Specific Endonuclease Subunit 1
SLX4	SLX4 Structure-Specific Endonuclease Subunit
SMARCAL1	SWI/SNF Related, Matrix Associated, Actin Dependent Regulator Of Chromatin, Subf
SSE	Structure specific endonuclease
STING	Stimulator of interferon genes
TBK1	TANK Binding Kinase 1
TEX	Tumor-derived-exosome
TG	thymine glycol
TIMELESS	Timeless Circadian Regulator
TLS	translesion DNA synthesis
TNF α ,	Facteur de nécrose tumorale
TOP	topoisomérases
T-R	transcription-réplication
TRAF6	Tumor necrosis factor receptor associated factor 6

TREX1	Three Prime Repair Exonuclease 1
TRF2	Telomeric Repeat Binding Factor 2
UV	Ultraviolet
WRN	Werner Syndrome ATP-Dependent Helicase
XPF	Xeroderma Pigmentosum Group F-Complementing Protein
XRCC1	X-ray Repair Cross Complementing protein 1
ZRANB3	Zinc Finger RANBP2-Type Containing 3
γ H2AX	phosphorylation sur la serine 139 de H2A histone family member X

Avant-propos

L'ADN est la seule molécule biologique dont le maintien et la duplication repose sur un modèle préexistant devant être gardé intact afin d'être fidèlement transmis à la génération suivante. Néanmoins, c'est la plus grande molécule qui peut être sujette à de nombreuses lésions et modifications générées aussi bien par des facteurs endogènes qu'exogènes. Afin de conserver l'intégrité de cette molécule, il existe de nombreux mécanismes de détection, signalisation et réponses aux dommages à l'ADN (Ciccia and Elledge, 2010; Jackson and Bartek, 2009). En effet la réponse aux dommages à l'ADN permet de mettre en place une série de mécanismes contrôlant le cycle cellulaire afin d'éviter de générer plus de dommages lors de la réplication ou d'intégrer des mutations. Cela va permettre la réparation des cassures, et, en cas de dommages trop importants ou de réparation défectueuse, entraîner la mort programmée de la cellule, ou son entrée en sénescence. Un défaut des mécanismes de réponse aux dommages à l'ADN entraînera une instabilité génétique qui participe à de nombreuses pathologies humaines comme la formation de cellules cancéreuses, de maladies inflammatoires chroniques, et participe au vieillissement (Hoeijmakers, 2009; Nakad and Schumacher, 2016).

Il existe un lien entre instabilité génétique et inflammation. En effet il a récemment été montré que, à la suite de dommages à l'ADN, il y avait libération dans le cytoplasme des cellules de fragments d'ADN appelés ADN cytosoliques (Coquel et al., 2018; Erdal et al., 2017; Härtlova et al., 2015; Nakad and Schumacher, 2016). Les cellules possèdent différents mécanismes afin de détecter la présence d'ADN et d'ARN dans le cytoplasme. Ces mécanismes font partie du système immunitaire inné et permettent le déclenchement d'une réponse immunitaire afin de les éliminer. Ces ADN cytosoliques sont, tout du moins en partie, produits lors des mécanismes de maintien du génome comme lors de la réparation de l'ADN ou de gestion des fourches de réplifications bloquées (Lin and Pasero, 2021; Willaume et al., 2021a). Ces fragments d'ADN sont produits en cas de lésion de l'ADN que ce soit suite à l'exposition à des facteurs endogènes comme le stress réplcatif, ou exogènes comme les radiations ionisantes (IR). La radiothérapie est utilisée en oncologie pour soigner 50 à 60 % des patients, seule ou en combinaison avec la chimiothérapie et la chirurgie (Weichselbaum et al., 2017). Des études ont montré que les radiations ionisantes produisent des ADN cytosoliques et sont responsables d'une réponse immunitaire favorisant l'élimination des tumeurs localisées ou métastatiques (Burnette et al., 2011a; Vanpouille-Box et al., 2017c; Weichselbaum et al.,

2017). A ce jour, aucun mécanisme précis de production d'ADN cytosoliques après radiations ionisantes n'a été proposé. Mieux comprendre ces mécanismes pourrait permettre de prédire l'efficacité de la radiothérapie et de moduler la réponse inflammatoire liée à celle-ci. Ainsi il serait possible d'améliorer la radiothérapie ou de contrecarrer ses effets secondaires liés à l'inflammation.

Au cours de ma thèse, je me suis intéressé aux mécanismes de production d'ADN cytosoliques après radiation ionisantes.

La première partie de mon manuscrit sera l'introduction de mon travail de thèse. Dans cette partie, le premier chapitre sera consacré aux différentes sources de dommages à l'ADN et les mécanismes de réparation. Le second chapitre sera consacré au stress réplicatif, ses sources et sa gestion ainsi que la description de la protéine SLX4, qui joue un rôle dans ces mécanismes. Enfin, la troisième partie portera sur les mécanismes de production d'ADN cytosoliques, les voies de l'inflammation innée et leur impact dans la tumorigenèse.

La deuxième partie de mon manuscrit comporte les résultats (papier en préparation) et des résultats supplémentaires de mon travail de thèse qui portent majoritairement sur le rôle de la protéine SLX4 dans les mécanismes de production d'ADN cytosolique après irradiations.

Finalement, dans la troisième et dernière partie de ma thèse, je discuterai des résultats obtenus lors de mes expériences ainsi que de leurs perspectives.

En annexe, figurent également des publications auxquelles j'ai participé au cours de ma Thèse. Deux revues, l'une décrivant l'impact du stress réplicatif sur l'inflammation, en lien avec des dérégulations des Lamine. L'autre sur l'impact de dérégulation des Lamine sur la senescence et l'inflammation et réparation des dommages à l'ADN. Aussi, j'ai participé à une publication originale décrivant l'impact de la surexpression de la Lamine B1 sur le recrutement de la protéine 53BP1.

I : INTRODUCTION

1 Les différentes sources et types de dommages à l'ADN et leur réparation

La molécule d'ADN est constamment soumise à de nombreuses attaques exogènes ou endogènes. En moyenne, chaque cellule humaine subit plusieurs dizaines de milliers de lésions par jours. Si ces dernières ne sont pas réparées, elles pourront mener à des mutations ou interférer avec les processus de réplication ou de transcription. Elles peuvent mener à des cassures simple brin de l'ADN (CSB) ou double brin (CDB) (Jackson and Bartek, 2009).

Les CSB sont couramment produites de manière endogène par les espèces réactives de l'oxygène (ROS), ou lors de leur réparation par les mécanismes de réparation par excision de base (BER). Je reviendrai sur ces mécanismes dans un chapitre dédié. Elles peuvent aussi être produites par erreur via l'activité de certaines enzymes comme la topoisomérase I ou l'incorporation par erreur de ribonucléotides lors de la réplication et leur réparation (Caldecott, 2008).

Pour les CDB, les 2 brins complémentaires d'ADN sont cassés simultanément, et sont moins fréquentes que les CSB. Cependant, les CDB n'en restent pas moins l'une des lésions les plus dangereuses et peuvent mener à de nombreux réarrangements. Les CDB peuvent comme les CSB avoir des origines endogènes ou exogènes. L'une des sources exogènes de CDB que j'ai le plus utilisé au cours de ma thèse est l'exposition aux radiations ionisantes.

1.1 Les radiations ionisantes

Les radiations ionisantes sont capables de libérer des électrons des atomes et molécules, générant ainsi des ions et brisant les liaisons covalentes. Aussi, les IR ont un effet important sur les molécules biologiques et peuvent produire toute une variété de lésions à l'ADN.

Le transfert d'énergie linéaire (LET pour Linear Transfert Energy) est défini comme l'énergie transférée par un rayonnement par unité de distance traversée. Le LET est donc exprimé en Kiloélectron volts par micromètres. Ainsi les IR sont classées en deux catégories : les IR à haute énergie et à basse énergie. Les protons et particules α déposent une forte énergie sur leur

trajectoire, ionisant tous les atomes, les classant dans la catégorie à haute énergie. L'exposition naturelle à ces hautes énergies est dû majoritairement au radon, un gaz intermédiaire de la désintégration du thorium et de l'uranium. Les photons et les électrons quant à eux provoquent bien moins d'ionisation sur leur trajectoire. Les photons sont la plus grande source de rayonnement à basse énergie et leur énergie est inversement proportionnelle à leur longueur d'onde. Ainsi la lumière visible n'est pas assez énergétique pour ioniser les atomes. Cependant, les photons à faible longueur d'ondes comme les UV, rayons X et γ sont ionisants (Cannan and Pederson, 2016).

L'exposition à des IR provoque des CSB et CDB au ratio de 1 CDB pour 10 CSB. Elles génèrent aussi des modifications de bases telles que des alkylations, déaminations ou formations de sites apuriques ou apyrimidiques (site AP). Ces modifications de bases peuvent mener à la formation de CSB ou CDB. Par ailleurs, les IR sont aussi responsables de la formation de pontages ADN-ADN et ADN-protéines (Kavanagh et al., 2013). Les IR peuvent endommager directement l'ADN en générant des CDB (Borrego-Soto et al., 2015) ainsi que des pontages d'ADN interbrin (ICL) (Ding and Greenberg, 2007). De plus, les IR sont une source de lésions qui génèrent des dommages complexes (ou cluster de dommages) (Figure 1). En effet, les IR ont la possibilité de créer des cascades d'ionisation et de dommages de manière localisée. Ces dommages complexes consistent en la présence de deux types de dommages ou plus, à un ou deux tours d'hélice de distance. Ce type de dommage est pour la cellule très difficile à réparer (Georgakilas et al., 2013).

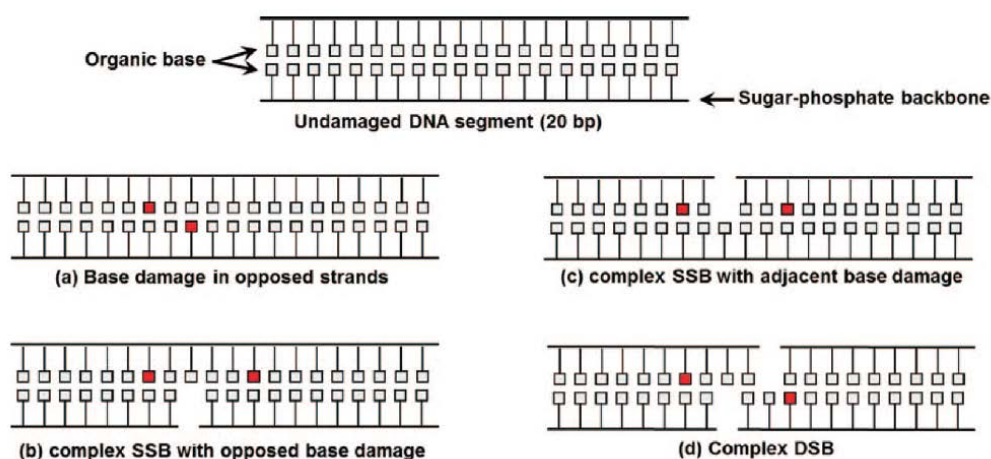


Figure 1: Schéma représentatif de CDB et CDB complexes. Les brèches dans le squelette sucre-phosphate représentent des CSB, les carrés rouges représentent des bases endommagées et des sites abasiques. (a) 2 lésions de bases sur des brins opposés. (b) Une CSB complexe avec des dommages de bases sur le brin opposé. (c) Une CSB complexe avec des lésions sur les bases adjacentes. (d) Une CDB complexe composée de 2 CSB à moins de 10 paires de base l'une de l'autre avec en plus, des bases endommagées à proximité. Issus de Georgakilas et al, 2013.

Les radiations ionisantes sont une source de stress génotoxique exogène dont les dommages varient selon la nature ou le type de particules rencontrées. Par exemple, les particules à haute énergie comme les protons interagissent directement avec le squelette de la molécule d'ADN générant des cassures double brins (Vítor et al., 2020). Dans le cas des IR à faible énergie, comme les rayons X, la majorité des dommages est produite de manière indirecte via la création de ROS (Borrego-Soto et al., 2015).

1.2 Le stress oxydant

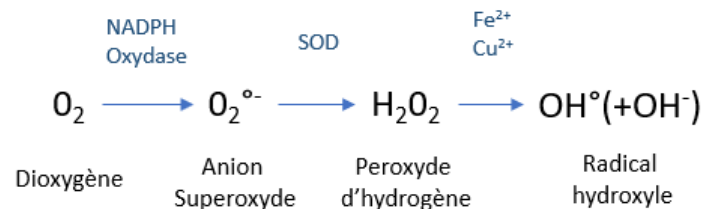
L'oxydation au sein de la cellule a un double rôle : d'une part, un niveau physiologique est essentiel à de nombreux processus physiologiques via un système de signalisation oxydant-réducteur (REDOX). D'autre part, un déséquilibre de la balance redox en faveur de l'oxydation, devenant alors trop importante, cause des dommages à l'ADN et aux autres biomolécules de la cellule. Ainsi, le stress oxydant est défini comme un déséquilibre de la balance entre la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) et les défenses anti-oxydantes de la cellule (Sies et al., 2017). Les ROS peuvent être produits lors du métabolisme normal de la cellule ou lors de l'exposition à différents facteurs environnementaux telles que les radiations ionisantes ou la pollution environnementale (Birben et al., 2012).

1.2.1 Sources endogènes de stress oxydant

Les ROS sont produits à partir des molécules de dioxygène lors des différents métabolismes de la cellule et peuvent être différenciées en deux catégories : les radicaux libres ou radicalaires et les non radicalaires. Il existe 3 types de ROS majoritaires qui ont un impact physiologique : les anions superoxydes (O_2^-), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et le radical hydroxyle (OH^\bullet) (Birben et al., 2012).

Les anions superoxydes sont produits par l'ajout d'un électron à la molécule de dioxygène. Cela se produit majoritairement au niveau des mitochondries lors de la production d'adénosine triphosphate (ATP). En présence d'eau, l'anion superoxyde peut être converti en peroxyde d'hydrogène par l'action de la superoxyde dismutase (Birben et al., 2012). Même si le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) est chimiquement moins réactif que d'autres ROS, il est capable de générer de nombreux dommages dans la cellule grâce à sa capacité à facilement traverser les membranes biologiques et atteindre différents compartiments de la cellule

(Markkanen, 2017). Finalement, l' H_2O_2 peut à son tour être converti en présence d'ions métalliques (par exemple Fe^{2+} ou Cu^{2+}) par une succession de réactions appelées réaction d'Haber-Weiss et Fenton, menant à la formation de radical hydroxyle (Equation 1). Ce dernier est une espèce radicalaire très agressive/réactive responsable des dommages oxydatifs de nombreuses molécules (Pisoschi and Pop, 2015).



Équation 1 : Production des ROS : Une molécule de dioxygène peut générer progressivement différentes espèces réactives de l'oxygène. SOD : superoxyde dismutase, NADP : Nicotinamide adénine dinucléotide Phosphat. Adapté de (Lebraud, 2018; Pisoschi and Pop, 2015b).

1.2.2 Sources exogènes de stress oxydant

Il existe de nombreuses sources de ROS auxquelles nous sommes exposés au sein de notre environnement. Parmi les principales se trouvent la fumée de cigarette, les pesticides, l'ozone ou encore les radiations ionisantes (RI) (Birben et al., 2012). En effet, les IR comme les rayons X, les neutrons et les rayons α , β , γ , sont responsable de la production de ROS. Outre la production de radicaux hydroxyles via la radiolyse de l'eau, l'exposition aux IR stimule la production de ROS par les mitochondries (Dong et al., 2020). En effet, les ROS endommagent l'ADN et les protéines de la mitochondrie, entraînant ainsi son dysfonctionnement. Le potentiel de membrane de la mitochondrie devient alors instable, menant ainsi à une fuite continue de ROS (Kawamura et al., 2018).

1.2.3 Impact du stress oxydant sur l'ADN

Les ROS réagissent entre autres avec les molécules d'ADN, ce qui résulte en des lésions oxydatives à l'ADN. Ces dommages sont impliqués dans des mécanismes de mutagenèse, carcinogénèse, inflammation et de vieillissement (Pisoschi and Pop, 2015). Il a été estimé que près de 20 000 lésions de l'ADN sont générées chaque jour par les mécanismes physiologiques d'hydrolyse, oxydation et méthylation non enzymatique (Lindahl, 1993).

De nombreux types de dommages et de modifications de base peuvent être générés par le radical hydroxyle. Ces dommages peuvent être produit sur la molécule d'ADN génomique ainsi

que sur le pool de nucléotides. Parmi les bases de l'ADN, la guanine est la plus susceptible aux dommages oxydatifs. Ainsi, la 8 oxoguanine (8oxoG) est l'une des lésions oxydatives les plus couramment retrouvées. C'est une lésion mutagène qui se lie à une adénine plutôt qu'à une cytosine, générant ainsi des transversions après réplication (Sies et al., 2017). Après radiations ionisantes, une lésion oxydative majoritairement retrouvée est la thymine glycol (TG) (Tableau 1). Cette dernière induit des distorsions dans la structure de la molécule de l'ADN, empêchant la fourche de réplication de progresser (Aller et al., 2007).

Radiation-induced lesions in cellular DNA	Number/Gy/cell γ -radiation
5,6-thymine glycol (Tg)	582
5-(hydroxymethyl)-2'-deoxyuridine	174
5-formyl-2'-deoxyuridine	132
FapyG	234
8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine	120
Single-strand breaks	1000

Tableau 1 : Nombre et type de lésions induites par des radiations ionisantes. Adapté de Lomax et al, 2013

Lors d'un stress oxydatif, la liaison sucre-désoxyribose peut être dégradée, menant à la formation d'un site abasique. Finalement, les protéines peuvent aussi être ciblées menant à la formation de pontage protéine-ADN (Figure 2) (Dizdaroglu et al., 2002).

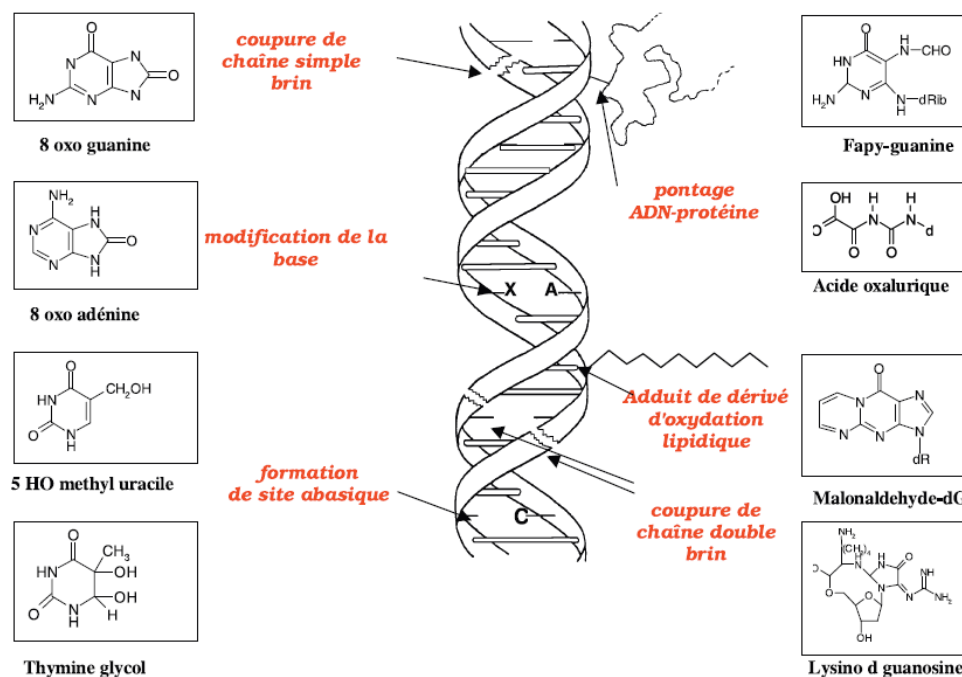


Figure 2 : Lésions de l'ADN formées par attaque radicalaire du patrimoine génétique des cellules. Issus de Favier, 2003.

1.2.4 Réparation des modifications de base par le stress oxydant.

Etant donné la large variété de dommages que peut subir la molécule d'ADN, la cellule possède plusieurs mécanismes de réponses aux dommages. Ainsi les lésions d'ADN induites par les ROS peuvent être réparées majoritairement par 2 mécanismes : le mécanisme de réparation par excision de base (BER pour Base Excision Repair) pour la réparation des bases oxydées, et celui de réparation par excision de nucléotides (NER pour Nucleotide Excision Repair) pour la réparation des pontages induits par les ROS. Si ces lésions ne sont pas prises en charge, elles peuvent interférer avec les mécanismes de transcription ou de réplication, résultant ainsi en l'accumulation de mutations et dommages. Etant donné que le mécanisme majeur de réparation des bases oxydées est le BER, c'est sur celui-ci que je vais surtout m'attarder.

1.2.5 Mécanisme du BER

Le BER permet la reconnaissance et la réparation entre autres des lésions oxydatives ne causant pas de distorsion de la double hélice d'ADN. Il agit généralement en quatre étapes : 1) reconnaissance et clivage de la base nucléotidique endommagée, 2) création d'une brèche en 5' de la lésion, 3) synthèse d'ADN, 4) ligation de l'ADN (Meas et al., 2019) (Figure 3).

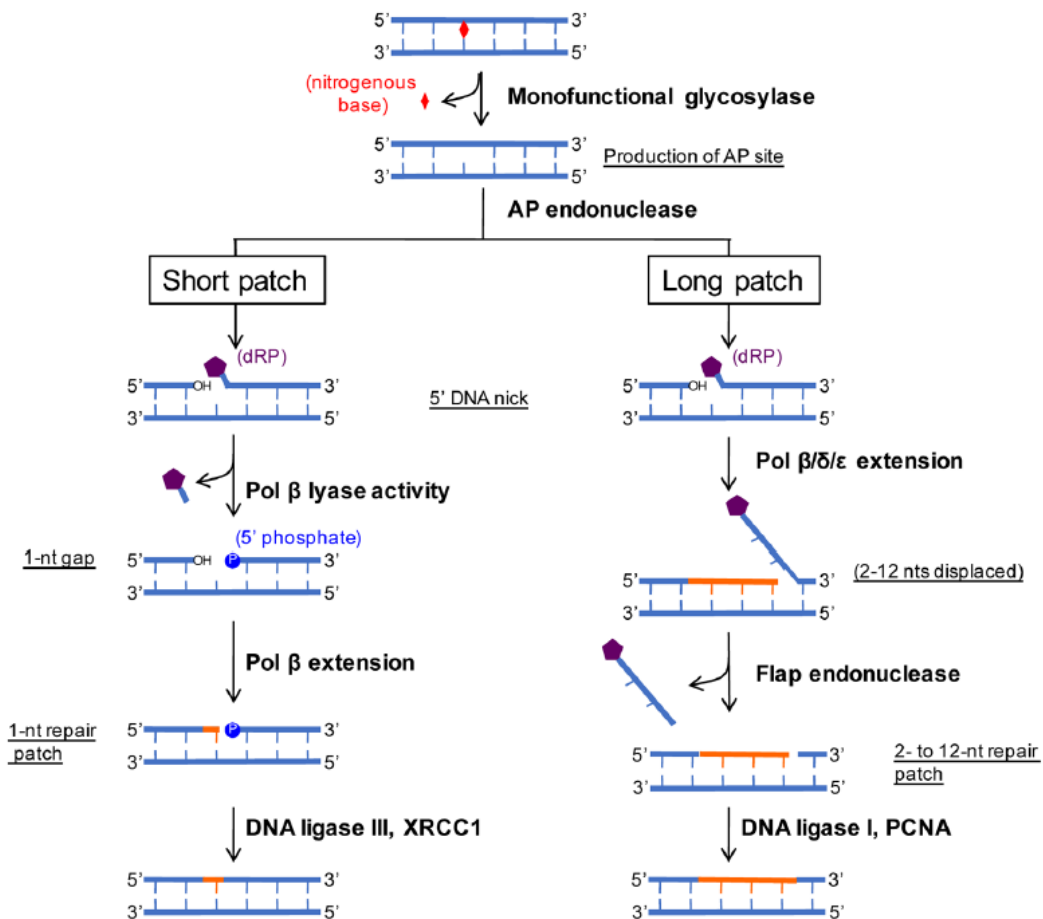


Figure 3 : La voie du BER. Une lésion n'induisant pas de distorsion de la double hélice est reconnue par une glycosylase monofonctionnelle qui clive le lien N-glycosidique, libérant ainsi la base. Cela mène à la formation d'un site abasique reconnu par une AP endonucléase (Ex : APE1) qui crée une brèche en 5'. Ce substrat peut alors être pris en charge par le long patch ou le short patch. Le short patch utilise l'activité lyase de la polβ afin d'éliminer le desoxyribosephosphate (dRP). Ensuite, la Pol étend la séquence d'un nucléotide qui est lié par la ligase III et XRCC1. Le long patch quant à lui utilise des Pol afin de créer une brèche de 2-12 nucléotides. Le brin déplacé est clivé par une Flap endonucléase, suivi d'une ligation par la ligase I et coordonnée par PCNA. Issu de Meas et al, 2019.

La première étape du BER consiste en la détection et le clivage de la lésion par des ADN glycosylases. Elles clivent le lien N-glycosidique qui lie la base d'ADN au squelette sucre-phosphate. Les ADN glycosylases sont classées en plusieurs catégories selon le type de lésions réparées : 1) les ADN glycosylases qui prennent en charge un uracile, 2) les ADN glycosylases qui réparent les bases alkylées, 3) les ADN glycosylases spécifiques des bases oxydées. Elles se distinguent aussi par leur capacité ou non à inciser le brin d'ADN sur lequel elles ont excisé la lésion. On distingue les ADN glycosylases monofonctionnelles, incapables de cliver le brin d'ADN, et les enzymes bifonctionnelles, qui possèdent en plus de leur activité ADN glycosylase une activité AP-lyase (Muralidhar L. Hegde et al., 2008). 4 types de ADN glycosylases responsables de la réparation des dommages oxydatifs ont été identifiées dans les cellules humaines : parmi elles se trouvent OGG1, NTH1, NEIL1, NEIL2, et NEIL3, ADN glycosylases

auxquelles je me suis intéressé au cours de ma thèse. Ces dernières reconnaissent différents types de lésion (Tableau 2). Par exemple, NTH1 et OGG1 éliminent respectivement les purines et les pyrimidines oxydées. Ainsi, les 8oxoG sont majoritairement réparées par OGG1 et les TG par NTH1. Il existe néanmoins des redondances entre les différentes ADN glycosylases (Hans et al., 2020).

Enzyme	Type	Substrat	Fixation	
ADN glycosylases des bases oxydées	NTH1	TG, 5-FormylU	ADN Double brin	
	OGG1	8-oxoG, Fapy-G		
	NEIL1	Fapy-A(-G), TG, 5-OHU	ADN Double et simple brin	
	NEIL2	5-OHU, 5-OHC, TG		
	NEIL3	Fapy-A, TG		
ADN glycosylases spécifiques des mismatch avec l'adenine	MYH	Monofonctionnelle	A dans 8-oxoG•A	ADN Double brin

Tableau 2 : Liste des principales ADN glycosylases chez les mammifères. Tg : Thymine glycol ; 8oxoG : 8-oxoguanine ; 5-OHU : 5-hydroxyuracile ; 5-OHC : 5-hydroxycytosine ; Fapy : Formamidopyrimidine
Adapté d'après (Hans et al., 2020; Muralidhar L Hegde et al., 2008; Hegde et al., 2013a; Klattenhoff et al., 2017a).

Il a été proposé que les ADN glycosylases se déplacent de manière aléatoires sur le génome et glissent le long de celui-ci afin de reconnaître les lésions ou finalement de se décrocher en cas d'absence de lésions (Prakash et al., 2012). Les ADN glycosylases NEIL1-2-3, NTH1 et MutYH (MYH) ont aussi été retrouvées au niveau de la fourche de réplication en IPOND, technique permettant d'isoler les protéines sur l'ADN en cours de synthèse (Bjørås et al., 2017a). Il a été proposé que les ADN glycosylases soient associées aux fourches de réplication afin de réparer les dommages avant leur rencontre par les ADN polymérase (Hegde et al., 2013a; Klattenhoff et al., 2017a). Néanmoins, OGG1 n'a pas été retrouvée au niveau des fourches de réplication, son activité étant inhibée durant la phase S contrairement à NEIL1, NEIL3 et NTH1, afin d'éviter les transversions G : C vers T : A (Boldogh, 2001). NEIL2 quant à elle, joue un rôle dans la réparation couplée à la transcription (Banerjee et al., 2011).

À la suite du clivage par les ADN glycosylases, un site abasique (ou site AP pour apurinique/apyrimidique) se voit formé. Celui-ci est pris en charge par une AP endonucléase, APE1, qui clive le lien phosphodiester en 5' du site AP, générant ainsi une cassure simple brin (Dianov and Hübscher, 2013). Selon la nature du dommage, le BER peut s'effectuer selon deux différents sous-mécanismes : le short-patch qui remplace seulement le nucléotide

endommagé, et long-patch qui quant à lui, remplace un brin d'ADN de 2-12 nucléotides à partir du site endommagé (Sattler et al., 2003) (Figure 3).

Pour le short patch, la cassure simple brin générée par APE1 est ensuite réparée par le mécanisme de réparation des cassures simple brin. Le complexe central du BER, constitué de la Pol β , XRCC1 (X-ray Repair Cross Complementing protein 1) et de l'ADN ligase IIIa (Lig IIIa) rentre en action. La Pol β élimine le sucre 5' phosphate en aval et insert un nucléotide. Puis la Ligase IIIa catalyse la ligation du groupe 3'OH nouvellement inséré avec le phosphate en 5', complétant ainsi le short patch. Si la terminaison du brin 5' est bloquée, elle ne peut pas être traitée par les enzymes du BER. C'est donc le long patch qui prend le relai. Un brin de 2-12 nucléotides est déplacé par la Pol δ , puis est coupé par la Flap Endonucléase 1 (FEN1), puis la ligation a lieu par l'ADN ligase I (Dianov and Hübscher, 2013). Il existe aussi une voie alternative du long patch dans laquelle une portion simple brin de 9 nucléotides est formée en 5' de la lésion. Celle-ci est réalisée par l'action combinée de RECQ1 et de l'endonucléase XPF-ERCC1 (Woodrick et al., 2017), 2 protéines sur lesquelles je reviendrai dans le chapitre stress réplcatif.

1.3 Cassures Doubles Brin : Source, signalisation et réparation

La molécule d'ADN est sujette à de nombreux stress endogènes et exogènes pouvant mener à des dommages interférant avec les mécanismes comme la réplication, la transcription ou la ségrégation des chromosomes. Parmi ces dommages, la cassure double brin (CBD), pour laquelle le squelette phosphate des deux brins complémentaires de l'ADN est cassé en même temps, est la plus toxique pour la cellule. Il est donc vital pour la cellule de correctement signaler et réparer ces lésions.

1.3.1 Sources de cassures double brin

Les CDB peuvent avoir lieu de manière programmée lors de la recombinaison V(D)J (Soulas-Sprauel et al., 2007), ou lors de la méiose (Murakami and Keeney, 2008). L'induction de CDB physiologiques a aussi été mise en évidence au niveau des promoteurs de certains gènes, régulant ainsi leur expression. En effet, des régions de l'ADN des cellules souches neurales primaires subissent des CDB dans des gènes participant à la neurogenèse (Wei et al., 2016).

Les CDB peuvent aussi être induites de manière accidentelle, provoquées par des sources endogènes ou exogènes.

1.3.1.1 Sources accidentelles de CDB

Au cours du cycle cellulaire, la molécule d'ADN est plus ou moins vulnérable aux dommages à l'ADN. C'est par exemple le cas lors de la réplication. En effet, il existe de nombreux facteurs pouvant empêcher la bonne progression des fourches de réplication, c'est un phénomène appelé stress répliatif, qui est responsable de nombreuses cassures double brin à extrémité unique d'origine endogène (Carr and Lambert, 2013). Je reviendrai sur le stress répliatif dans un chapitre dédié. Parmi les autres processus physiologiques pouvant provoquer des CDB, il y a les ROS dérivés des différents métabolismes cellulaires. En effet, même si les ROS provoquent plutôt des CSB, leur réparation par le BER peut également mener à la formation de CDB. Ainsi la génération de deux CSB à moins d'un tour d'hélice de distance peut mener à la formation d'une cassure double brin (Vítor et al., 2020).

1.3.1.2 Sources exogènes de CDB

De nombreux composés chimiques, dont certains utilisés en chimiothérapie, peuvent être à l'origine de CDB. Certains ciblent plutôt des facteurs de la réplication et provoquent un stress répliatif comme l'hydroxyurée. Parmi les autres composés chimiques se trouvent des agents pouvant générer des pontages inter-brin d'ADN (pontage sur les brins d'ADN opposés) ou intra-brin d'ADN (pontage sur le même brin d'ADN) comme la mitomycine C ou le cisplatine. Certains agents chimiques peuvent aussi réaliser des pontages ADN-Protéines, qui par leur taille importante, sont toxiques pour la cellule. D'autres sont des inhibiteurs de topoisomérases (TOP) comme l'étoposide (inhibiteur de TOP2) qui permet de générer des CDB. La camptothécine (inhibiteur de TOP1) produit des CSB pouvant être converties en CDB lors de la réplication de l'ADN (Vesela et al., 2017). Finalement, certains sont des agents dits radiomimétiques tels que la bléomycine et la phéomycine et produisent des CDB, CSB et dommages oxydatifs via une génération de ROS (Mladenov et al., 2009).

1.3.2 La réponse aux dommages à l'ADN

La réponse aux dommages à l'ADN (DDR pour DNA damage response) est la réponse cellulaire aux lésions de l'ADN qui sont produites aux cours des processus physiologiques ou induits par des agents exogènes. Ce mécanisme permet la détection des dommages et la mise en place

d'une réponse adaptée afin de protéger la cellule. Un défaut de réponse aux dommages mène à une instabilité génétique. Elle participe à de nombreuses pathologies humaines comme la formation de cellules cancéreuses, les maladies inflammatoires chroniques, et participe au vieillissement. Certaines maladies génétiques sont associées à des défauts de facteurs de la DDR (Ciccia and Elledge, 2010; Jackson and Bartek, 2009).

La réponse aux dommages est notamment régulée par l'activité de trois phosphatidylinositols 3 kinases like protéines kinases (PIKKs), notamment ataxia telangiectasia mutated (ATM) et rad3 related (ATR) ainsi que DNA dependent protein kinase (DNA-PK). ATM et DNA-PK sont notamment activées en réponses aux CDB, alors que ATR est plutôt activée en cas de présence de portions d'ADNs b (Blackford and Jackson, 2017). En effet ATR, en partenariat avec ATRIP, est recrutée suite au recouvrement par RPA des régions simple brin de l'ADN au niveau des fourches de réplication bloquées (Cimprich and Cortez, 2008) (Figure 4).

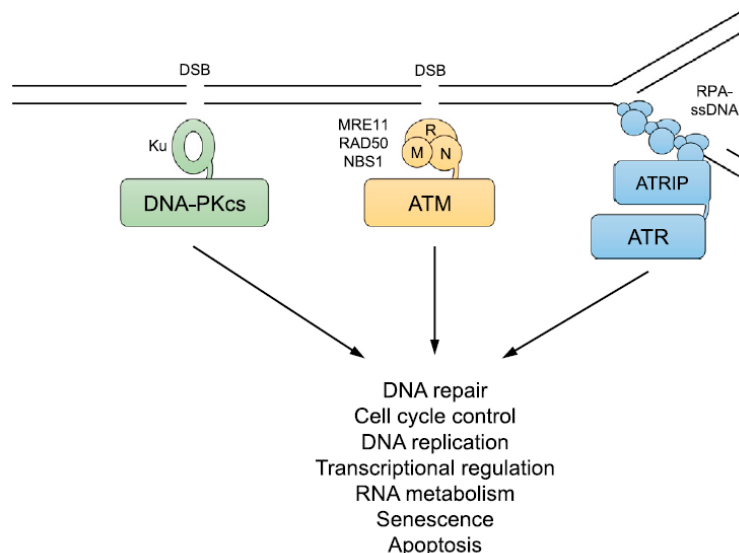


Figure 4 : Modèle de recrutement et d'activation des PIKK en réponse à des dommages à l'ADN. DNA-PK est recrutée et activée par KU lié aux extrémités de la CDB. ATM est activée et recrutée au niveau des CDB par le complexe MRN. ATR est recrutée au niveau de portions d'ADN simple brin recouvertes par RPA via son partenaire ATRIP. Issus de Blacford et Jackson, 2017.

ATM peut phosphoryler un grand nombre de cible incluant CHK2 et H2AX. La phosphorylation de l'histone H2AX (formant γ H2AX) aux niveaux des sites de CDB s'étend sur de larges distances autour de la cassure. Cela permet la fixation de MDC1, qui agit comme plateforme permettant la formation de larges complexes protéiques importants pour la réponse aux dommages à l'ADN (Lou et al., 2006, p. 1). MDC1 promeut le recrutement d'ubiquitines ligases

comme RNF8 et RNF168, facilitant la fixation de 53BP1 et BRCA1 (Hollingworth and Grand, 2015).

Il existe au moins trois senseurs, partiellement indépendants, capables de détecter les CDB : PARP1, KU70/KU80, le complexe MRN (comprenant MRE11, Rad50 et NSB1) (Ciccia and Elledge, 2010).

Les CDB peuvent être reconnues par le complexe MRN, qui médie le recrutement et l'activation d'ATM (Bekker-Jensen et al., 2006). Cette activation nécessite son autophosphorylation ce qui permet la transition d'un dimère d'ATM inactif vers un monomère fonctionnel (Bakkenist and Kastan, 2003; Hollingworth and Grand, 2015). Il a été proposé que l'activation d'ATM nécessiterait aussi son acétylation par TIP60 (Sun et al., 2005). Rad50 interagit avec MRE11 et s'associe aux extrémités de la cassure. MRE11 possède des activités endonucléase et exonucléase, importantes pour l'étape initiale de résection nécessaire à certains mécanismes de réparation des CDB. NSB1 interagit aussi avec MRE11 et possède des domaines d'interaction avec ATM, facilitant le recrutement d'ATM à la cassure (Ciccia and Elledge, 2010) (Figure 5).

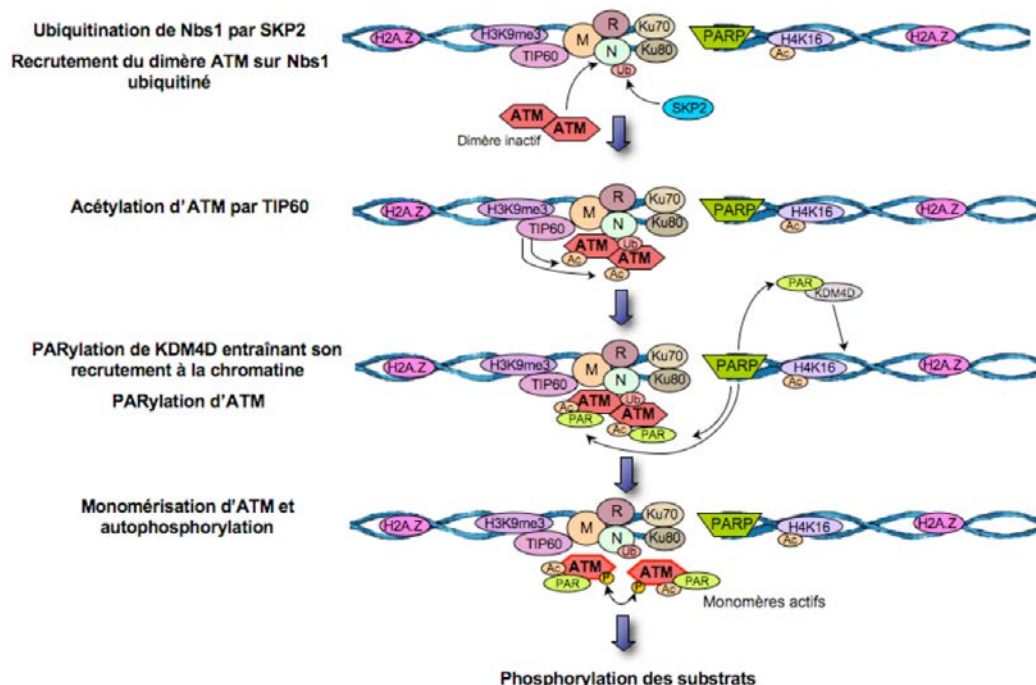


Figure 5 L'activation d'ATM à la cassure : ATM est recrutée aux CDB sous forme d'un dimère inactif par MRN et interagit avec NBS1. Le recrutement d'ATM par MRN requiert l'ubiquitination SKP2 dépendante de NSB1. La phosphorylation de γ H2AX par ATM sert de plateforme pour le recrutement de MDC1. Celle-ci recrute à son tour un autre complexe MRN permettant le recrutement d'autres protéines ATM afin d'amplifier le signal. L'amplification du signal par ATM induit l'expansion de γ H2AX autour de la CDB. PARP1 permet le recrutement de du complexe KAP1/HP1/SUV39H1. Celui-ci permet la méthylation de l'histone H3K9, permettant le recrutement de TIP60 qui promeut l'activation d'ATM et son autophosphorylation par

acétylation. Enfin, la dissociation d'ATM en monomères et son autophosphorylation permettent l'activation d'ATM, sa rétention à la chromatine et menant à une réponse aux dommages efficace. Adapté de Genet 2014

D'autres participants de la DDR sont les membres de la famille poly(ADP)ribose polymérase (PARP). Cette famille a de nombreux représentants mais seulement PARP1, PARP2 et PARP3 seraient impliqués dans la DDR. PARP1 est aussi un senseur de dommages à l'ADN activé par les CSB et CDB, et catalysant l'addition de chaînes de polymères nommé poly (ADP-ribose) ou PAR, pour recruter les facteurs de la réponse aux dommages à l'ADN. Lors de la réparation des CDB, PARP1 médie l'accumulation initiale du complexe MRN via l'ajout de PAR sur MRE11 et cela. En cela, PARP1 permet d'initier l'activation d'ATM, de γ H2AX et ainsi toute la cascade de signalisation qui en découle (Ciccio and Elledge, 2010; Ray Chaudhuri and Nussenzweig, 2017) (Figure 5). De plus, la réponse aux dommages à l'ADN nécessite la réorganisation de la structure de la chromatine afin de faciliter la réparation. PARP1 est impliquée dans la modulation de la structure de la chromatine. En effet, PARP1 permet de faciliter la dissociation des nucléosomes par PARylation des histones ce qui entraîne la relaxation de la chromatine (Ray Chaudhuri and Nussenzweig, 2017).

Un autre senseur des dommages à l'ADN, est l'hétérodimère KU70/KU80. Suite à une cassure double-brin, cet hétérodimère va rapidement se charger sur les extrémités des cassures. Il permet le chargement et l'activation de DNA-PK afin d'initier le NHEJ (Hollingworth and Grand, 2015) et la protection des extrémités des CDB.

Après la reconnaissance des lésions par des protéines « senseur », les PIKKs permettent la phosphorylation de protéines médiatrices et effectrices permettant l'amplification de la réponse aux dommages. Ces protéines cibles sont soit phosphorylées par les trois PIKKs ou par des kinases comme CHK1 et CHK2 (Hollingworth and Grand, 2015). La phosphorylation de ces protéines cibles mène à : un arrêt du cycle cellulaire, la réparation des dommages et, en cas de lésions trop importantes ou réparation défectueuses, la mort cellulaire ou l'entrée en sénescence. L'arrêt du cycle cellulaire est médié par la phosphorylation et l'inhibition de CDC25, requise pour l'activité des CDKs et la progression du cycle cellulaire. Une importante partie des mécanismes suivants sont contrôlés par P53, régulée par ATM et CHK2. P53 est capable d'induire l'arrêt du cycle cellulaire (décrit dans le chapitre 2.1.3), la mort cellulaire ou

encore l'entrée en senescence, le tout via une/des régulation(s) transcriptionnelle(s) (Ciccia and Elledge, 2010).

1.3.3 Voies de réparation des CDB

L'ensemble des signaux mis en place par les mécanismes de réponses aux dommages vont permettre à la cellule de réparer les CDB. Il existe deux principaux mécanismes de réparation des CDB : la recombinaison homologue (RH) ou la jonction ou religature d'extrémités non-homologues (NHEJ pour Non Homologous End Joining). Le NHEJ permet la ligation des extrémités des cassures non homologues et peut avoir lieu dans toutes les phases du cycle cellulaire. La RH quant à elle, elle nécessite la présence d'une séquence homologue utilisée comme modèle pour la réparation. La RH est limitée aux phases S et G2 du cycle cellulaire et est réprimée en G1 afin de s'assurer que la recombinaison ne s'effectue qu'entre les chromatides sœurs. Ainsi la cellule évite des remaniement entre des séquences répétées homologues en G1 (Panier and Durocher, 2013) (Figure 6).

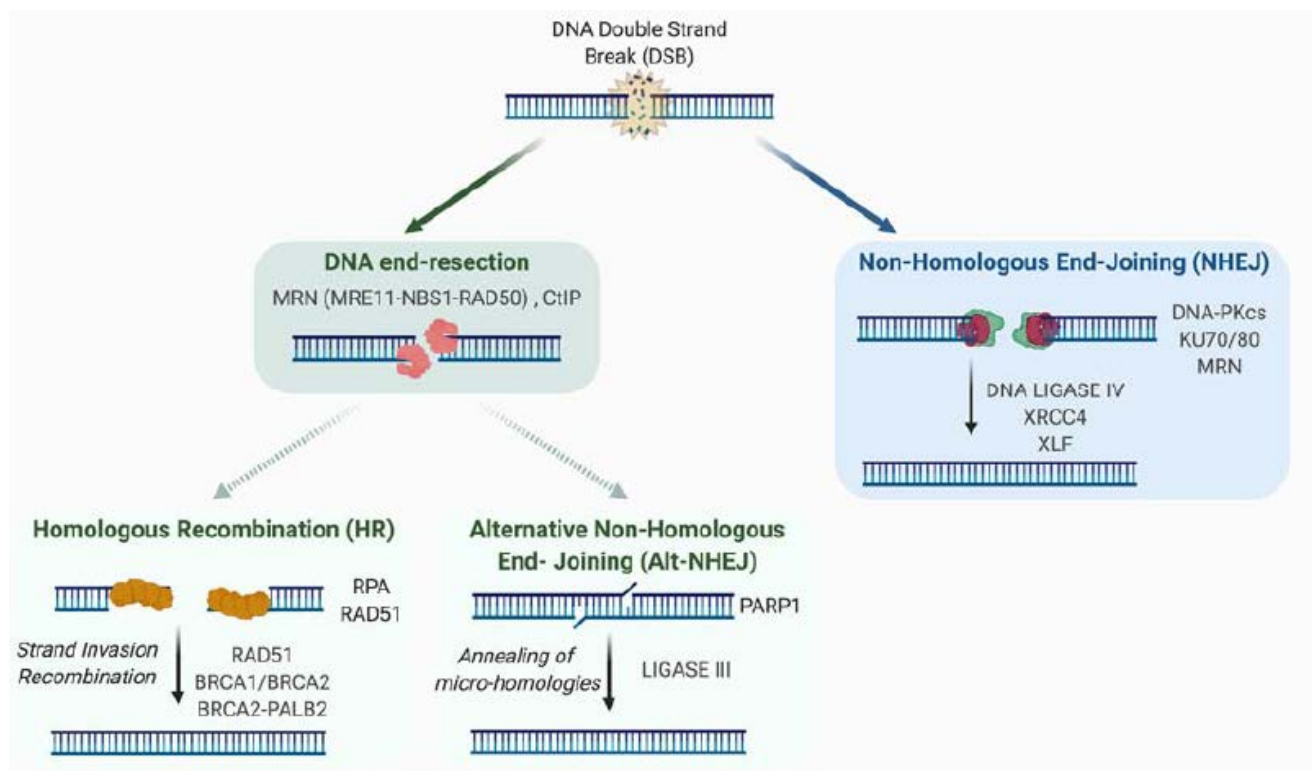


Figure 6 : Mécanismes de réparation des CDB. Il existe 2 mécanismes principaux de réparation des CDB : La RH et le C-NHEJ. Un élément clef du choix du mécanisme de réparation est la résection des extrémités de la cassure. Si la résection est bloquée, le C-NHEJ est favorisé au détriment de la RH. Il existe une voie alternative au NHEJ (A-NHEJ) qui contrairement au C-NHEJ, est infidèle et nécessite une résection courte des extrémités de la cassure. La RH quant à elle, nécessite une étape de résection extensive ainsi qu'une séquence homologue intacte. Issu de Willaume et al, 2021.

1.3.3.1 La réparation par jonction d'extrémités non-homologues ou NHEJ

1.3.3.1.1 Le NHEJ canonique

La détection de l'extrémité de la CDB par l'hétérodimère KU70/KU80 est la première étape du C-NHEJ (NHEJ canonique). Celui-ci vient se fixer aux extrémités de la cassure et permet le recrutement de DNA-PK. Un rôle de cette dernière a été proposé dans l'étape de synapse. En effet les deux extrémités de la cassure peuvent s'éloigner, il faut donc tout d'abord les maintenir à proximité et potentiellement les rapprocher dans l'étape dite de synapse (Graham et al., 2016). Une partie des CDB ont des extrémités ne permettant pas la ligation à cause de modifications chimiques des extrémités de la cassure. Une activité de nucléase est alors nécessaire afin que les extrémités de la CDB soient ligatibles par la ligase IV. Au cours du NHEJ, cette résection implique la dégradation de petites régions saillantes en 5' ou 3'. Lorsque le nettoyage des extrémités est nécessaire, DNA-PK subie des auto- ou trans-phosphorylations par ATM ou ATR permettant de modifier le complexe synaptique et de permettre l'accès aux extrémités de la cassure. De plus, la phosphorylation de DNA-PK permet le recrutement et l'activation de la nucléase ARTEMIS, qui possède des activités endonucléase et exonucléase. Une fois activée, ARTEMIS permet de préparer les extrémités pour la ligation en clivant les extrémités simple brin sortantes ou en ouvrant les épingles à cheveux (hairpins en anglais) comme dans la V(D)J. Si nécessaire, d'autres protéines peuvent aussi jouer un rôle dans le traitement des extrémités comme PNKP, APRATAXIN ou WRN (Chang et al., 2017). L'addition de nucléotides peut être nécessaire et est réalisée par les polymérases de la famille χ comme la pol μ et pol λ (Capp, 2006; Capp et al., 2007; Chang et al., 2017). Finalement, le complexe de l'ADN ligase IV, comprenant ADN ligase IV-XRCC4, et dont l'activité peut être stimulée par XLF et PAXX, réalise l'étape de ligation des deux extrémités de la cassure (Pannunzio et al., 2018). Il a été proposé que XRCC4 et XLF participent à l'étape de synapse du C-NHEJ en formant de longs filaments protéiques (Brouwer et al., 2016; Ropars et al., 2011). XLF et APLF peuvent se fixer au complexe Ku, favorisant la formation de ce filament, et donc aussi la réparation des CDB ainsi que la survie cellulaire aux IR (Nemoz et al., 2018) (Figure 7).

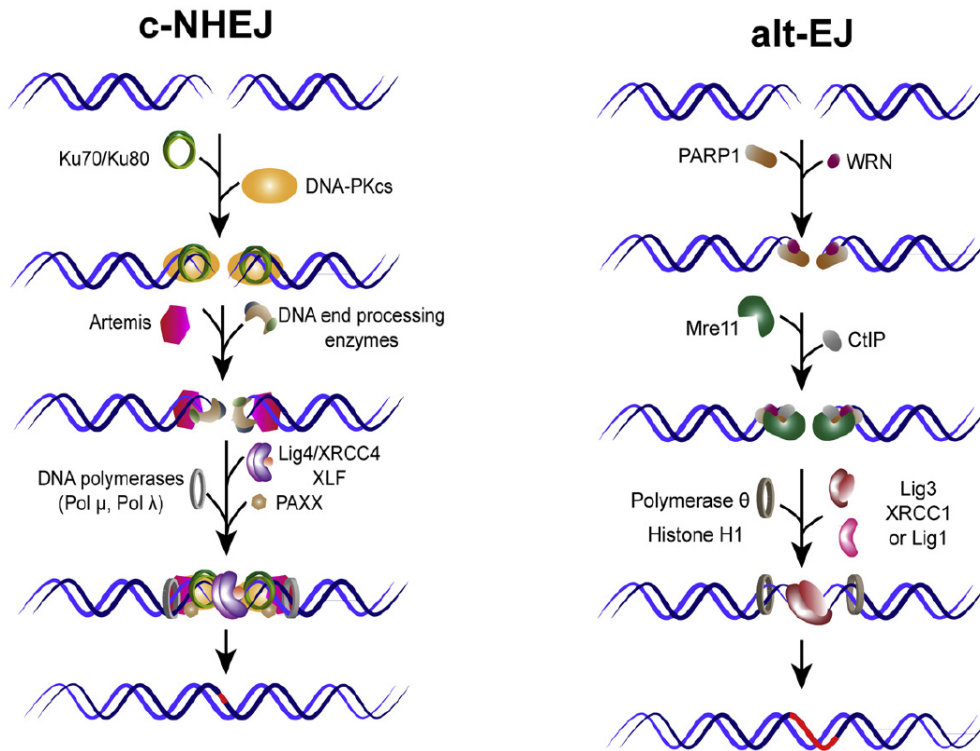


Figure 7 Le NHEJ alternatif et canonique. Le C-NHEJ permet la réparation des CDB avec une haute fidélité. L'association de KU aux extrémités facilite le recrutement de DNA-PK. DNA-PK favorise l'activité de la nucléase ARTEMIS qui permet de générer des extrémités ligaturables par Lig4/XRCC4/XLF. Le A-NHEJ quant à lui, permet la réparation des CDB grâce à des micro-homologies, au détriment de l'intégrité du génome. PARP1 se lie aux extrémités de la cassure, et facilite le recrutement de facteurs de la résection comme CtIP et MRN qui permettent la formation de micro-homologies. Favorisé par la polymérase θ , ces micro-homologies vont pouvoir s'apparier, générant des queues 3' sortantes. Elles seraient clivées par FEN1 ou XPF-ERCC1. Par la suite, la ligation se fait par XRCC1-LIG3, favorisé par l'histone H1. Adapté de (Iliakis et al., 2015).

1.3.3.1.2 Le NHEJ alternatif

Une voie alternative (A-NHEJ) au NHEJ canonique existe et contrairement au NHEJ canonique, celui-ci est très imprécis et mène à la perte d'informations. Ce mécanisme décrit lors de la déficience en différents facteurs du C-NHEJ, est indépendant de Ku70/80, DNA-PK, LigIV et XRCC4 (Guirouilh-Barbat et al., 2004, 2007; Yan et al., 2007). Le A-NHEJ est similaire au mécanisme d'hybridation simple brin (SSA pour single strand annealing) et nécessite des résections de parties non protégées de l'ADN et la subséquente hybridation avec des homologies distantes de la CDB. Ces homologies seraient néanmoins plus courtes que celle nécessaires au SSA et donc appelée micro-homologies. Ce NHEJ alternatif est initié par une résection simple brin dans laquelle sont impliqués CtIP et le complexe MRN, soulignant ainsi l'importance pour l'initiation du A-NHEJ de cette étape de résection (Rass et al., 2009; Xie et al., 2009) (Figure 7). En effet, la HR nécessite une résection extensive, alors que le A-NHEJ, lui, ne nécessite qu'une résection limitée. Cette étape de résection est essentielle au choix du mécanisme de réparation. Le premier choix se fait entre le C-NHEJ et la résection, le second

entre RH et A-NHEJ, dépendante de la longueur de la résection effectuée (Figure 6) (Rass et al., 2009).

1.3.3.2 La réparation par recombinaison homologue

Le recombinaison homologue (Figure 8) est un mécanisme conservé au cours de l'évolution participant à la stabilité du génome et la transmission de l'information génétique. La RH a un rôle clef dans la réparation des CDB. La RH requiert la présence d'une séquence homologue intacte pour utiliser comme modèle, et est limitée aux phases S/G2 lorsque la chromatide sœur est présente.

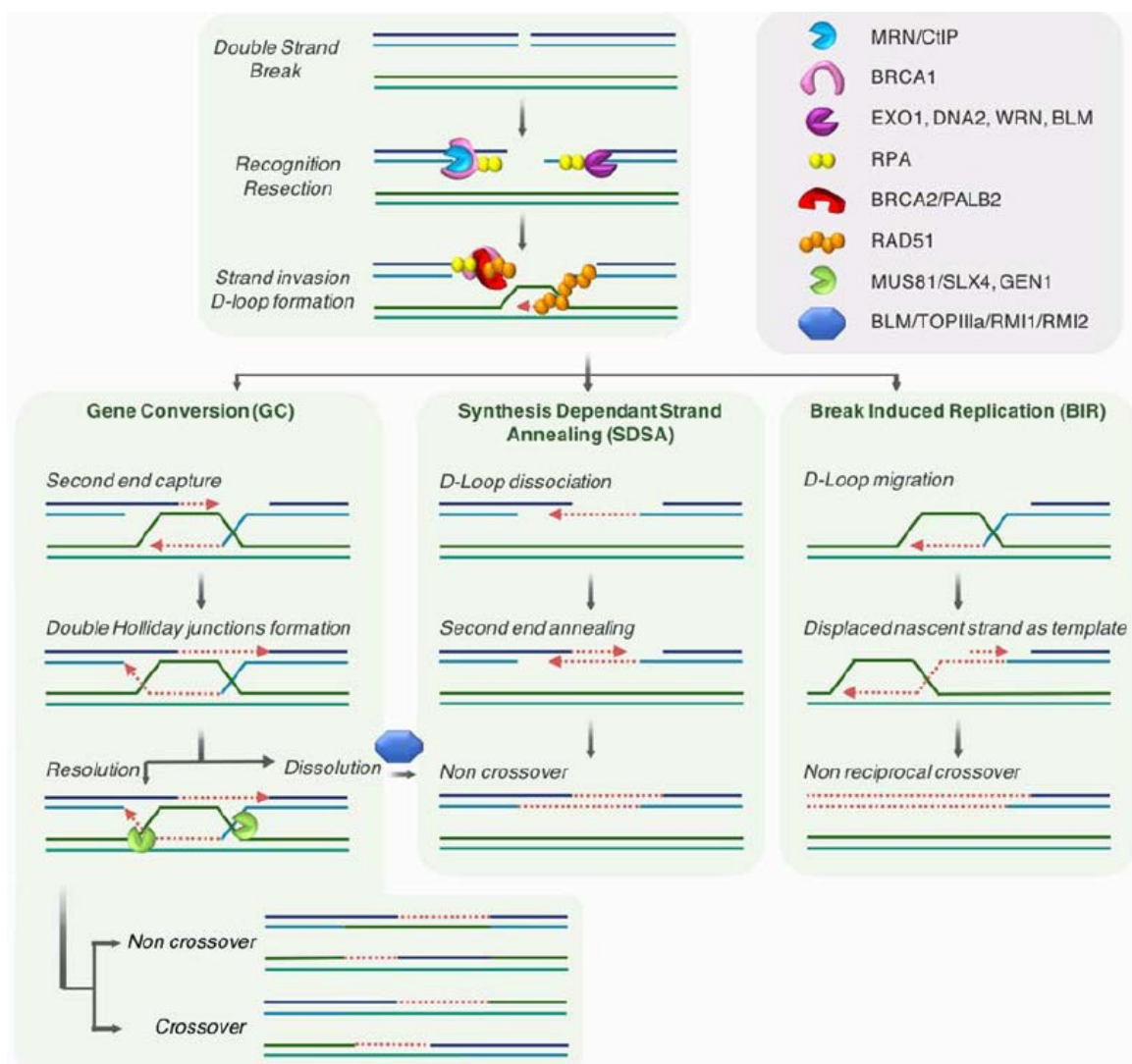


Figure 8 La recombinaison homologue. La résection initiale est médiée par le complexe MRN/CtIP. Par la suite, une résection plus importante a lieu par des hélicases et nucléases telles que EXO1, DNA2, WRN et BLM. Cette étape permet la génération de longues extrémités d'ADN sb en 3'. Ces portions d'ADN sb sont protégées par RPA. RPA est alors déplacé par BRCA2/PALB2, puis remplacé par RAD51. Cela permet la formation d'un nucléofilament de RAD51 permettant la recherche d'une homologie de séquence, l'invasion et la formation d'une boucle D. Il existe 3 mécanismes principaux faisant partie de la RH. La conversion génique (GC), l'appariement de brin dépendant de la synthèse (SDSA) et la réplication induite par les cassures double brin (BIR). Issu de Willaume et al, 2021.

1.3.3.2.1 Etape initiale de résection

La RH est initiée par une étape essentielle de résection 5'-3' des extrémités de la cassure afin d'obtenir une extension d'ADN simple brin en 3' (Figure 8). Celle-ci débute par la reconnaissance de la cassure par le complexe MRN et sa fixation aux extrémités. Il y a alors activation d'ATM et une résection en deux étapes a alors lieu. Une première étape de résection nucléotidique courte est réalisée par le complexe MRN/CtIP (pour C-terminal binding protein -interacting protein) et favorisée par BRCA1. MRE11, amorce la résection par un clivage avec son activité endonucléase à quelque dizaines de nucléotides de l'extrémité de la CDB, suivie d'une résection 3'-5' via son activité exonucléase (Mimitou and Symington, 2008; Zhu et al., 2008; Cejka, 2015; Daley et al., 2015). Cette étape initiale, nécessite l'activité ATPase de RAD50, ainsi que la présence de CtIP et NSB1 comme cofacteurs (Kim et al., 2017). Par la suite, une deuxième étape de résection longue bidirectionnelle a lieu sur plusieurs kilobases. Celle-ci est, entre autres, prise en charge par l'exonucléase EXO1, favorisée par MRN et l'hélicase BLM générant ainsi de longues extensions 3' simple brin nécessaires à la recherche de séquences homologues (Nimonkar et al., 2011). Aussi, la résection peut aussi être réalisée par l'action de DNA2, associée aux hélicases BLM et WRN (Cejka, 2015). De manière intéressante, l'activité de BLM est stimulée par son interaction avec le complexe TOPOIII durant la phase S, alors que la résection peut être inhibée en cas de rencontre avec des protéines telles que 53BP1 ou RIF1 (Grabarz et al., 2013).

1.3.3.2.2 Formation du filament RAD51

Les extensions d'ADN simple brin sont alors recouvertes par la protéine RPA, les protégeant ainsi de la dégradation. Le recrutement de BRCA2 est réalisé par BRCA1 via PALB2, protéine interagissant avec à la fois BRCA1 et BRCA2. Par la suite, BRCA2 et PALB2 médient le remplacement de RPA par RAD51, permettant ainsi la formation du nucléofilament de RAD51 dit présynaptique. Le filament de RAD51 sonde le génome à la recherche d'homologies de séquence. Une fois une homologie trouvée, il y a invasion du brin 3' sortant couvert de RAD51 dans la molécule double brin homologue qui servira par la suite de matrice. Cela entraîne le déplacement du brin homologue et la formation d'une structure nommée boucle D (ou D-Loop pour Displacement loop) et selon la voie sous-jacente de la RH, la création d'une jonction de Holliday (Prakash et al., 2015).

1.3.3.2.3 Résolution

Selon comment les intermédiaires de la RH sont pris en charge, la RH peut être divisée en trois voies sous-jacentes principales qui sont : l'appariement de brin dépendant de la synthèse (SDSA pour synthesis-dependant strand annealing) ; la conversion génique (CG) ; La réplication induite par les cassures double brin (BIR pour break-induced replication). Selon la voie utilisée, le produit final sera différent. Ainsi, certains seront caractérisés par la présence d'un crossover ou non. Un crossover est caractérisé par un échange non réciproque au niveau chromosomique entre le brin d'ADN réparé et celui ayant servi de modèle à la réparation. Si celui-ci a lieu entre deux chromatides sœurs dans des loci non homologues, il peut y avoir réarrangement chromosomique (Mehta and Haber, 2014).

1.3.3.2.4 L'appariement de brin dépendant de la synthèse (SDSA)

L'extrémité 3' de la boucle D est utilisée comme amorce pour réaliser la synthèse d'ADN de la séquence manquante (Figure 8). Dans ce modèle, la boucle D est transitoire et est ensuite dissolue, ne générant pas de jonction de Holliday. La matrice de réparation reprend sa structure en double brin, la partie simple brin est complétée et se lie à la séquence complémentaire sur l'autre extrémité de la cassure. Ce mécanisme ne permet pas la formation de crossover (Ranjha et al., 2018).

1.3.3.2.5 La conversion génique (CG)

Durant la CG, l'extension de la boucle D promeut l'hybridation avec l'autre extrémité de la cassure, générant ainsi une double jonction de Holliday. Celle-ci est ensuite résolue par dissolution ou clivage. La dissolution d'une double jonction de Holliday nécessite l'action de BLM-TOPOIII et RMI1-RIM2. Ce mécanisme ne génère pas de produits de crossover. Néanmoins, il est possible que la jonction de Holliday soit résolue par clivage, via des endonucléases spécifiques de structures (SSE pour structure specific endonucleases) telles que GEN1 ou les SSE recrutées par SLX4 tel que MUS81, SLX1, XPF. Ce mécanisme permet de produire à la fois des produits de conversion génique associée ou non avec des crossover (Figure 8) (Kowalczykowski, 2015; Mehta and Haber, 2014).

1.3.3.2.6 La réplication induite par les cassures double brin (BIR)

Lorsqu'une seule des deux extrémités de la cassure est disponible pour la RH, le BIR est initié. Le BIR permet la synthèse d'ADN par déplacement et extension de la D-Loop pouvant migrer jusqu'à la fin du chromosome (Figure 8). Des centaines de kilobases sont copiées du

chromosome donneur sauf si un évènement bloquant le BIR, telle que la collision avec une fourche de réplication, à lieu. La D-Loop mène à la formation de longues portions d'ADNs, particulièrement vulnérables aux mutations et aux réarrangements. Le BIR est donc hautement mutagénique et peut en résulter une perte d'hétérozygotie (Deem et al., 2011; Elango et al., 2018; Kowalczykowski, 2015; Scully et al., 2019).

1.3.3.3 L'hybridation d'ADN simple brin (SSA pour single strand annealing)

Il existe un autre mécanisme utilisant des séquences homologues mais ne nécessitant pas l'invasion par un nucléofilament de RAD51 ou la formation d'une boucle D. Durant ce processus, l'étape de résection 5'-3' continue et génère de longues portions d'ADN simple brin 3' jusqu'à ce qu'une région complémentaire soit trouvée. Il y a donc hybridation des séquences complémentaires et clivage nucléotidique des extrémités sortantes non appariées par XPF-ERCC1, recrutées par les protéines de la réparation des mésappariement MSH2 et MSH3. Il y a alors perte de l'information génétique entre les séquences répétées (Mehta and Haber, 2014; Ranjha et al., 2018).

1.3.3.4 Choix du mécanisme de réparation

Il existe donc différents mécanismes et sous-mécanismes de réparation des CDB. La RH est confinée aux phases S/G2 lorsqu'une séquence homologue est disponible pour la réparation. Si la RH a lieu durant la phase G1, une séquence homologue sera trouvée sur le chromosome homologue. Cela peut mener à une perte d'hétérozygotie et la perte d'information génétique. La RH se doit donc d'être limitée aux phase S/G2 du cycle cellulaire. A l'inverse, le NHEJ peut fonctionner durant toutes les phases du cycle. Néanmoins son action doit aussi se voir limitée à certaines phases du cycle. Par exemple la réparation par le NHEJ de CDB en phase M peut mener à des fusions chromosomiques. Le choix du mécanisme de réparation varie donc selon la phase du cycle cellulaire, la localisation de la CDB, le type cellulaire et la nature des extrémités de la CDB. La phase du cycle cellulaire joue un rôle clef dans l'initiation de la résection (Ceccaldi et al., 2016). Le choix du mécanisme de réparation se fait entre le C-NHEJ, ne nécessitant pas d'étape de résection initiale au niveau des extrémités de la CDB, et les autres, qui en ont besoin (A-NHEJ, RH). Au niveau moléculaire, passer outre le C-NHEJ nécessite le déplacement du complexe KU70-KU80 des extrémités de la cassure (Scully et al., 2019). Le déplacement de KU70-KU80 peut être réalisé par dégradation ciblée via les ubiquitines ligases E3 RNF138 et RNF8, ou l'initiation de la résection (Postow et al., 2008; Feng

and Chen, 2012; Ismail et al., 2015). Les CDKs (pour : cell cycle dependant kinases), dont l'activité augmente à l'entrée en phase S, servent de signaux d'activation de la résection. Par exemple, il a phosphorylation de CtIP par les CDKs favorisant la formation du complexe CtIP-BRCA1, favorisant la résection (Huertas and Jackson, 2009; Ceccaldi et al., 2016).

Le rôle antagoniste entre 53BP1 et BRCA1, joue un rôle important dans la régulation du choix des mécanismes de réparation des CDB en favorisant ou non la résection. BRCA1 possède de multiples rôles dans les mécanismes de réparation des dommages, l'un d'eux étant de promouvoir la RH en favorisant la résection (Huen et al., 2010). A l'inverse, 53BP1, un acteur clef de la réparation, inhibe la résection via le complexe shieldin et favorise le NHEJ au détriment de la RH. 53BP1 est recruté au CDB y compris en S/G2 et la phosphorylation par ATM de 53BP1 permet le recrutement de RIF1 (RAP1-interacting factor 1). Une fois recrutées au niveau des cassures, 53BP1 et RIF1 forment un barrière et protège d'une résection extensive (Isono et al., 2017). En phase S/G2, MRN et CtIP initient la résection mais ne peuvent procéder dû à la présence de 53BP1 et de RIF1. Afin de retirer cette barrière, BRCA1 médie la déphosphorylation de 53BP1 via PP4C. Cela mène à la dissociation du complexe 53BP1-RIF1 et rend les extrémités des cassures accessibles à la résection (Isono et al., 2017).

De plus durant la mitose, PLK1 interagit avec 53BP1 sous le contrôle de CDK1. Cela permet la phosphorylation de 53BP1 et empêche sa fixation à la chromatine, inhibant ainsi son action sur la réparation en phase M. Une activation du NHEJ en phase M peut mener à des fusions télomériques produisant des chromosomes dicentriques déstabilisant l'intégrité du génome (Orthwein et al., 2014; Benada et al., 2015). En G1, 53BP1 est dephosphorylé par PP4C/R3β afin de permettre à nouveau son recrutement aux cassures (Lee et al., 2014).

Au cours de ma thèse, j'ai participé à une étude (voir annexe) montrant que la lamine B1, une protéine de l'enveloppe nucléaire, participe aussi au contrôle du recrutement de 53BP1 en interagissant directement avec celle-ci (à distance des dommages). Après dommages à l'ADN, 53BP1 se dissocie de la lamine B1 et est recrutée au niveau des CDB. En cas de surexpression de la lamine B1, 53BP1 est séquestrée par la lamine B1, induisant un défaut de réparation (Etourneaud et al, 2021).

2 Le stress réplicatif

2.1 Le cycle cellulaire

Le cycle cellulaire eucaryote est un processus fondamental qui régule la division cellulaire. Il est défini par une série d'évènements au cours desquels les composants cellulaires doublent et mènent à la formation de deux cellules filles. Le cycle cellulaire est composé de l'interphase et de la division cellulaire à proprement parler : la mitose (phase M). L'interphase constitue 90% de la durée du cycle cellulaire, comprend deux phases dites « d'intervalles », les phases G1 et G2 (tiré de l'anglais « gap »), encadrant une phase de synthèse de l'ADN (phase S) (Figure 9) (Barnum and O'Connell, 2014).

2.1.1 Régulation du cycle cellulaire

La régulation de la progression du cycle cellulaire est essentielle afin d'éviter une prolifération incontrôlée, une instabilité génétique et la tumorigénèse. Cette régulation se fait par une stricte régulation par des sérines/tyrosines kinases appelées « cycline dépendant kinases » (CDKs) (Figure 9). L'activité des CDK requiert la liaison avec des sous-unités régulatrices connues sous le nom de cyclines. Ces dernières sont synthétisées et éliminées à des moments précis du cycle cellulaire, régulant ainsi de manière temporaire les CDKs et la progression au travers du cycle cellulaire. Ainsi, durant la phase G1, les CDK 4-6 sont associées aux cyclines D. Le complexe Cycline E/CDK2 est transitoire et permet le passage G1/S. Les Cyclines A/CDK2 quant à elles, sont exprimées en phase S et permettent la transition S/G2 avant d'être remplacées par les CDK1 durant la phase G2. Finalement, la progression des cellules en mitose nécessite le dimère Cycline B/CDK1 (Malumbres and Barbacid, 2009).

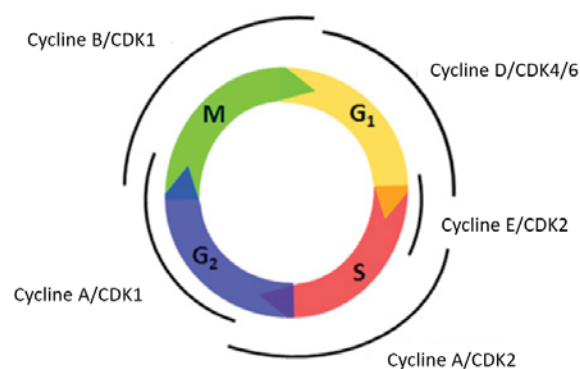


Figure 9 : La régulation du cycle cellulaire par les Cyclines et les CDK. Adapté de Suryadinata et al, 2010.

Etant donné l'importance des Cyclines et CDK dans la progression du cycle cellulaire, il existe un autre niveau de régulation des CDK. En effet, ces dernières peuvent être régulées par l'association à des sous-unités inhibitrices, les CKi (Cyclin dependent kinase inhibitory proteins) permettant ou non des évènements de phosphorylations sur des résidus des CDKs. Par exemple, des membres de la famille INK4 comme p16 peuvent bloquer l'association CDK4 et 6 avec les cyclines (Besson et al., 2008).

2.1.2 Les bases de la réplication de l'ADN

La réplication de l'ADN génomique précède chaque division cellulaire. La réplication constitue pour les cellules une étape hautement contrôlée et complexe. Une réplication de l'ADN fidèle, sécurisée par un contrôle strict du cycle cellulaire, est un processus fondamental essentiel au maintien de la stabilité du génome. La réplication de l'ADN est le résultat du doublement du génome d'une cellule avant division cellulaire. Ce processus strictement régulé requiert l'assemblage de plus de 50 protéines et co-acteurs sur la fourche de réplication. Ce processus se déroule en plusieurs étapes comprenant : une initiation de réplication, régulée au cours du temps et à des endroits précis du génome. Ensuite, une étape d'élongation au cours de laquelle la fourche de réplication se déplace de manière bidirectionnelle et duplique la totalité du génome. Au niveau de chaque fourche de réplication, les deux brins du duplex d'ADN parental se séparent et l'ADN néo synthétisé est formé par la machinerie de réplication. Enfin, la réplication se termine lorsque que les fourches de réplication convergent (Riera et al., 2017).

2.1.2.1 *Initiation de la réplication*

L'initiation de la réplication du génome se déroule au niveau des origines de réplication. La mise en place et l'activation de tous les complexes de pré-réplication se déroulent au cours de la phase G1. Premièrement, au niveau des origines de réplication est recruté le complexe de reconnaissance des origines (ORC), suivi par le recrutement de CDC6, CDT1 puis du complexe d'hélicases MCM2-7. Ces dernières fournissent une activité hélicase afin de dérouler l'ADN en amont de la fourche de réplication (Deegan and Diffley, 2016; Fragkos et al., 2015).

L'activation des origines de réplication a lieu en phase G1-S et nécessite l'activation des hélicases MCM et la formation du complexe de pré-initiation. L'assemblage de ce dernier nécessite l'activité de CDKs et DDKs (Dbf4-dependent kinases) menant à l'association du

complexe GINS avec MCM et CDC45 (complexe CGM) et son activation (Parker et al., 2017). Ce complexe permet le recrutement de nombreuses protéines formant la machinerie moléculaire connue sous le nom de réplisome. Ce recrutement de protéines permet la formation de fourches de réplication bidirectionnelles et la synthèse d'ADN par les polymérase, dont l'activité est augmentée par PCNA (Moldovan et al., 2007).

2.1.2.2 Elongation

Au cours de la réplication de l'ADN, les deux brins naissants sont synthétisés différemment. La synthèse du brin précoce suit la même direction que la progression de la fourche et se fait de manière continue dans le sens 5'-3'. Le brin tardif est synthétisé de façon discontinue en formant de courts fragments d'Okazaki qui seront clivés par FEN1 puis ligaturés par la suite pour former un brin continu (figure 10) (Balakrishnan and Bambara, 2013).

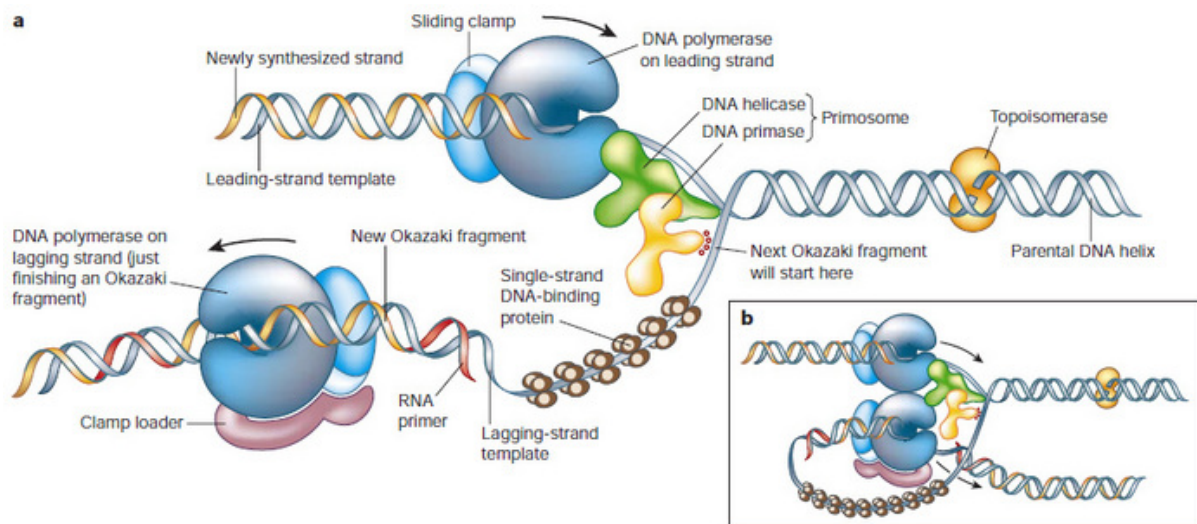


Figure 10 : La fourche de réplication. Les protéines de la réplication sont illustrées en a. Cependant, en 3 dimensions, la fourche de réplication est repliée en une structure présentée en b. En a : 2 ADN polymérase sont actives sur la fourche en même temps. L'une synthétise de manière continue en 5'3' tandis que l'autre produit des fragments d'Okazaki sur le brin discontinu. Les hélicases permettent l'ouverture de la double hélice, aidées par des topoisomérases. Les portions simple brin sont recouvertes par RPA (sur le schéma : single-strand DNA binding protein), permettant sa stabilisation. Issus de Das-Bradoo et al, 2010

L'activation des hélicases CGM conduit à l'ouverture de la double hélice d'ADN et la formation d'ADN simple brin. Celui-ci est recouvert par RPA permettant sa stabilisation et protection ainsi que la fixation de l'ADN polymérase nécessaire à l'initiation de la réplication (Heller et al., 2011). La polymérase permet d'étendre avec des dNTPs les amorces d'ARN générées par la primase. En effet l'amorçage de la synthèse de l'ADN à partir amorces d'ARN de 5-10 NTP par des primases est essentiel à la réplication de l'ADN. Ces amorces sont présentes aussi bien sur les brins continus que discontinus. Sur le brin continu, pol δ permet de poursuivre

l'élongation. Sur le brin discontinu, la Pol δ permet d'assembler des hybrides ARN-ADN de 100-200 nucléotides appelé fragments d'Okazaki. (Pellegrini, 2012). Lorsque la synthèse du brin retardé est terminée, et les brins d'Okazaki sont éliminés, les amorces sont excisées via l'action combinée de la Pol δ , PCNA et la RNaseH. Ceux-ci permettent l'action de la nucléase FEN1 et de la nucléase-hélicase DNA2 afin d'exciser les flaps d'ADN sb en 5' (Burgers, 2009). PCNA, recrutée sur l'ADN par l'intervention du facteur de réplication (RFC) et de CTF18-RFC-like complex, a d'autre rôle dans l'élongation et la réplication. En effet, la processivité des polymérases répliquatives requiert la présence de PCNA. Cette protéine est un trimère dont la structure en anneau lui permet d'entourer le brin d'ADN qu'il fixe. Cet anneau coulissant permet l'ancrage de Pol ϵ et Pol δ à leur brin modèle et permet d'améliorer la vitesse (ou processivité) de réplication (Yeeles et al., 2017).

Alors que la fourche de réplication progresse le long du génome, des stress topologiques s'accumulent et des surenroulements positifs sont formés en aval de la fourche. Si trop de surenroulements sont accumulés, la fourche de réplication ne pourra plus progresser et la réplication cessera. C'est pourquoi les topoisomérases de type I et II éliminent ces structures/surenroulements (Dewar and Walter, 2017).

2.1.2.3 Terminaison de la réplication

La terminaison de la réplication est un mécanisme peu connu et pourtant aussi fréquent que l'initiation. Ainsi, plusieurs processus sont considérés comme prenant part à la terminaison de la réplication. Elle nécessite la dissociation complète du réplisome (pour revue, (Dewar and Walter, 2017)).

2.1.3 Points de contrôle du cycle cellulaire

L'ADN contenu dans chacune de nos cellules est constamment soumis à des stress exogènes et endogènes susceptibles de créer des cassures. Afin de permettre la réparation des dommages, le cycle cellulaire est régulé au niveau de points de contrôle permettant des arrêts temporaires du cycle (Figure 11). Ces arrêts de cycle sont sous le contrôle des CDK dont l'inhibition stoppe le cycle cellulaire. Il existe majoritairement 4 points de contrôle, un pour chaque phase du cycle cellulaire avec des rôles particuliers. Le point de contrôle G1/S empêche les cellules de rentrer en phase S pour éviter de répliquer de l'ADN endommagé, ce qui peut être source de mutations ou de stress répliquatif. Le point de contrôle de la phase S

permet de retarder la réplication de l'ADN afin de réparer les dommages subis en phase S ou de redémarrer les fourches bloquées. En cas de réplication trop longue ou de dommages persistants, il existe le point de contrôle G2/M qui empêche la cellule endommagée de rentrer en mitose. Finalement, il existe un dernier point de contrôle, qui permet la sortie de la mitose, uniquement si les chromosomes sont correctement attachés au fuseau mitotique (Barnum and O'Connell, 2014; Shaltiel et al., 2015).

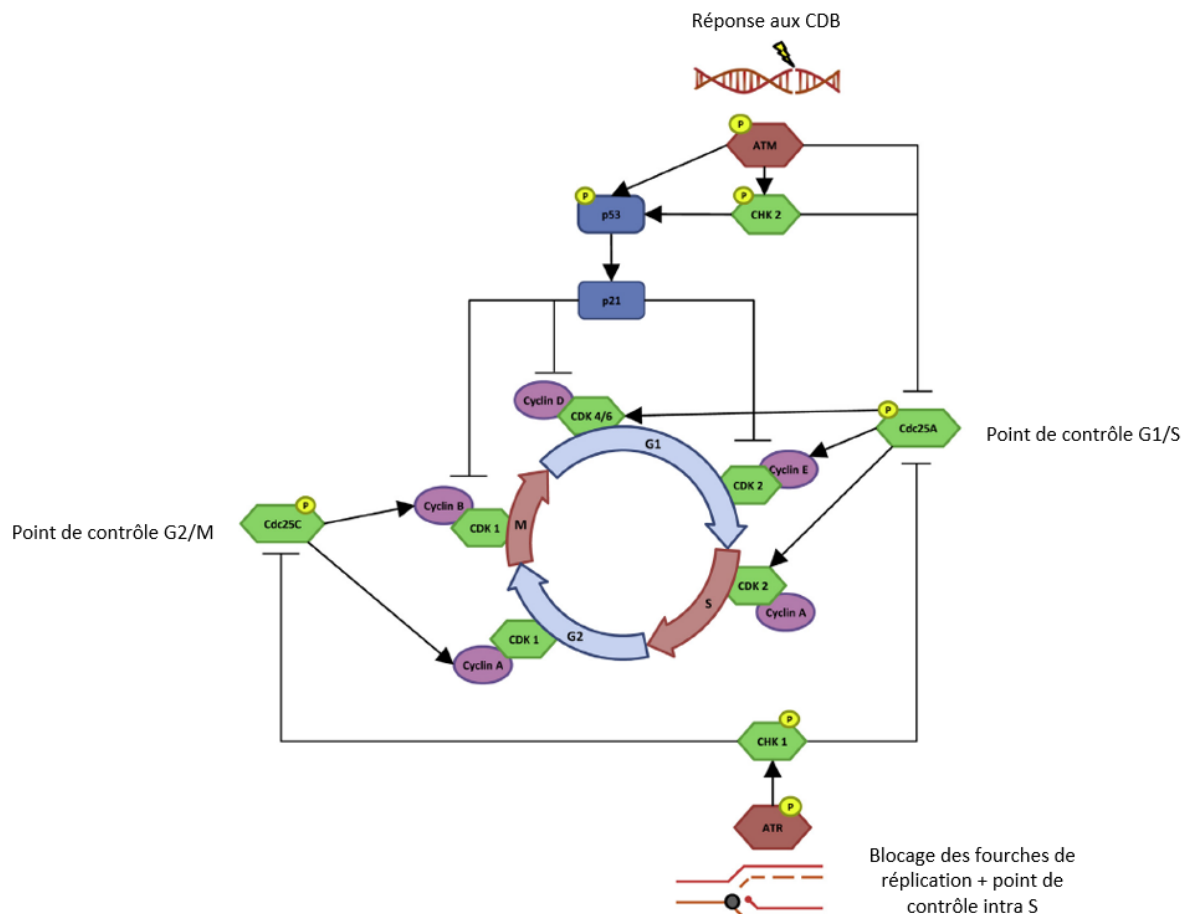


Figure 11 : Les principaux acteurs moléculaires participants à la mise en place des points de contrôles suite à des dommages. En réponse à des dommages, les cellules vont activer 3 principaux points de contrôles : G1/S, intra phase S et G2/M. Les CDB activent la signalisation par ATM-CHK2 qui bloquent la progression en G1/S via P53/P21 et en inhibant CDC25. En cas de stress réplicatif, ATR/CHK1 permettent un blocage en phase S via l'inhibition de CDC25. De plus, ATR/CHK1 et ATM/CHK2 peuvent bloquer les cellules en G2/M. Adapté de Hergovich et al, 2016.

En cas de dommages à l'ADN, les points de contrôle sont principalement gérés par les mécanismes de réponse aux dommages à l'ADN, notamment les kinases ATM et ATR. Après CDB durant la phase G1, ATM et CHK2 permettent l'activation du point de contrôle G1/S via l'activation de P53. Celle-ci permet la transcription de CDKi P21, menant à l'inhibition des complexes CDK-cyclines nécessaire à l'entrée en phase S (Figure 11). C'est un processus lent qui peut être mis en place plusieurs heures après dommages. Néanmoins le point de contrôle

empêchant l'entrée en phase S n'est pas total et dans certains cas, des cellules ignorent le point de contrôle et passent en phase S avec des dommages à l'ADN, ce qui peut entraîner un stress répliatif (Gomez and Hergovich, 2016).

Durant la phase S, la progression des fourches de réplication peut être régulée en cas de dommages soit en inhibant le démarrage de nouvelles origines de réplication, soit en arrêtant ou ralentissant la fourche de réplication. En effet, en cas de CDB, l'activation d'ATM et de CHK2 induit la phosphorylation CDC25A, ce qui provoque sa dégradation. Le ralentissement ou l'arrêt des fourches de réplication entraîne l'accumulation d'ADNsb. Celui-ci sera alors recouvert par la protéine RPA, permettant l'activation d'ATR. L'activation de CHK1 par ATR induit aussi la dégradation de CDC25A. La perte de CDC25A prévient la déphosphorylation et l'activation du complexe CDK2-cycline E (Figure 11). Cela empêche le chargement de CDC45 sur les origines de réplication et donc leur initiation (Gomez and Hergovich, 2016; Willis and Rhind, 2009).

Prévenir l'entrée en mitose permet d'éviter la propagation de dommages à la cellule fille. Ce point de contrôle nécessite l'activation de CHK1/2 via ATM/ATR menant là encore, à l'inhibition de CDC25. Dans cette situation, CDK1 reste inactif, inhibée par WEE1. L'entrée en mitose est donc impossible. Aussi, ATM et ATR permettent l'activation de P53. Cela induit la transcription de p21, inhibiteur de l'activité de CDK1 (Figure 11) (Gomez and Hergovich, 2016).

2.2 Les différentes sources de stress répliatif

Toute cellule en prolifération doit maintenir la stabilité de son génome et garantir une correcte ségrégation des chromosomes ainsi qu'une duplication fidèle de son génome. Bien que la réplication soit un mécanisme extrêmement précis et régulé de manière stricte, la fourche de réplication doit fréquemment faire face à de nombreux obstacles. En effet de nombreux facteurs endogènes ou exogènes entravent la progression de la fourche de réplication (Figure 12). Des changements de vitesse de réplication ou blocages de la fourche de peuvent avoir lieu. Ainsi, le stress répliatif est défini comme toute perturbation du processus de réplication. C'est l'une des sources endogènes de dommages les plus importantes de la cellule. Cela peut mener, si les cellules continuent de proliférer sans réparation, à des pertes d'informations génétiques, des aberrations chromosomiques et de l'instabilité génétique générale pouvant mener à la formation de cellules cancéreuses.

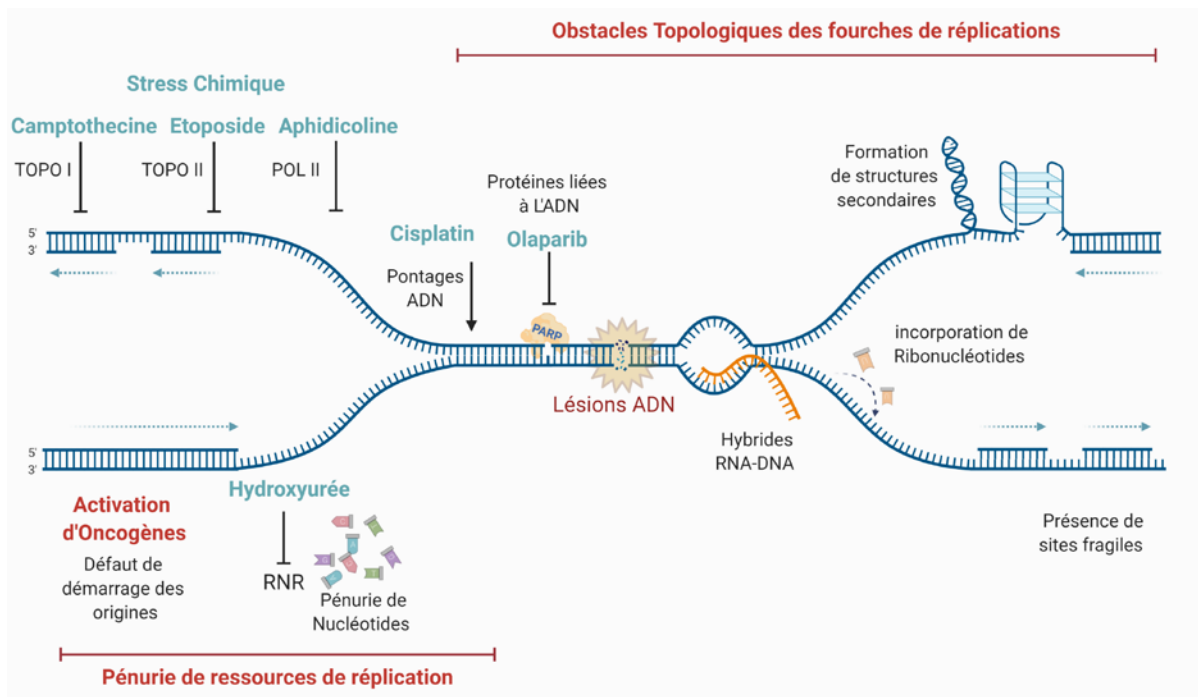


Figure 12 : Les principales sources de stress réplcatif. La progression de la fourche de réplication est constamment soumise à des épreuves. Le stress réplcatif est défini comme des ralentissements temporaires ou des arrêts des fourches de réplication, générés par divers obstacles. Parmi eux se trouvent des obstacles topologiques tel que des G-quadruplexe, des pénuries de ressources nécessaires à la réplication, l'activation d'oncogènes, des hybrides ARN : ADN, des ICL, etc. De plus, certains agents chimiques (en bleu clair) peuvent produire un stress réplcatif en inhibant des enzymes essentielles à la réparation/réplication ou en générant des lésions. Adapté de Willaume et al, 2021.

2.2.1 Oncogènes

Des études montrent que l'activation d'oncogènes mènent à des arrêts des fourches de réplication, contribuant ainsi à l'instabilité génétique et la tumorigénese (Halazonetis et al., 2008). L'activation d'oncogènes peut induire des dérégulations massives du cycle cellulaire en terme de « timing » de réplication ou de transcription. Par exemple, il a été montré que l'activation des oncogènes MYC et cycline E peut mener à une réduction de la durée de la phase G1, induisant une activation précoce d'origines de réplication. Aussi, l'activation de RASV12 induit une activation accrue des origines de réplication, une déplétion du pool de nucléotides ainsi que des conflits transcription-réplication. La dérégulation de ces origines de réplication, normalement réprimées en G1, peut causer des collisions transcription-réplication et induire une déplétion du pool de nucléotides (Macheret and Halazonetis, 2018; Primo and Teixeira, 2020).

2.2.2 Facteurs limitants

La réplication est un processus complexe nécessitant de nombreux facteurs. Des diminutions de ces facteurs entraînent un ralentissement de la progression des fourches de réplication et

un stress répliatif. Parmi ces facteurs se trouvent les composants de la machinerie de répliation, les histones, les chaperonnes d'histones qui enveloppent l'ADN néosynthétisé (Aguilera and García-Muse, 2013), et les pool de nucléotides (Anglana et al., 2003; Bester et al., 2011). L'excès d'activation des origines de répliation pouvant entraîner une déplétion de ces facteurs nécessaires à la répliation, certaines sont maintenues dormantes par les kinases contrôlant le cycle cellulaire. Parmi les composants pouvant être limitants en cas d'excès d'activation des origines se trouvent les dNTP eux-mêmes. Un défaut du pool de nucléotides est une source majeure de stress répliatif, caractérisé par la formation de longues portions d'ADN simple brin. La déplétion du pool de nucléotide peut également être induite via des composés chimiques comme l'hydroxyurée (Beck et al., 2012; Bester et al., 2011). Par ailleurs, un excès d'activation des origines de répliation peut entraîner une carence de la protéine RPA. Celle-ci protégeant les portions d'ADN simple brin, les fourches, alors non protégées, seront sensibles à des dégradations par des nucléases. Des CDB ou de larges portions d'ADNs_b pourront être formées, amplifiant alors le phénomène (Toledo et al., 2017, 2013).

2.2.3 Lésions préexistantes

Les lésions de l'ADN non réparées provenant de sources endogènes ou exogènes sont une source importante de stress répliatif. De nombreux agents génotoxiques exogènes chimiques (Inhibiteurs de topoisomérase, agent alkylant de l'ADN...) ou radiations (radiation ionisantes, UV...) peuvent mener à la formation de lésions. Si celles-ci ne sont pas réparées, elles pourront conduire à un stress répliatif (Ciccia and Elledge, 2010). Aussi, les pontages inter-brin d'ADN ou protéine-ADN peuvent mener à un blocage de la fourche de répliation (Wallace, 2002). Ces ICL sont notamment réparés par les mécanismes de la voie FA (pour Fanconi Anemia) et peuvent durant le processus, mener à la formation de CDB. Par ailleurs, bien que la répliation de l'ADN soit un mécanisme extrêmement précis permettant l'élongation de la molécule par l'ajout de dNTP, il n'en n'est pas moins possible que les polymérases ajoutent des ribonucléotides (rNTP) à la place. Ces rNTP sont incorporés par erreur lorsque la répliation va très vite. S'ils ne sont pas éliminés, ils conduiront à des blocages de fourche de répliation au prochain cycle (Clausen et al., 2013). Ces rNTP sont dégradés par des enzymes telles que la RNaseH2 dont un défaut conduit à un stress répliatif (Cerritelli and Crouch, 2016; Zeman and Cimprich, 2014). Finalement, des portions d'ADN simple brin peuvent être la cause ou la conséquence d'un stress répliatif. En effet, ces portions d'ADN simple brin sont des

intermédiaires de certains mécanismes de réparation permettant le redémarrage des fourches. La rencontre de portions d'ADN simple brin avec la machinerie de réplication peut mener à la formation de CDB. De plus, si elles ne sont pas protégées, des endonucléases de différents mécanismes de réparation peuvent les convertir en CDB (Zeman and Cimprich, 2014).

2.2.4 Stress répliatif radio-induit

Les radiations ionisantes induisent une grande variété de dommages comme des modifications de bases dues aux ROS, ICL, cassures simple et double brins ainsi que des « cluster » de dommages qui sont particulièrement difficiles à réparer (Wallace, 2002). Il a été aussi montré que les radiations ionisantes, en présence d'O₂, peuvent convertir le radical hydroxyle ou l'anion superoxyde et générer des ROS (Birben et al., 2012). Il a d'ailleurs été proposé que les ROS et les cassures simple brin générées par les radiations soient ensuite converties en phase S en cassures double brin. En effet, une dose de H₂O₂ produisant une même quantité de dommages simple brin qu'une irradiation 10Gy, n'induit que peu de cassures double brin en G1, mesurées par des foci Rad51 ou γH2AX, contrairement à des cellules en phase S (Harper et al., 2010).

2.2.5 Stress Oxydant et BER

Les ROS sont une source de dommage à l'ADN pouvant conduire à la formation de sites abasiques, de pontages inter brin (ICL) et de bases oxydées. Lors de la réplication, des portions d'ADN simple brin sont formées afin de servir de modèle lors de la synthèse d'ADN. Ces parties simple brin sont particulièrement sensibles à l'oxydation par les ROS. Les clusters de dommages oxydatifs empêchent la bonne progression des fourches de réplication et causent un stress répliatif, cependant, la plupart des bases oxydées ne bloquent pas la réplication (Wallace, 2002). Des études ont montré qu'un traitement générant un stress oxydant au peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) induit un stress répliatif. En effet, il a été observé des ralentissements, et des blocages des fourches de réplication (Wilhelm et al., 2016a). Il a aussi été montré qu'un stress oxydant peut mener à la réversion des fourches de réplication, un mécanisme permettant la protection et le redémarrage des fourches (Zellweger et al., 2015a).

Il existe un système de contrôle de la vitesse de réplication via la détection des ROS par PRDX2 en cas de dérégulation de la balance en dNTPs. En effet, une perturbation de la ribonucléotide

réductase (RNR) responsable de la production des dNTP mène à une production de ROS. Par exemple, la déstabilisation de la RNR par un traitement HU modifie la balance redox menant à la génération de d'anions superoxydes et de radicaux hydroxyles. Ces derniers sont détectés par PRDX2 alors associée au réplisome et à l'accélérateur de fourche TIMELESS. En cas de niveaux de ROS trop élevés, PRDX2 sera dissociée, induisant le détachement de TIMELESS du réplisome, ralentissant ainsi la réplication (Somyajit et al., 2017).

Le stress oxydant peut mener à la formation de bases oxydées comme les 8oxoG ou les TG. Ces modifications peuvent avoir lieu directement sur la molécule d'ADN, ou au niveau du pool de nucléotides. Ce dernier est nettoyé, par exemple la 8-oxo-2'-deoxyguanosine triphosphatase MTH1 permet d'éliminer les purines oxydées de la réserve de nucléotides afin d'éviter leur incorporation lors de la réplication (Russo et al., 2004).

Si certaines bases oxydées sont des lésions bloquantes pour la réplication générant un stress répliatif comme les TG, d'autres ne gênent pas la progression de la réplication comme les 8oxoG (Aller et al., 2007). Les dommages oxydatifs sont comme nous l'avons vu, principalement réparés par le BER. Si le « short-patch » est la voie du BER préférentielle de manière générale, le « long-patch » est prédominant pour la réparation au cours de la phase S (Krokan and Bjoras, 2013). Par ailleurs, les ADN glycosylases impliquées dans la réparation sont différentes selon le type de base oxydées, ainsi que selon l'état de la séquence à réparer (Odell et al., 2013; Rangaswamy et al., 2017a).

En effet, les ADN glycosylases seront différentes si le dommage est sur une région en cours de réplication, activement transcrites ou inactive. Par exemple, il a été montré que NEIL2 est en association avec l'ARN polymérase II et est préférentiellement choisie lors de la réparations de régions transcrites (Banerjee et al., 2011). Parmi les ADN glycosylases, la famille des NEIL est active sur des séquences simple brin formées lors de la réplication et la transcription, tandis que NTH1 et OGG1 sont actives sur des séquences double brin (Dou et al., 2003). Il a été montré que MYH, UNG2, MPG, NTH1, NEIL1, 2 et 3 sont retrouvées au niveau de l'ADN naissant en IPOND et permettent la reconnaissance des bases oxydées et leur réparation de manière post répliatif (Bjørås et al., 2017a). Aussi, l'expression de NEIL1 (Hazra et al., 2002), de NEIL3 (Neurauter et al., 2012a) et de NTH1 (Luna et al., 2000), est augmentée en phase S.

Il a aussi été montré que certaines ADN glycosylases, notamment NEIL1 qui est activée durant la phase S, pouvaient agir de manière pré-réplivative. En effet, une étude propose que NEIL1 agisse comme un « pare-buffle » de la réplication (« Cow catcher » en anglais) (Hegde et al., 2013a). En effet, grâce à sa capacité à se fixer à l'ADNsb, NEIL1 se situe en amont du complexe de réplication et détecte les dommages sur la partie simple brin de l'ADN, alors plus vulnérable aux ROS. Suite à la détection d'un dommage, NEIL1 le signale et la réplication ne peut plus continuer. Néanmoins, NEIL1 ne peut pas cliver la base endommagée à cause de la présence de RPA sur l'ADNsb, sinon le clivage par NEIL1 provoquerait des CDB. Il a été proposé que le blocage induit par NEIL1 favorise la réversion des fourches de réplication, ramenant ainsi la lésion à l'état d'ADNdb, permettant ainsi à NEIL1 de réparer le dommage. Etant donné que NTH1 et OGG1 n'agissent pas sur des structures simple brin, il est proposé qu'elles ne participeraient pas à ce mécanisme, mais plutôt à une réparation post-réplivative (Hegde et al., 2013a).

De plus, il a été montré que NEIL1 peut s'associer à WRN (Das et al., 2007). Il a été proposé une potentielle coordination entre NEIL1 et WRN pour favoriser la réversion. Il a aussi été montré dans cette étude que, en cas d'absence de NEIL1, NEIL2, bien que son expression ne soit pas augmentée au cours de la phase S, pouvait servir de remplacement NEIL1 dans le processus pré-réplificatif (Hegde et al., 2013a). L'expression de NEIL3 a aussi été montrée comme étant dépendante de la phase S (Neurauter et al., 2012a). Il a d'ailleurs été montré *in vitro* la capacité de NEIL3 à cliver des bases sur des séquences simple brin au niveau des fourches de réplication, tandis que NEIL1 agirait de manière préférentielle sur des séquences double brin (Albelazi et al., 2019a).

Par ailleurs, il a été montré que la surexpression de la glycosylase NTH1 induisait une instabilité génétique causée par un stress réplificatif et cela, indépendamment de son activité catalytique. Cela pourrait suggérer que la seule présence d'ADN glycosylases au niveau des fourches de réplication, puisse mener à des blocages voire des réversions de fourches. De plus, la surexpression de NTH1 diminuerait l'efficacité de la RH, potentiellement en perturbant le recrutement de XPG et de RAD51 (Limpose et al., 2018a).

Enfin, il a été montré que les ROS pouvaient induire la formation de R-Loops, une structure nucléique à trois branches contenant des hybrides ADN:ARN, dont la rencontre avec la réplication génère un stress réplificatif (Tan et al., 2020; Teng et al., 2018).

2.2.6 Obstacles à la progression des fourches de réplication

La progression des fourches de réplication peut être entravée par différents obstacles naturels comme des complexes protéiques fortement liés à l'ADN. De nombreuses séquences du génome humain sont des séquences répétées qui peuvent être difficiles à répliquer. Parmi elles se trouvent les micro- et mini-satellites, séquences palindromiques, répétitions de tri-nucléotides (Zeman and Cimprich, 2014). Ces répétitions peuvent mener à la formation de structures de l'ADN différentes de la forme B canonique (épingle à cheveux, triplet d'ADN, G-quadruplexes...). Ces structures peuvent entraver la progression de la fourche de réplication voire mener à des dissociations du réplisome (Madireddy and Gerhardt, 2017).

2.2.7 Interférence entre transcription et réplication

La réplication de l'ADN et la transcription (Figure 13) sont des mécanismes fondamentaux utilisant le même substrat et pouvant potentiellement interférer entre eux. Comme mentionné précédemment, les fourches de réplication issues d'origines activées par des oncogènes peuvent mener à des conflits transcription-réplication (T-R) (Macheret and Halazonetis, 2018).

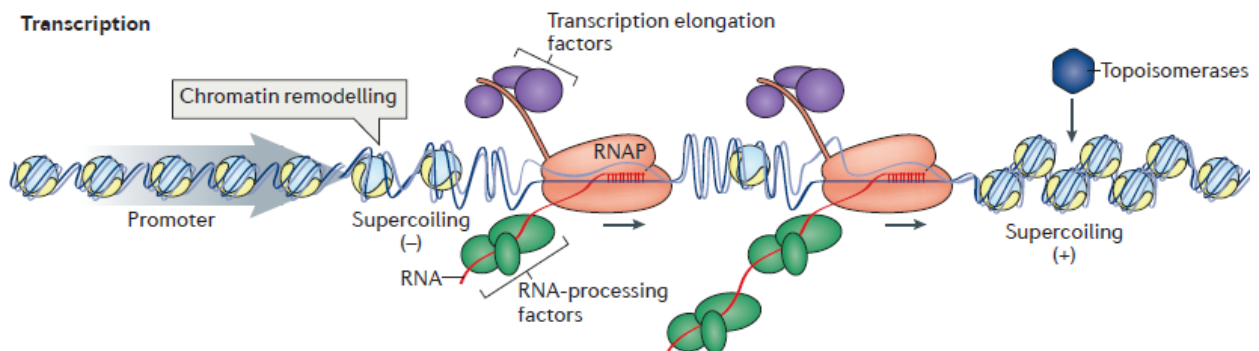


Figure 13 : La transcription. Une petite portion de la double hélice d'ADN est déroulée par l'ARN polymérase (RNAP) afin de permettre la transcription (aussi connue sous le nom de bulle de transcription.). Le déroulement de l'ADN par la RNAP génère des super-enroulements négatifs (à l'inverse de la réplication), qui sont soulagés par des topoisomérases. Adapté de Garcia-Muse et Aguilera, 2016.

Les conflits T-R peuvent avoir lieu dans deux orientations : co-directionnelles quand les synthèses d'ADN et d'ARN progressent dans le même sens ; frontales (head-on), quand les deux machineries convergent. Dans les deux cas, la fourche de réplication ne peut plus progresser, mais des données suggèrent que les collisions frontales sont plus graves que les co-directionnelles, pouvant mener à une augmentation des niveaux de R-Loops (Hamperl et al., 2017; Lang et al., 2017) (Figure 14). Cela est par exemple le cas au niveau des gènes

particulièrement longs ou fortement transcrits en phase S, menant à la formation/stabilisation des R-Loops. Ces structures à trois branches composées d'hybride ADN-ARN et d'un brin ADN, sont formées par la réhybridation des transcrits d'ARN naissants avec leur matrice d'ADN (García-Muse and Aguilera, 2016; Kemiha et al., 2021; Lin and Pasero, 2012).

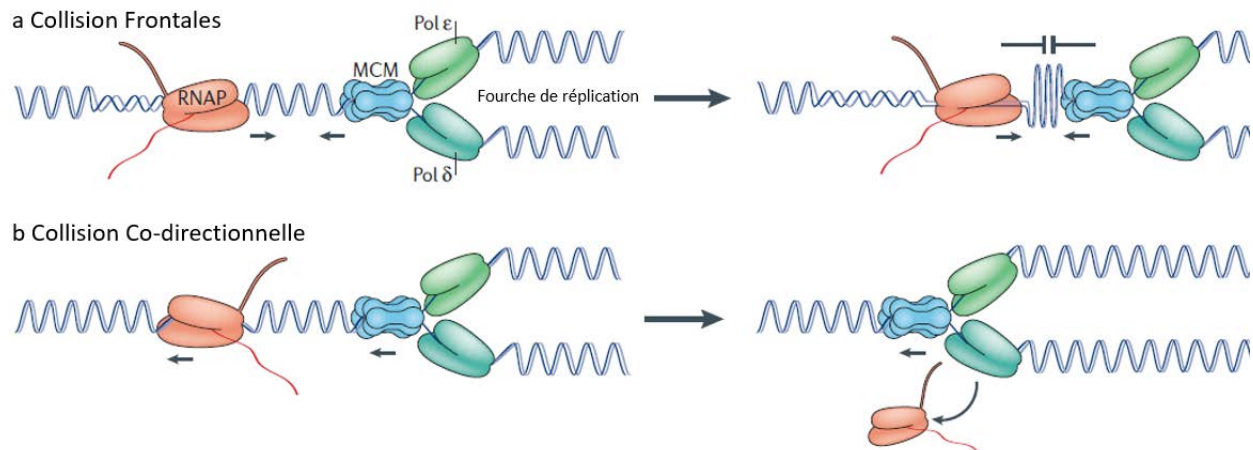


Figure 14 : Collisions frontales et co-directionnelles entre transcription et réplication. (a) La progression de l'ARN polymérase (RNAP) en direction opposée à la fourche de réplication mène à des collisions frontales. Celles-ci causent des blocages de fourches pouvant mener à la formation de cassures de l'ADN. (b) Si la progression de la transcription et celle de la réplication ont lieu dans le même sens, des collisions co-directionnelles peuvent avoir lieu lorsque la fourche de réplication avance plus vite que l'ARN polymérase. Les collisions co-directionnelles peuvent être résolues en retirant la RNAP de l'ADN. MCM : minichromosome maintenance complex, Pol δ : ADN polymérase δ, Pole : ADN polymérase ε. Adapté de Garcia-Muse et Aguilera, 2016.

Etant donné que les processus de transcription et de réplication affectent significativement la topologie, la structure et l'organisation de l'ADN, la rencontre physique des deux machineries n'est pas forcément nécessaire pour induire des conflits T-R (Gómez-González and Aguilera, 2019). En effet, durant la réplication, le déroulement de l'ADN parental génère une accumulation de stress topologique sous la forme de super-enroulements positifs de l'ADN devant la fourche de réplication et négatifs derrière. Ce stress topologique empêche la progression de la fourche et est couramment éliminé par des ADN topoisomérases. De son côté, la transcription génère aussi des super-enroulements positifs et négatifs, eux aussi pris en charge par des topoisomérases (Figure 13). Néanmoins, la convergence des ARN et ADN polymérases sur le même brin matrice engendre aussi des super-enroulements positif (Gómez-González and Aguilera, 2019). Si ce stress topologique n'est pas résolu, notamment en cas de perte de la topoisomérase 1 (TOP1), cela impactera la progression de la réplication et de la transcription, générant des conflits T-R (Figure 15). Ainsi les cellules déplétées de TOP1 montrent une accumulation de fourches bloquées, corrélée avec une augmentation de foyers

γ H2AX en phase S. En cas de traitement à la cordycépine, un inhibiteur de transcription, ces phénotypes sont éliminés (Tuduri et al., 2009). De plus, la non-résolution des super-enroulements peut mener à la formation de structures non B de l'ADN (Pannunzio and Lieber, 2016).

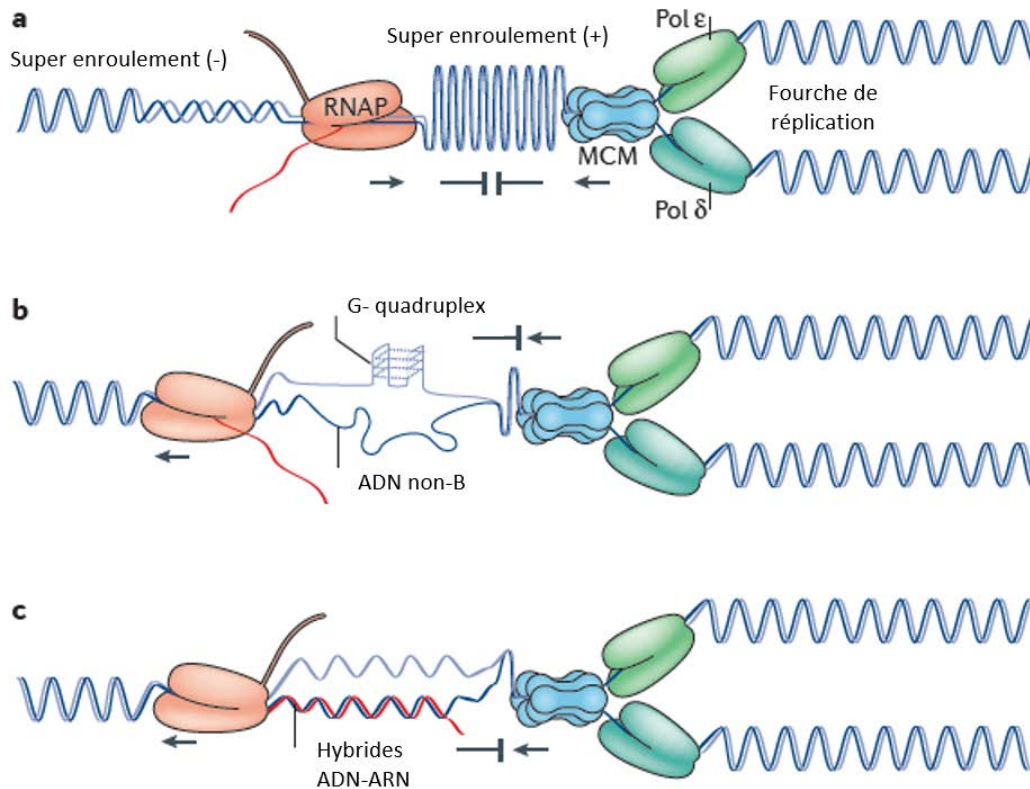


Figure 15 : Condition pouvant affecter la fréquence des collisions réplication-transcription : (a) La convergence frontale entre l'ARN polymérase et la fourche de réplication mène à l'accumulation de super-enroulement positif entre les 2 machineries, conduisant à des blocages de fourches. (b) Le déroulement partiel du super-enroulement négatif de l'ADN généré derrière l'ARN polymérase peut permettre la formation de structure non-B de l'ADN comme les G-quadruplexe, constituant un obstacle pour la réplication. (c) Les hybrides ARN : ADN générés par la transcription bloquent aussi la fourche de réplication. Adapté de Garcia-Muse, 2016.

C'est par exemple le cas des G-quadruplexes, qui sont des structures à quatre hélices formées au niveau des séquences riches en CG. Ils seraient potentiellement importants pour l'initiation de la réplication (Besnard et al., 2012), mais la rencontre de ces structures avec le réplisome peut conduire à des arrêts de fourche (Valton and Prioleau, 2016) (Figure 15). Ils peuvent être produits au niveau du brin retardé lors de la réplication des télomères (Audry et al., 2015). Ils sont aussi issus des super-enroulements négatifs produits durant la transcription (Gómez-González and Aguilera, 2019). Une autre structure générée par les conflits T-R sont les hybrides ADN : ARN, aussi connus sous le nom de R-Loops. Les R-Loops sont préférentiellement produites au niveau de séquences riches en CG (Ginno et al., 2012) et ont

des rôles physiologiques comme la régulation de l'expression de gènes ou la commutation isotopique (Santos-Pereira and Aguilera, 2015). La présence d'hybrides ADN : ARN, tant qu'elle reste transitoire, contribue aussi aux mécanismes de réparation des CDB, en pouvant servir de séquences homologues (Brambati et al., 2020). Néanmoins, les R-Loops ont été associées avec l'instabilité au niveau des sites fragiles communs (CFS) (Helmrich et al., 2011) et interfèrent avec la réplication de l'ADN entraînant ainsi un stress réplicatif (Gan et al., 2011; Tuduri et al., 2009). Les R-Loops sont abondantes et leurs quantités et positions sont régulées par des mécanismes gérant leur formation ou stabilisation. Leur élimination peut se faire par dégradation de la partie ARN via les RNase H1 et H2, ou par résolution grâce à des hélicases. Des dysfonctionnements de ces mécanismes entraînent une accumulation de R-Loops et un stress réplicatif (Figure 15) (Wood et al., 2020).

2.3 Gestion du stress réplicatif

2.3.1 Signalisation par la voie ATR

L'accumulation d'ADN simple brin au niveau des fourches de réplication est source de stress réplicatif mais aussi l'une des conséquences les plus précoces. En effet, lors d'un stress réplicatif, les hélicases réplicatives continuent de dérouler l'ADN parental alors que les polymérases se sont arrêtées, menant ainsi à la formation de portions d'ADNsb. Il peut aussi y avoir formation de portions d'ADNsb après découplage entre le brin continu et discontinu, ou en cas de résection. La formation de portions d'ADNsb est la première étape pour activer les mécanismes de réponse au stress réplicatif médiés par la voie ATM et surtout ATR (Berti and Vindigni, 2016a).

Au niveau des fourches, l'ADNsb généré est recouvert par la protéine RPA. Cette protéine protège l'ADNsb de sa dégradation par des nucléases préservant ainsi l'intégrité de la fourche de réplication. Néanmoins, la présence persistante d'ADNsb recouvert par RPA au niveau des fourches déclenche l'activation de la voie ATR. ATR entraîne notamment la phosphorylation de RPA sur la sérine 33 (Liu et al., 2012) et de la kinase de contrôle du cycle cellulaire, CHK1 sur la sérine 345 en réponse au stress réplicatif (Liu et al., 2000). Ces phosphorylations sont souvent utilisées comme marqueurs du stress réplicatif. RPA liée à l'ADNsb agit alors comme plateforme de signalisation et de recrutement pour les effecteurs de la voie ATR dont ATRIP (ATR interacting protein) qui assure le recrutement efficace d'ATR (Liu et al., 2012).

L'activation de CHK1 permet l'inhibition de la progression du cycle cellulaire par l'inactivation de la phosphatase CDC25, donnant ainsi plus de temps aux mécanismes de gestion des fourches bloquées (Boutros et al., 2006; Karlsson-Rosenthal and Millar, 2006). L'activation du checkpoint de réplication permet d'assurer la stabilisation des fourches ainsi que leur redémarrage.

En cas de blocage prolongé des fourches de réplication, il peut y avoir formation de cassures double brin de l'ADN (Petermann et al., 2010) qui seront alors prises en charge par la voie ATM qui sera activée. Les cassures double brin et la dissociation de la machinerie de réplication peuvent mener à l'effondrement des fourches de réplication, c'est à dire que la fourche devient incapable de redémarrer la réplication. Cela entraîne un risque accru de réplication incomplète, et d'instabilité génétique générale (Cortez, 2015).

La voie ATR-CHK1 joue un rôle majeur dans la prévention de l'effondrement des fourches. En effet, ATR-CHK1 permet de gérer de manière globale l'activation des origines de réplication par la régulation du complexe cycline A/CDK1. En condition normale, cela permet d'éviter un excès d'activation des fourches de réplication qui pourrait entraîner une déplétion du pool de dNTP (Berti and Vindigni, 2016a; Nam and Cortez, 2011), de RPA (Toledo et al., 2013) ou d'autres facteurs limitant de la réplication qui, comme nous avons pu le voir, mène à un stress répliatif. De la même manière, ATR permet le recrutement de FANCD2 et son association avec le complexe MCM, ce qui entraîne un ralentissement de la réplication. Cela évite la formation de longues portions d'ADNsb et l'épuisement de RPA (Lossaint et al., 2013).

2.3.2 Mécanismes de redémarrage des fourches de réplication.

La reprise de la progression des fourches de réplication repose sur la capacité des cellules à réactiver, redémarrer ou réparer les fourches bloquées (figure 16).

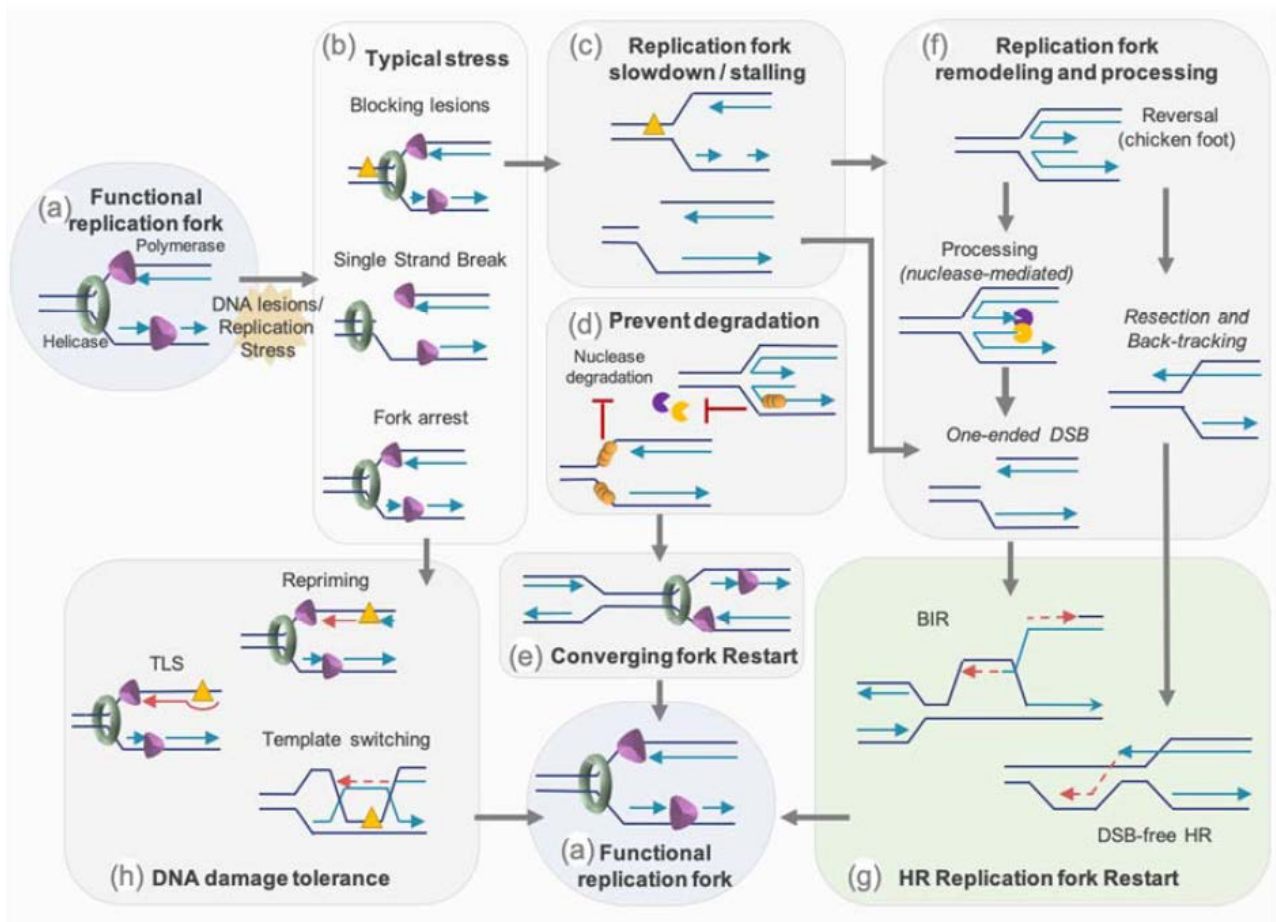


Figure 16 : Mécanismes de redémarrage des fourches de réplication : Durant sa progression (a), une fourche de réplication peut rencontrer des obstacles (Lésions bloquantes, CSB, etc.) (b), ce qui génère un stress réplcatif. Cela déclenche un ralentissement de la fourche et dans le pire des cas, son blocage voire découplage (c). La protection de la fourche d'une dégradation nucléotidique (d) peut permettre à la réplication de se poursuivre et fusionner avec une fourche convergente (e). Une persistance de blocage d'une fourche nécessite son remodelage afin de permettre son redémarrage (f). Une étape clef de ce processus est la réversion de la fourche en une structure à 4 branches appelée « chicken foot », protégeant ainsi la fourche d'une résection excessive (d). Ce mécanisme permet aussi de médier le redémarrage avec CDB ou non. Une résection contrôlée de l'ADN naissant sur une fourche reversée ou bloquée, ainsi que son retour en arrière, permet la formation d'extrémités 3', son recouvrement par RAD51, médie la formation de la D-Loop et la recherche de séquence homologue afin de permettre un redémarrage sans CDB (g). Des CDB à extrémités uniques peuvent avoir lieu en cas de rencontre de CSB avec la machinerie de réplication, ou en cas de clivage de la fourche (f, g). Ces CDB sont alors prises en charge par le BIR (g). D'autres mécanismes permettent de déclencher la voie de tolérance des dommages (h). Le TLS utilise des polymérases spécifiques permettant d'ignorer les lésions. Le changement de modèle permet l'hybridation de l'ADN naissant à une séquence nouvellement synthétisée. Enfin, le réamorçage consiste en la réinitiation de la réplication en aval de la lésion. Le redémarrage des fourches est représenté par des flèches rouges. Issu de Willaume et al, 2021.

2.3.2.1 Protection des fourches de réplication bloquées

Les blocages de la fourche de réplication et leurs processus de redémarrage génèrent des portions d'ADN simple brin ainsi que des structures pouvant être sujettes à des clivages et résections non contrôlés. Des dégradations nucléotidiques trop importantes peuvent mener à la formation de CDB ou à l'effondrement des fourches. Néanmoins certaines protéines de la

réparation protègent les fourches bloquées, le temps que celles-ci soient prises en charge et redémarrées (figure 16 d).

La première étape de protection des portions d'ADNsb formé est, comme précisé précédemment, la fixation de RPA, qui permettra en plus le recrutement d'autres facteurs de la prise en charge du stress répliatif. Certains facteurs de la RH jouent aussi un rôle important de protection des fourches bloquées. En effet, le chargement de RAD51 sur l'ADNsb et sa capacité à former un filament empêchent la dégradation de l'ADN naissant par MRE11. Par conséquent, des défauts de protéines nécessaires au recrutement de RAD51 ou à son bon fonctionnement induisent des dégradations de l'ADN naissant au niveau des fourches bloquées (Rickman and Smogorzewska, 2019).

Ainsi la déficience de BRCA2 mène à des dégradations des fourches par MRE11 en cas de traitement HU comme par exemple en cas de mutation S3291A de BRCA2 qui entrave la fixation de RAD51 (Schlacher et al., 2011). De plus, l'interaction de BRCA2 avec PALB2 serait nécessaire au recrutement de BRCA2 au niveau des fourches (Hartford et al., 2016). Il a aussi été proposé que la dégradation des fourches reversées en cas de déficience de BRCA2 soit initiée par MRE11/CtIP, puis poursuivie de manière plus extensive par EXO1 (Lemaçon et al., 2017). De la même manière, BRCA1 et son partenaire BARD1 sont nécessaires à protéger les fourches de leur dégradation par MRE11 en cas de traitement HU (Billing et al., 2018), en améliorant la stabilité du filament de RAD51 (Daza-Martin et al., 2019).

Ainsi la perte de RAD51 au niveau des fourches de réplication mène à des dégradations des fourches et des défauts de redémarrage (Petermann et al., 2010). Aussi, l'effet protecteur de RAD51 au niveau des fourches de réplication peut-être dû à sa participation dans les mécanismes de réversion de la fourche de réplication (Rickman and Smogorzewska, 2019).

2.3.2.2 Mécanismes de réversion des fourches de réplication

Le mécanisme de réversion de fourche (aussi appelé régression) permet de protéger les fourches de réplication bloquées et est potentiellement un intermédiaire pour le redémarrage des fourches. Ce mécanisme permet la conversion d'une fourche de réplication (à trois branches) en une structure à quatre branches. La conversion se fait par l'hybridation coordonnée des deux brins néosynthétisés et la réhybridation des deux brin parentaux,

résultant en une structure proche d'une jonction de Holliday surnommée « Chicken Foot » (Figure 16) (Neelsen and Lopes, 2015).

Longtemps considéré comme pathologique, il s'est avéré que la réversion de fourche est un mécanisme fréquent et contrôlé en réponse à de nombreux stress génotoxiques. Plusieurs modèles suggèrent que la réversion de fourche est une étape critique dans la réparation ou le redémarrage des fourches de réplication bloquées. En effet, elles se forment rapidement une heure après des stress génotoxiques variés tels que des traitements : inhibant la polymérisation comme le HU et l'aphidicoline (inhibiteur de polymérase); des agents pouvant mener à des pontages ADN inter-brin comme la Mitomycine C et le Cisplatine; des traitement UV ou encore après stress oxydatif suite à un traitement H₂O₂ par exemple (Zellweger et al., 2015a). De la même manière, des inhibiteurs de topoisomérases (étoposide, camptothécine) induisent des réversion de fourches (Ray Chaudhuri et al., 2012; Zellweger et al., 2015b). Par ailleurs, l'activation d'oncogènes (Neelsen et al., 2013) ou des obstacles pouvant bloquer les fourches comme des séquences répétées peuvent aussi induire des réversions de fourches (Follonier et al., 2013).

La réversion nécessite plusieurs acteurs tels que des facteurs de la RH. RAD51 a été montrée comme jouant un rôle dans le mécanisme de réversion. Ainsi une déplétion de RAD51 induit une diminution du nombre de fourches reversées, sans qu'il y ait restauration en inhibant MRE11 (Zellweger et al., 2015a). Ce rôle est indépendant de la capacité de RAD51 à former un filament stable et serait plutôt dû à son rôle protecteur de l'ADNsb (Mijic et al., 2017a; Taglialatela et al., 2017). BRCA1 et BRCA2 jouent aussi un rôle protecteur des fourches reversées. En effet, la déplétion de BRCA1 et BRCA2 induit une diminution du nombre de fourches reversées. L'impact de la déficience en BRCA1 et BRCA2 sur le nombre de fourches reversées est restauré par l'inhibition de MRE11 ou d'EXO1 (Mijic et al., 2017a). Il a donc été proposé que la diminution du nombre de fourches reversées soit due à leur dégradation par EXO1 ou MRE11. En cas de persistance, les fourches reversées sont la cible d'attaque par MUS81 et SLX4, ce qui mène à la formation de CBD (Lemaçon et al., 2017). Aussi, des résultats chez la levure montrent que les facteurs du NHEJ, tels que KU, jouent aussi un rôle dans la protection des fourches reversées (Teixeira-Silva et al., 2017). Chez les mammifères, RIF1 protège les fourches reversées de la dégradation par DNA2 (Mukherjee et al., 2019).

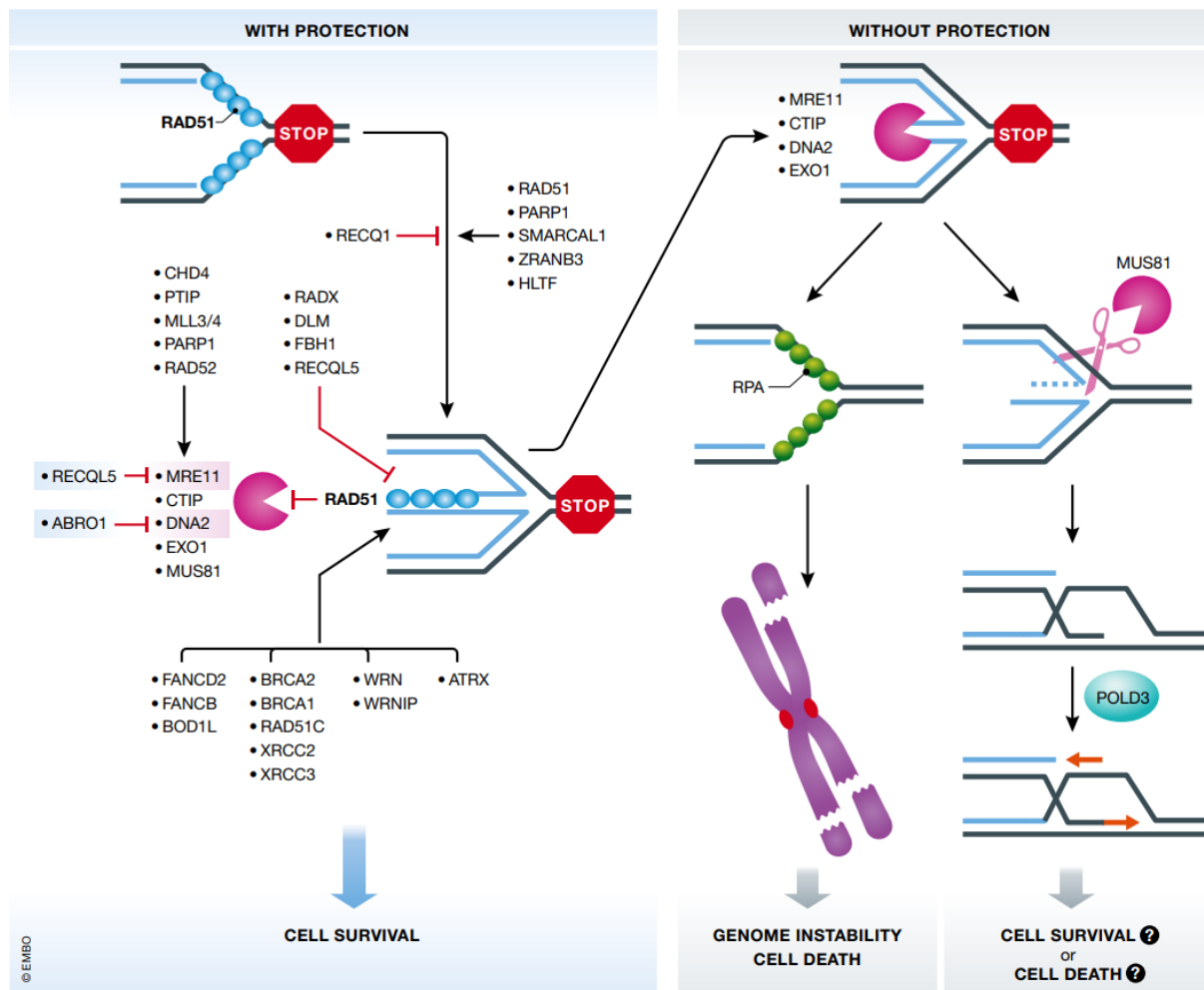


Figure 17 : Protéines participant à la réversion et dégradation des fourches reversées. La réversion des fourches bloquées est médiée par RAD51 et d'autres protéines comme les translocases comme SMARCAL1, ZRANB3 etc. PARP1 sert à maintenir la fourche en un état régressée en empêchant RECQ1 de la restaurer. Après réversion, MRE11 est recrutée de manière dépendante, entre autres, de PARP1. Les nucléases tendent à dégrader la fourche si elle n'est pas protégée par des protéines comme RAD51. Si la fourche reversée n'est pas protégée, elle sera dégradée de manière importante, ce qui peut mener à une instabilité génétique. La fourche reversée peut aussi être clivée par SLX4-MUS81, ce qui permet de redémarrer la réplication par le BIR. *issus de (Liao et al., 2018)*

Des hélicases translocases sont aussi nécessaires pour remodeler la fourche de réplication et la réverser (Figure 17). Ainsi différentes protéines de la famille des remodeleurs de la chromatine SNF2, ont été identifiées comme catalyseur de la réversion de fourche. Parmi elles, on retrouve entre autre SMARCAL1, ZRANB3, FBH1 et HLF (Rickman and Smogorzewska, 2019). Leur déplétion entraîne une diminution du nombre de fourches reversées, entraînant une instabilité génétique et une sensibilité accrue à des agents génotoxiques (Tagliatela et al., 2017; Vujanovic et al., 2017). Ces translocases possèdent des rôles non-redondants et sont recrutées par différents acteurs. Il est possible qu'elles agissent dans des contextes différents ou coopèrent entre elles afin de promouvoir la réversion de fourche. Ainsi il a été montré ZRANB3 est recrutée via PCNA (Vujanovic et al., 2017) et que

HLTF contribue à la poly-ubiquitination de ce dernier et donc à la réversion (Bai et al., 2020). SMARCAL1 se lie aux structures branchées et catalyse la régression de la fourche. Afin d'éviter une action excessive de SMARCAL1, l'activité de cette dernière est négativement régulée par ATR (Betous et al., 2012; Couch et al., 2013a).

Récemment, deux voies de réversion distinctes ont été proposées (Liu et al., 2020). Ainsi, 53BP1 limite la dégradation des fourches reversées par FBH1. Autrement, BRCA2, FANCD2 et ABRO1, protègent celles reversées par SMARCAL1, ZRANB3 et HTLF (Liu et al., 2020).

2.3.2.3 Tolérance des dommages.

Certains mécanismes permettent le contournement des dommages à la fourche et leur réparation après la réplication. Il s'agit des mécanismes de tolérance des dommages ou DDT (pour DNA Damage Tolerance). Selon le type de dommage, 3 principaux mécanismes de DDT permettent le passage au travers de la lésion : la synthèse d'ADN translésionnelle (TLS pour translesion DNA synthesis), le « changement de matrice » (template swiching) ou le réamorçage de la synthèse de l'ADN (repriming) (Figure 16) (Quinet et al., 2021).

Le changement de matrice consiste au réalignement du brin d'ADN naissant à une autre position de l'ADN néosynthétisé afin de l'utiliser comme modèle (Marians, 2018). Le mécanisme du TLS fait appel à des polymérases spécialisées (POL η , REV1, POL κ , POL ι , POL ν , REV3L-REV7, et POL θ) capable de répliquer la séquence endommagée. Néanmoins ces polymérases ont une faible fidélité de réplication (Sale et al., 2013).

De manière alternative, la machinerie de réplication peut contourner la lésion en réamorçant la synthèse d'ADN en aval du dommage.

Ainsi, PrimPol (primase/polymérase) permet le réamorçage des fourches bloquées et le redémarrage de la synthèse d'ADN. Cela mène à la génération de portions d'ADNs qui seront prises en charge après la réplication avec la participation de polymérases du TLS (Quinet et al., 2021). Récemment, il a été mis en évidence l'existence d'une balance entre le mécanisme de réversion des fourches et le réamorçage (Quinet et al., 2020).

2.3.2.4 Nucléases et hélicases médiant le redémarrage des fourches via la RH

Les nucléases jouent un rôle essentiel dans la prise en charge des structures intermédiaires de la réplication et permettent le redémarrage des fourches (Figure 16 f). En effet, si des résections et clivages incontrôlés sont sources d'instabilité génétiques, ils n'en restent pas moins essentiels au bon redémarrage des fourches.

C'est par exemple le cas de MRE11, une nucléase ayant un rôle clef dans les premières étapes de la réparation des CDB en créant un point d'entrée pour une résection plus intensive par la suite (Nicolette et al., 2010). Après stress répliatif, MRE11 pourrait aussi jouer un rôle dans le redémarrage des fourches et éviter la formation de CDB (Costanzo et al., 2001). En effet, il a été suggéré que MRE11 permette l'agrandissement des portions d'ADNsb, favorisant ainsi la fixation de RAD51 et la réparation (Costanzo, 2011). Par ailleurs, le recrutement de RAD51 permet d'éviter des résections incontrôlées par MRE11 qui mène à la formation de larges portions d'ADNsb, source d'instabilité (Hashimoto et al., 2010). En plus de MRE11, FAN1 et CtIP, sous le contrôle de FANCD2, sont aussi impliquées dans la prise en charge des fourches bloquées. En cas de traitement avec l'aphidicoline, FAN1 coopère avec l'hélicase BLM afin de favoriser le redémarrage des fourches. Néanmoins en absence de FANCD2, il y a un excès de clivage par FAN1 (Chaudhury et al., 2014). Aussi après traitement à l'aphidicoline, CtIP favorise le redémarrage des fourche d'une manière dépendante de FANCD2 (Yeo et al., 2014).

Par ailleurs, FEN1, stimulée par WRN, a été proposée comme participant au redémarrage des fourches en favorisant l'élimination de structures secondaires bloquant la réplication, notamment au niveau des télomères (Dehé and Gaillard, 2017; Saharia et al., 2010; Zheng et al., 2005). Sa déplétion mène à un stress répliatif et une fragilité télomérique (Saharia et al., 2010). Finalement, FEN1 a été proposée comme collaborant avec MUS81 afin d'éliminer des structures secondaires lors du stress répliatif. En effet, ces deux protéines co-localisent en cas de dommages et MUS81 améliore l'activité de FEN1 (Shin et al., 2012).

En cas de persistance de blocage ou d'échec du redémarrage des fourches de réplication, celles-ci peuvent devenir un substrat préférentiel pour des endonucléases spécifiques de structures (SSE pour structure specific endonucleases). Ces SSE permettent le clivage de structures secondaires pouvant être produites durant la réplication ou la réparation. Elles reconnaissent des structures spécifiques comme les fourches de réplication bloquées ou reversées (Dehé and Gaillard, 2017). Parmi ces SSE, le complexe SLX4-MUS81-SLX1 catalyse le

clivage des fourches de réplication et la génération de CDB à extrémité simple. En effet, SLX4 est associée à la formation de CDB au niveau de fourches bloquées de manière prolongée (Guervilly et al., 2015). Par exemple, la formation de foyers γ H2AX après traitement aphidicoline dans des cellules déficientes pour ATR est dépendante de SLX4 (Ragland et al., 2013).

De nombreuses études montrent que MUS81 possède un rôle clef dans le redémarrage des fourches en les convertissant en CDB (Fu et al., 2015; Hanada et al., 2007a; Regairaz et al., 2011; Shimura et al., 2008; S. C. West et al., 2015; Ying et al., 2013). En effet, MUS81 permet d'éviter l'arrêt des fourches de réplication et son absence ralentit la synthèse d'ADN. De plus, MUS81 améliore la survie cellulaire après traitement aphidicoline à faible dose et, en son absence, la viabilité cellulaire repose sur XPF (Fu et al., 2015). La prise en charge des fourches bloquées par SLX4 et ses partenaires permet aussi d'éviter des clivages pathologiques par GEN1, source d'instabilité génétique. En effet, SLX4 collabore avec MUS81 afin d'introduire des CDB transitoires et de redémarrer rapidement la réplication, tout en empêchant GEN1 de cliver les fourches de réplication (Malacaria et al., 2017). D'autre part, les clivages des fourches de réplication par SLX4-MUS81 peuvent avoir des effets négatifs sur la survie cellulaire (Guervilly et al., 2015). En effet, contrairement à un traitement aphidicoline à faible dose, un traitement HU prolongé, MUS81 permet la formation de CDB, en association avec l'hélicase FBH1, au détriment de la survie cellulaire (Fugger et al., 2013).

En parallèle, des hélicases de la famille RECQ peuvent résoudre des structures secondaires comme les fourches de réplication bloquées. Elles peuvent coopérer avec des nucléases afin de promouvoir leur redémarrage. C'est par exemple le cas de WRN et FEN1 (Zheng et al., 2005). Aussi, des observations montrent que BLM est localisée au niveau des fourches et contribuerait avec MUS81 à leur conversion en CDB de manière transitoire, afin de promouvoir leur réparation et redémarrage (Shimura et al., 2008). Après blocage prolongé, WRN et DNA2 sont importantes pour le redémarrage des fourches reversées. En effet, elles permettent la dégradation limitée du brin régressé, prévenant ainsi la résolution pathologique des intermédiaires de la réplication. L'hélicase RECQ1 permet dans ce contexte de limiter la dégradation de l'ADN naissant par DNA2 (Thangavel et al., 2015). La déplétion de RAD51 empêche ce mécanisme, probablement car RAD51 joue un rôle important dans le processus de réversion (Zellweger et al., 2015a).

A l'inverse des translocases favorisant la régression, certaines hélicases de la famille RECQ permettent de restaurer les fourches reversées à l'état de fourche de réplication (Figure 18). Les protéines de la famille RECQ sont connues pour assister les fourches de réplication et participer à la gestion du stress répliatif. Par exemple, il a été montré que RECQ1 favorise la restauration des fourches régressées *in vitro* et permet le redémarrage après inhibition de la TOPI (topo isomérase I). De plus, PARP1 joue un rôle important dans la régulation de RECQ1. Il a été montré que PARP1 n'est pas nécessaire à la formation de fourches reversées mais plutôt à l'accumulation de ces dernières en empêchant l'action de RECQ1. En absence de PARP1, le redémarrage de la réplication via RECQ1 mène à la formation de CDB (Berti et al., 2013a). RECQ5 a aussi été montrée comme interférant avec la formation de fourches reversées. En effet, RECQ5 joue un rôle dans le MIDAS (mitotic DNA synthesis), et permet la déstabilisation du filament de RAD51, empêchant ainsi la régression et facilitant les clivages des fourches bloquées par MUS81 (Di Marco et al., 2017). (Di Marco et al., 2017). Dans une étude récente, le rôle de RECQ5, dans le cas de réversions induites par des collisions transcriptions-réplication, a été détaillé. Il a été montré que la présence de R-Loops induit des réversions de fourches. RECQ1 et RECQ5 permettent de retourner cette réversion afin de rétablir une structure à 3 branches « classique », qui sont alors redémarrées via un clivage par SLX4-MUS81. En effet, il a été proposé que RECQ1 retourne les fourches reversées déjà formées alors que, RECQ5 empêche la réversion en déstabilisant le filament de RAD51 (Chappidi et al., 2020). D'autres hélicases sont quant à elles capables de participer à la fois aux mécanismes de réversion et de retournement. C'est le cas des hélicases BLM et WRN, membres de la famille RECQ, qui ont été montrées comme médiant la réversion des fourches *in vitro*, mais aussi leur retournement (Machwe et al., 2011b, 2011a).

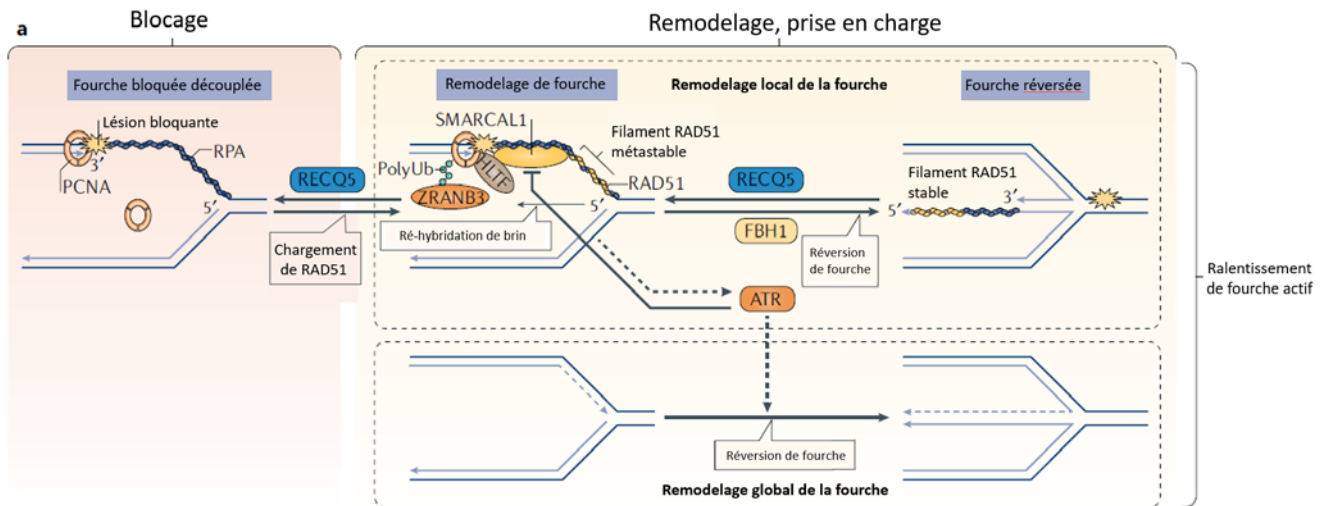


Figure 18 : Remodelage de la fourche de réplication : Suite à un blocage de fourche et son décollage, RPA qui recouvre l'ADNsb est partiellement remplacée par RAD51, menant à la formation d'un filament de RAD51. Avec l'aide de translocases (SMARCAL1, ZRANB3, HTP, etc.), ce filament de RAD51 facilite la réversion de la fourche de réplication. Suite à la réversion, le filament de RAD51 protège le brin régressé de la dégradation. La fixation de RAD51 est régulée par l'activité anti recombinasse de RECQ5 permettant le retournement de la fourche réversée en son état normal. L'accumulation d'ADNsb permet aussi l'activation d'ATR, limitant ainsi localement l'activité de SMARCAL1, tout en permettant globalement le ralentissement de la réplication. Adapté de Berti et al, 2020.

Les fourches reversées peuvent aussi être un substrat pour le complexe SLX4. Il a été montré que le clivage des fourches reversées par MUS81, favorise le redémarrage des fourches et la survie des cellules déficientes pour BRCA2. Le brin régressé est un point d'entrée pour CtIP et MRE11, afin de permettre ensuite une dégradation plus importante par EXO1, générant ainsi un substrat pour MUS81 (Lemaçon et al., 2017). Finalement, des données suggèrent qu'en l'absence d'ATR, SMARCAL1 n'est plus inhibée et génère un excès de fourches reversées. Celles-ci sont alors clivées de manière dépendante de SLX4, affectant la survie cellulaire et la progression des fourches (Couch et al., 2013a).

2.4 SLX4 et ses partenaires

La protéine SLX4 sert de plateforme de recrutement pour de nombreuses protéines participant à la protection du génome. Ainsi, SLX4 possède un rôle majeur dans une variété de mécanismes de maintenance de génome dont : la recombinaison homologe ; la réparation des ICL ; la gestion du stress réplcatif ; ainsi que la maintenance des télomères (Guervilly and Gaillard, 2018a).

2.4.1 Description de la protéine SLX4

La protéine SLX4 humaine, aussi connue sous le nom de FANCP ou BTBD12, est une protéine possédant plusieurs domaines et composée de 1834 acides aminés. Elle interagit avec de nombreuses protéines permettant la maintenance du génome comprenant entre autre: MSH2-MSH3, SXL4IP, TOPBP1, PLK1, TRF2, XPF-ERCC1, MUS81-EME1, SLX1 et RTEL1 (Figure 19) (Kim, 2016).

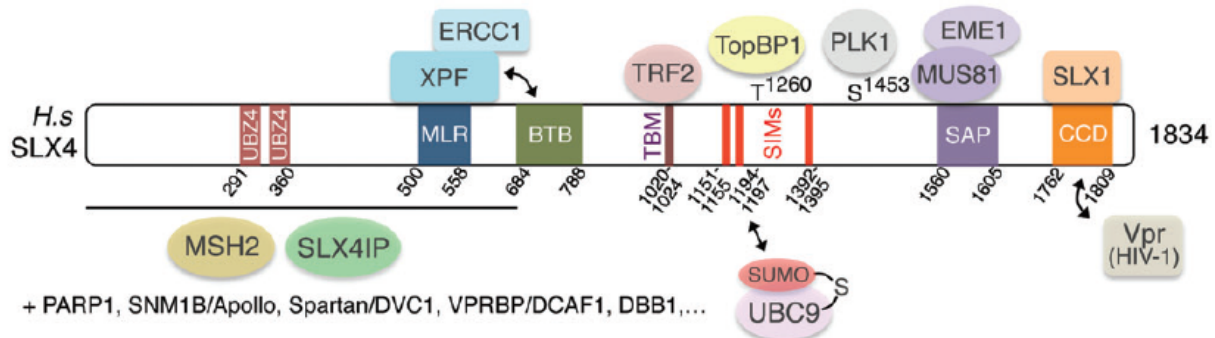


Figure 19 : Représentation schématique de SLX4 et ses partenaires. SLX4 est constituée de 2 domaines UBJZ (ubiquitin-binding zinc finger), un domaine MLR (MEI9^{XPF} interaction like region), un domaine BTB (Bric-a-brac, Tramtrack and Broad domain), un domaine SAP (SAF-A/B, Acinus and PIAS) et un domaine C-terminal (CCD). Le domaine MLR, SAP et CCD sont responsables de l'interaction avec XPF, MUS81 et SLX1 respectivement. Le domaine BTB participe, avec le domaine MLR, à la réparation des ICL. De plus, le domaine BTB permet aussi l'homodimérisation de SLX4, nécessaire à certaines fonctions de SLX4 comme sa localisation télomérique. Issu de Guervilly and Gaillard, 2018.

Les SSE (structure spécifique endonucleases) sont des éléments clef de la maintenance du génome permettant l'élimination des lésions de l'ADN ou le redémarrage des fourches de réplication bloquées. Ces enzymes permettent de cliver des structures de l'ADN « branchées », qui font obstacle à la réplication telles que des jonctions de Holliday ainsi que des fourches bloquées ou régressées. Néanmoins, des clivages désordonnés par les SSE sont potentiellement dangereux et sont donc contrôlés de manière stricte par SLX4 (Nowotny and Gaur, 2016).

SLX4 coordonne notamment l'action des SSE XPF-ERCC1, MUS81-EME1/EME2 et SLX1 qui permettent le clivage d'intermédiaires de réparation possédant des structures spécifiques. Les trois enzymes sont des hétérodimères comprenant une unité catalytique (SLX1, MUS81, XPF) et une sous unité régulatrice obligatoire (SLX4, EME1/EME2 et ERCC1 respectivement) (Ciccia et al., 2008). L'activation du complexes SLX4-SLX1 et SLX4-MUS81 est favorisé en phase G2/M afin de résoudre les jonctions de Holliday et les intermédiaires de réplication tardifs. En effet, la formation de ce complexe est améliorée par l'activité de CDK1 et PLK1, qui est plus importante en G2/M juste avant l'anaphase (Duda et al., 2016; Wyatt et al., 2017). MUS81

possède 2 partenaires dans les cellules humaines sans lesquelles elle ne peut pas agir : EME1 et EME2. SLX4-MUS81-EME1 peut résoudre les structures branchées, au préalable entaillées par SLX1-SLX4. Le complexe MUS81-EME2 quant à lui peut agir sur des structures intactes, sans l'action préalable de SLX1 (Falquet and Rass, 2019).

SLX4 possède plusieurs domaines d'ubiquitination et de SUMO-interaction (UBZ et SIMs respectivement) impliqués dans la réparation des ICL, la résolution des jonctions de Holliday et des intermédiaires de réplication (Guervilly and Gaillard, 2018a). SUMO, une famille de « small ubiquitin like proteins » qui peuvent former des chaînes poly-SUMO, est impliquée dans les mécanismes de réparation de l'ADN. Par exemple, le domaine SIM de SLX4 permet de reconnaître SUMO-2/3 via des chaînes poly-SUMO et favorise la réparation des intermédiaires de réplication induit par la camptothécine, ainsi que sa localisation aux niveaux des télomères (Ouyang et al., 2015).

L'interaction SLX4-XPF et SLX1 permet la réparation des ICL et SLX4 a été identifiée comme acteur de la voie de Fanconi (voie FA) sous le nom de FANCP. Les nombreuses protéines de cette voie participent, entre autres, à l'élimination des ICL. L'anémie de Fanconi est une maladie génétique rare, autosomale récessive liée au chromosome X et caractérisée par des aberrations congénitales, des défaillances de la moelle osseuse et des prédispositions aux cancers. De plus, les cellules des patients FA montrent une sensibilité accrue aux agents produisant des ICL tels que la mitomycine C (MMC) et le cisplatine (Cybulski and Howlett, 2011).

2.4.2 Rôle de SLX4 dans les mécanismes de réparation des ICL.

Les pontages inter brins sont des lésions liant de manière covalente les deux brins d'ADN. Ces ICL bloquent les processus de réplication de l'ADN comme la réplication et la transcription. Bien que les ICL puissent potentiellement être réparés à n'importe quelle phase du cycle, leur réparation se fait majoritairement couplée à la réplication. En effet, le blocage d'une fourche par un ICL ou la convergence de deux fourches vers un ICL semble être l'élément déclencheur de la réparation des ICL par SLX4 (Figure 20) (Zhang and Walter, 2014).

Le domaine UBZ de SLX4 est important pour la réparation des ICL. Des mutations de ce domaine retrouvées chez les patients FA provoquent des aberrations chromosomiques ainsi

qu'une sensibilité accrue aux agents produisant des ICL. En effet, la déplétion du domaine UBZ chez les patients FA inhibe le recrutement de SLX4 au niveau des ICL (Lachaud et al., 2014).

La majeure partie du rôle de SLX4 dans la réparation des ICL repose sur son interaction avec XPF-ERCC1 au niveau de son domaine MLR. Le domaine BTB de SLX4 favorise la réparation des ICL, probablement en permettant la fixation optimale de XPF-ERCC1 aux dommages (Guervilly and Gaillard, 2018a). La fonction de XPF-ERCC1 dans la réparation des ICL dépend de SLX4 étant donné que sa déplétion dans des cellules de patients FA déficientes pour SLX4 n'aggrave en rien leur sensibilité à des agents produisant des ICL (Kim et al., 2013). En plus de permettre le recrutement de XPF-ERCC1, SLX4 favorise la capacité de XPF-ERCC1 à cliver de chaque côtés des ICL *in vitro* au niveau des fourches de réplication (Hodskinson et al., 2014; Klein Douwel et al., 2014).

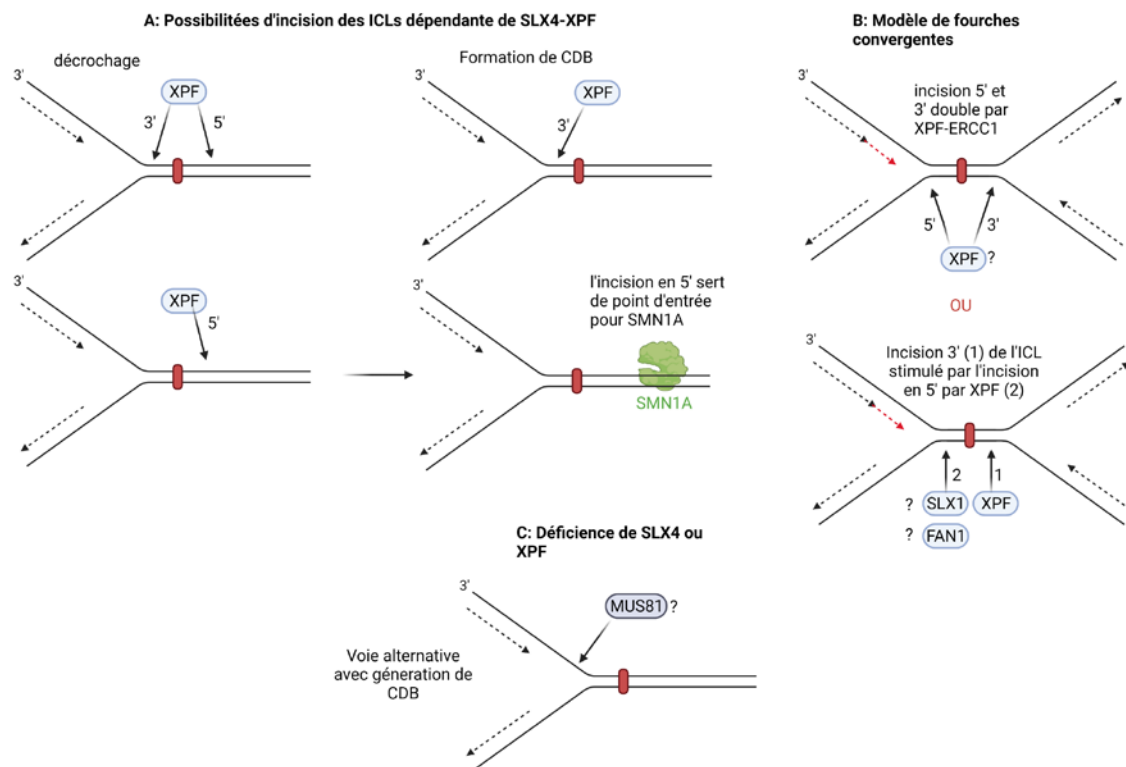


Figure 20 : SLX4 et la réparation des ICL : (A) Possibilité d'incision ou de dérochage par XPF-ERCC1. Gauche, XPF-ERCC1 à la capacité de cliver en 5' puis en 3' de l'ICL afin de l'éliminer ou seulement à l'une des 2 positions. L'incision en 5' seule de l'ICL par XPF peut servir de point d'entrée pour l'activité exonucléase 5' 3' translésionnelle de SMN1A qui peut digérer l'ICL. En revanche, un clivage en 3' seul peut mener à la formation d'une CDB. (B) 2 fourches de réplication convergent vers un ICL. La reconnaissance par FANCM de la fourche bloquée par l'ICL permet le recrutement du complexe FA et de SLX4. Le clivage est coordonné par SLX4. XPF, mais aussi SLX1 et FAN1 peuvent participer au clivage. (C) En cas de déficience de SLX4 ou XPF, il peut y avoir un clivage alternatif par MUS81 qui a pour conséquence la génération d'une CDB. Adapté de Guervilly et al, 2018.

La contribution du complexe SLX4-MUS81 dans la réparation des ICL reste incertaine à ce jour. Néanmoins des études montrent que l'interaction SLX4-MUS81 serait nécessaire pour la

réparation de CDB induites par la MMC (Nair et al., 2014). Il est possible que SLX4-MUS81 jouent un rôle dans la réparation des ICL à des étapes plus tardives lors de la prise en charge de potentiels intermédiaires de la RH (Guervilly and Gaillard, 2018a; Nair et al., 2014). SLX1 quant à elle joue un rôle dans la résistance à des agents produisant des ICL (Castor et al., 2013). Etant donné que les ICL empêchent la réplication de l'ADN, il est possible que SLX4 et MUS81/SLX1 agissent principalement au niveau des fourches bloquées, d'autant plus que des agents produisant des ICL peuvent induire des réversions de fourches (Zellweger et al., 2015a). Ainsi SLX4-MUS81-SLX1 pourraient agir au niveau des fourches bloquées par des ICL ayant échappées à la réparation par SLX4-XPF (Guervilly and Gaillard, 2018a).

2.4.3 Rôle de SLX4 au niveau des Télomères

Les télomères sont des séquences répétées 5'TTAGGG3' de cinq à quinze kilobases à la fin des chromosomes terminant par une séquence 3' simple brin de quelques centaines de bases. A ce niveau, il y a formation d'une boucle télomérique (T-Loop) par repliement et invasion de l'extrémité 3'. Les séquences télomériques sont reconnues par les protéines du complexe Shelterin qui protègent les télomères de la dégradation et des mécanismes de réparation imprévus (de Lange, 2018). Ces télomères raccourcissent à chaque division cellulaire. Les protéines du complexe shelterin peuvent recruter la télomérase, capable d'étendre la partie 3' d'ADNs. L'une des caractéristiques des cellules cancéreuses est leur capacité à proliférer indéfiniment. Pour cela les cellules cancéreuses contrecarrent le raccourcissement des télomères en réactivant la télomérase ou en faisant appel à un mécanisme alternatif d'allongement des télomères (ALT), basé sur un mécanisme de recombinaison (Maestroni et al., 2017).

SLX4 interagit avec TRF2, l'un des membres du complexe Shelterin, requis pour la formation de la T-Loop. La localisation de SLX4 au niveau des télomères nécessite son interaction avec TRF2 et est favorisée dans les cellules possédant de long télomères (Wan et al., 2013). Dans les cellules ALT, l'élongation des télomères repose sur la RH et l'interaction SLX4-TRF2. Cette interaction permet de réguler négativement la taille des télomères via des clivages par SLX1 (Wan et al., 2013). Le clivage des T-Loop par SLX4 et XPF ou SLX1, mais pas MUS81, génère des cercles T (Wilson et al., 2013). Ainsi, l'interaction SLX4-TRF2 pourrait permettre de maintenir un certain équilibre de la taille des télomères dans les cellules ALT (Wan et al., 2013). A l'opposé, afin de faciliter la réplication des télomères, l'hélicase RTEL1 peut être recrutée via

la phosphorylation de TRF2 afin de dissoudre la T-Loop (Sarek et al., 2015). L'action de RTEL1 prévient alors le raccourcissement télomérique médié par SLX4 (Vannier et al., 2012). Des observations similaires ont été faites pour BLM (Sarkar et al., 2015).

2.4.4 Rôle de SLX4 dans la recombinaison homologue

La fonction de SLX4 lors de la RH repose sur sa capacité à diriger des clivages de structures complexes de l'ADN formées au cours de la réparation, notamment au niveau des jonctions de Holliday. Le traitement de ces jonctions avant l'anaphase permet d'assurer une ségrégation correcte des chromosomes. La résolution des jonctions de Holliday peut reposer sur deux systèmes : premièrement par dissolution via le complexe BLM-TOPOIII α -RIM1-RIM2, ne formant pas de crossover. Deuxièmement, la résolution peut se faire via des incisions des brins échangés par des SSE spécialisées nommées les résolvases HJ, générant ainsi potentiellement des crossovers. Chez les mammifères, l'incision de ces jonctions repose sur SLX4 et ses SSE associées MUS81 et SLX1. SLX4 en association avec SLX1 permet de réaliser la première incision, la seconde étant réalisée sur le brin opposé par MUS81 (Guervilly and Gaillard, 2018a). De manière intéressante, XPF jouerait un rôle non catalytique dans la résolution de ces jonctions et autres structures en stimulant MUS81 (Wyatt et al., 2017).

SLX4 a aussi été montré comme interagissant avec MSH2, une protéine appartenant au mécanisme de la réparation des mésappariements. Le mécanisme de réparation des mésappariement (MMR) permet de réparer les mésappariements générés durant la réplication. MSH2 et MSH3 sont 2 composants de MUTS β qui favorise l'efficacité de résolution des jonctions de Holliday par SLX4-MUS81-SLX1 *in vitro* (Young et al., 2020).

2.4.5 Rôle de SLX4 dans le stress répliatif

Comme précisé précédemment, SLX4 et ses SSE jouent un rôle dans la gestion des structures formées au cours du stress répliatif (Figure 21). De plus, SLX4 est retrouvée au niveau des fourches de réplication en IPOND (Dungrawala et al., 2015), néanmoins son mode de recrutement au niveau du réplisome reste inconnu. Il est possible que SLX4 reconnaisse directement les structures secondaires de l'ADN formées lors du stress répliatif (Guervilly and Gaillard, 2018a). SLX4 participe à la survie cellulaire à la suite de traitements tels que la camptothécine (CPT) produisant un stress répliatif ainsi que des CDB associées à la réplication. Ce rôle protecteur de SLX4 repose principalement sur son interaction avec MUS81

essentiellement mais aussi avec SLX1 (Kim et al., 2013). SLX4, associée à MUS81 et SLX1 permettent le clivage des fourches bloquées, probablement de la même manière qu'elles procéderaient sur des jonctions de Holliday. Ces CDB collaboreraient au redémarrage des fourches de réplication (Hanada et al., 2007b; Lemaçon et al., 2017).

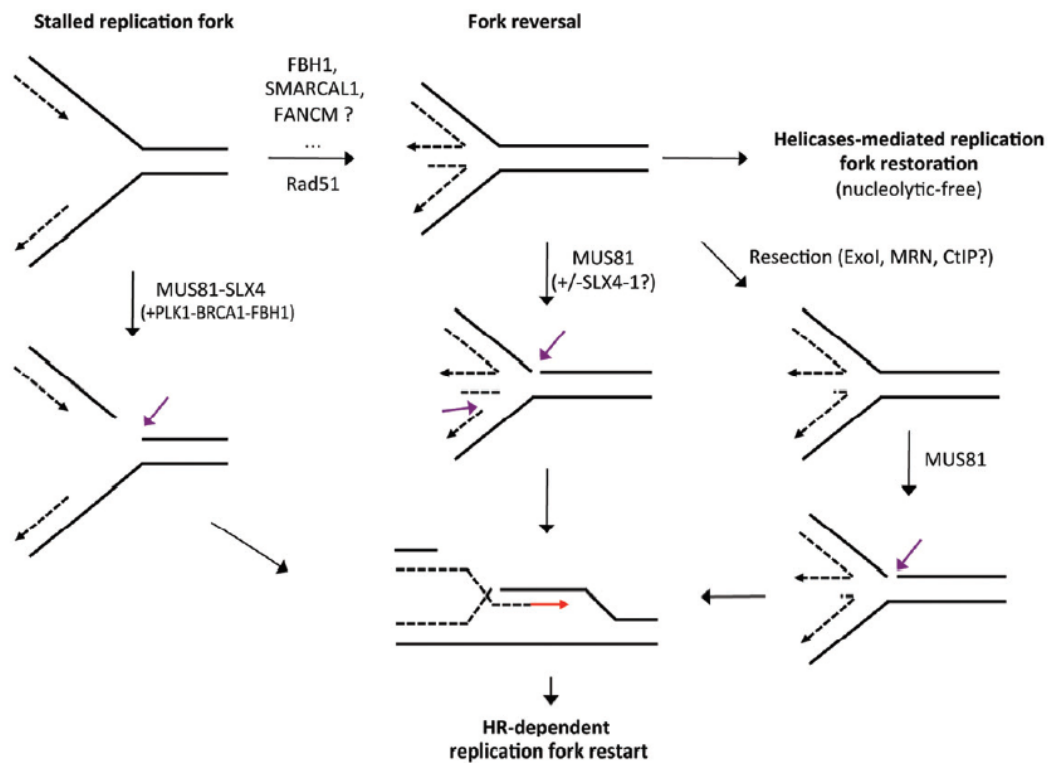


Figure 21 : Possibilités de clivage des fourches par SLX4-MUS81-SLX1 : (A) les fourches de réplication bloquées (par exemple après traitement HU) peuvent être clivées par SLX4 et MUS81, générant ainsi un substrat pour le redémarrage via la RH. De manière alternative, les fourches bloquées peuvent être reversées via des translocases (SMARCAL1, FANCM, FBH1, ect.). Cette structure peut être clivée par MUS81, potentiellement avec SLX4 et SLX1. Le clivage par MUS81 peut aussi avoir lieu après résection du brin régressé de la fourche. Issus de Guervilly et al, 2018.

Après stress réplcatif prolongé par des traitements HU ou APH, en association avec des inhibiteurs ATR, SLX4 favorise la formation de CDB. De manière intéressante, cette formation de CDB est dépendante de SLX4, mais pas des SSE partenaires de SLX4. En effet, la déplétion de SLX4 inhibe la formation de CDB après l'inhibition d'ATR, mais pas la déplétion individuelle de SLX1, MUS81 et XPF. Cela est potentiellement dû à des redondances entre les SSE. Etant donné que ATR inhibe SMARCAL1, il a été proposé que dans le contexte d'un stress réplcatif et d'une inhibition d'ATR, la formation de CDB par SLX4 se produit au niveau des fourches reversées alors plus nombreuses (Couch et al., 2013a). De plus, la déplétion de FANCM, un acteur de la réversion, dans des cellules déficientes pour RAD51C, diminue les niveaux de SLX4 et MUS81 au niveau des fourches bloquées en IPOND après traitement HU (Somyajit et al., 2015). Des translocases nécessaires à la réversion de fourches, tel que FBH1 et SMARCAL1,

semblent être nécessaires aux clivages médiés par SLX4 (Couch et al., 2013a; Fugger et al., 2013). Ces résultats suggèrent donc que les fourches réversées seraient un substrat privilégié pour la formation des CDBs médiées par SLX4 et ses partenaires. D'ailleurs, WRNIP a été proposé comme protégeant les fourches réversées des clivages médiés par SLX4 et SLX1/XPF (Porebski et al., 2019).

2.4.6 Rôle de SLX4 dans la gestion des conflits transcription réplication

Récemment, il a été mis en évidence l'existence d'un nouveau partenaire « direct » de SLX4 : RTEL1 (Takedachi et al., 2020a). En effet, il existe une interaction directe entre le domaine BTB de SLX4 et le domaine HD1 de RTEL1. Des mutants d'interaction de SLX4 avec RTEL1 (SLX4 L618P et D614G) ont été identifiés. Cette interaction ne serait d'ailleurs pas nécessaire à leur interaction avec un partenaire commun : TRF2. Cette étude montre que des siRNA SLX4 ou RTEL1 provoquent des perturbations de la réplication. Néanmoins, la complémentation avec SLX4 LP et DG ne restaure pas l'effet, montrant ainsi que l'interaction SLX4 et RTEL1 favorise la progression de la fourche de réplication en l'absence de stress. De manière intéressante, ce rôle de SLX4 lors de la réplication ne dépendrait pas de l'interaction avec ses partenaires SSE. En effet, un siSLX4 génère des perturbations de la réplication et la complémentation avec SLX4 sauvage prévient les perturbations de la réplication. Cependant ce n'est pas le cas en cas de complémentation avec une forme de SLX4 mutante pour son interaction avec ses SSE partenaires. Il a aussi été montré que l'interaction SLX4-RTEL1 est nécessaire pour prévenir les conflits transcription-réplication qui, comme vu précédemment, sont sources de stress réplcatif. En effet, il n'y a plus de perturbations de la réplication après déplétion de SLX4 ou de RTEL1 en cas d'inhibition de la transcription avec de la Cordycépine. Il est possible que ces deux protéines collaborent afin d'éliminer des structures gênant le passage de la fourche de réplication ou la transcription. Néanmoins, le rôle exact de SLX4 avec RTEL1 lors de la réplication reste inconnu.

En parallèle, une autre étude montrant un rôle de SLX4 et de RTEL1 lors de la réplication a été publiée (Wu et al., 2020). Ces résultats montrent que RTEL1 prévient l'accumulation de R-Loops, facilitant ainsi la réplication. De manière intéressante, un siSLX4 diminue le recrutement de RTEL1 au niveau des R-Loops. Ainsi, les auteurs suggèrent que l'élimination des R-Loops médié par SLX4 et RTEL1 est nécessaire afin que par la suite, les SSE puissent accéder aux fourches de réplcations bloquées.

3 Réponse immunitaire à l'ADN cytosolique

Les cellules des vertébrés possèdent des mécanismes de défenses et de détections des pathogènes tels que les bactéries, champignons et virus. Le système immunitaire inné permet une réponse défensive rapide face à des menaces pathogènes. Il permet la reconnaissance de signatures moléculaires essentielles et spécifiques aux pathogènes (PAMP pour pathogen-associated-molecular-pattern) via des récepteurs spécialisés (PPR pour pattern recognition receptors). Aussi, des motifs moléculaires associés aux cellules endommagées de l'hôte (DAMP pour Damage associated molecular pattern), peuvent être reconnus par les PPR. Une cascade de signalisation sera alors mise en marche constituée de diverses kinases et facteurs de transcriptions permettant l'activation de l'expression de nombreux gènes. Parmi ces derniers, on retrouve des cytokines, chemokines, immuno-récepteurs, permettant la mise en place de la réponse innée et par la suite, la préparation de la réponse adaptative. Parmi les molécules pouvant être détectées par les PPRs se trouvent les acides nucléiques, permettant la production d'interféron (IFN) de type 1 et de cytokines et chemokines pro-inflammatoires. Néanmoins, l'ADN de la cellule hôte peut dans certains cas activer le système immunitaire (Hu and Shu, 2020a).

3.1 Détection des acides nucléiques cytoplasmiques.

Chez les eucaryotes, l'ADN se situe normalement dans le noyau des cellules ou dans la mitochondrie. Cependant, il peut y avoir présence d'ADN dans le cytoplasme des cellules, qui est alors appelé ADN cytosolique. Cet ADN cytosolique peut avoir des origines exogènes, comme lors d'une infection virale lorsque les virus injectent directement leur ADN ou ARN dans la cellule hôte. C'est aussi le cas lors d'une infection bactérienne. En effet l'ADN microbien est facilement exposé au cytoplasme des cellules lors d'une infection et est un PAMP typiquement reconnu par les cellules hôtes. Le premier PPR identifié comme étant impliqué dans la détection des ADN cytosoliques est TLR9, menant à la production de cytokines et interférons de type I via NF- κ B et IRF7 respectivement. TLR9 est responsable de la détection d'ADN sous méthylé, enrichi dans les bactéries par rapport aux cellules de mammifères (Dempsey and Bowie, 2015).

Les mammifères possèdent plusieurs classes distinctes de PRRs chacune associées à des classes spécifiques de PAMPs menant à l'activation du système immunitaire inné, à la sécrétion de facteurs inflammatoires et au recrutement de cellules immunitaires.

3.1.1 Mécanismes de détection des ADN cytosoliques

Il existe plusieurs senseurs de l'ADN permettant l'activation de la voie NF- κ B et, via IRF3, la production d'interférons de type 1. Ces senseurs permettent l'activation de STING, un élément central de la réponse immunitaire aux acides nucléiques cytosoliques. Parmi les senseurs pouvant activer STING se trouvent notamment cGAS, IFI16, AIM2.

3.1.1.1 La voie STING

Il existe des senseurs variés permettant la détection des ADN cytosoliques. Parmi eux, cGAS joue un rôle central dans la détection des ADN cytosoliques. cGAS est notamment capable de se lier au squelette sucre-phosphate des ADNdb ainsi que des hybrides ARN : ADN, et cela indépendamment de leur séquence (Figure 22).

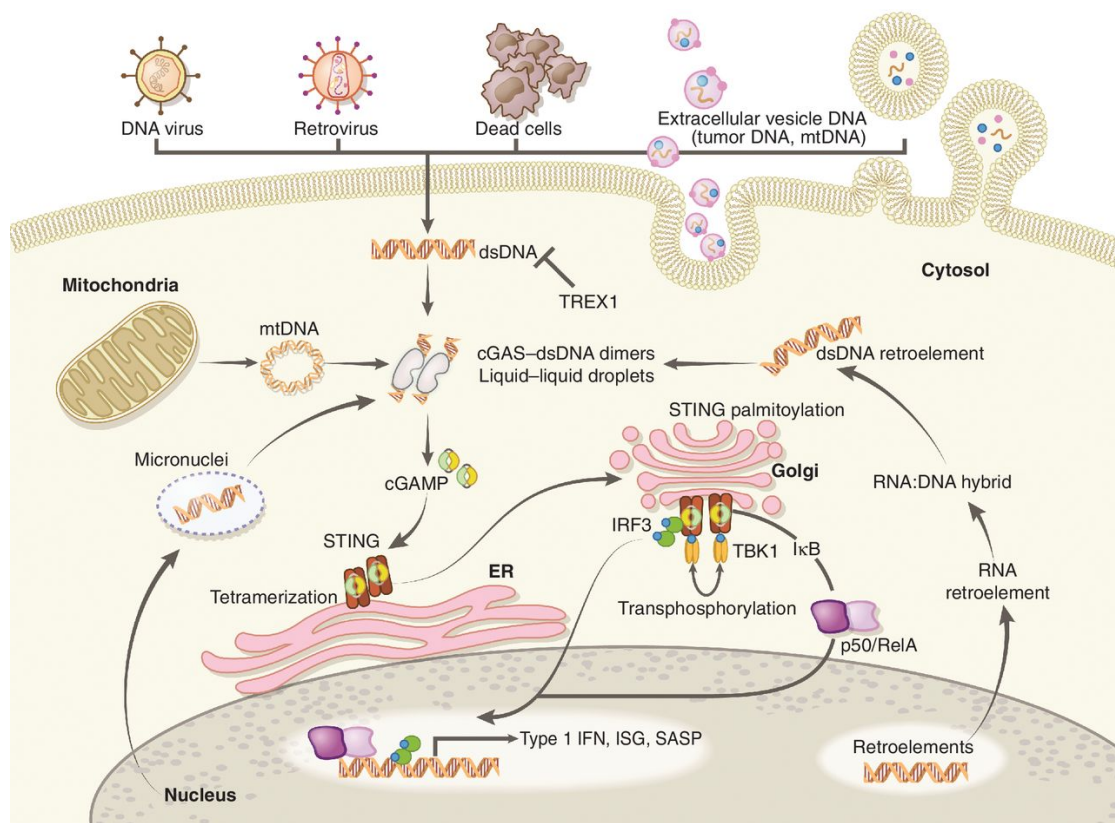


Figure 22 : Détection des acides nucléiques issus de pathogènes : cGAS permet de reconnaître des ADNdb d'origine exogène, ou endogène issus de rétro éléments ou micro-noyaux. Une fois cGAS activé, il catalyse la production de cGAMP qui à son tour, stimule STING. STING transloque du réticulum endoplasmique vers le Golgi et sert de plateforme d'activation pour TBK1 et IKK. TBK1 permet l'activation et la translocation de IRF3 au noyau et IKK permet l'activation de la voie NF- κ B. Issu de Chen et al 2016

In vitro, une taille minimale de 15 nucléotides est requise pour l'activation de cGAS, néanmoins des grands fragments d'ADN cytosoliques activent plus efficacement cGAS (Dhanwani et al., 2018; Herzner et al., 2015). Suite à sa fixation à de l'ADNdb cytosolique, cGAS va se dimériser et catalyser la synthèse de 2'3'-cGAMP. cGAMP se fixe alors à une protéine clef des mécanismes de détection des acides nucléiques cytoplasmiques, STING (pour Stimulator of interferon genes), au niveau du réticulum endoplasmique. Par la suite, STING transloque au golgi et se dimérise. STING permet alors la phosphorylation de TBK1 menant à son activation. Celle-ci permet à son tour, la phosphorylation d'IRF3 menant à la production d'IFN (Dhanwani et al., 2018). STING permet également l'activation de IKK, qui phosphoryle les protéines IκB, inhibitrice de NF-κB. Les protéines IκB sont alors dégradées, ce qui libère NF-κB permettant sa translocation dans le noyau et activer la production de cytokines (Figure 22) (Hornung et al., 2014). Les IFN permettent de limiter la propagation virale ou bactérienne et permettent d'activer des cellules immunitaires innées comme les cellules NK (pour Natural Killer), macrophages et cellules dendritiques. Via l'association avec leur récepteur JAK1 (pour Janus Kinase 1) et Tyrosine kinase 2, les IFN permettent la phosphorylation de STAT1, STAT2 et STAT3 menant à leur dimérisation et l'activation des ISGs (pour interferon stimulated genes) (Figure 23). Les ISGs possèdent aussi un rôle antiviral (Ivashkiv and Donlin, 2014a).

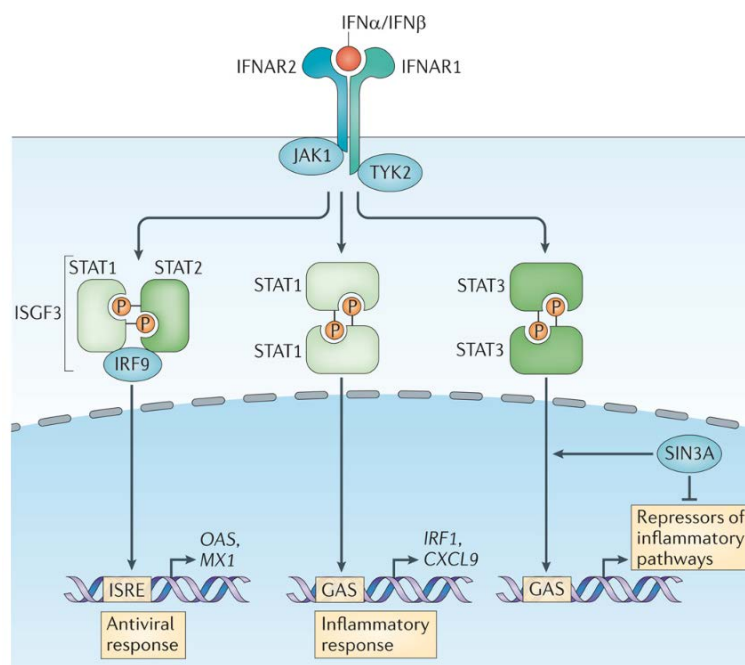


Figure 23 : La voie canonique de signalisation des interférons de type I : L'activation du récepteur à l'interféron α (IFNAR composé de IFNAR1 et IFNAR2) active la kinase Janus 1 (JAK1) et la tyrosine kinase 2 (TYK2). Ces dernières permettent la phosphorylation, dimérisation et activation de différentes protéines STAT. Les protéines STAT vont pouvoir transloquer au noyau et permettre l'activation de plusieurs séries de gènes. Issu de Ivashkiv et al, 2014.

De manière intéressante, il a été mis en évidence une voie d'activation de STING de manière indépendante de cGAS, passant par la détection de dommages à l'ADN dans le noyau (Dunphy et al., 2018) (Figure 24). En effet, il a été montré qu'un traitement à l'étoposide, produisant des CDB, induit une réponse immunitaire dépendante de STING mais pas de cGAS. Cette voie non canonique est médiée par le senseur de l'ADN IFI16 (pour InterFeron Inducible protein 16) qui active surtout la voie NF- κ B et plus modestement IRF3 et les IFN de type I. Cette voie nécessite la reconnaissance des dommages par ATM et PARP1 afin de permettre la formation d'un complexe d'activation de STING constitué de IFI16, P53 et TRAF6 (pour Tumor necrosis factor receptor associated factor 6). Ce complexe transloque alors dans le cytoplasme et permet l'activation de STING, sans forcément nécessiter d'ADN cytosoliques (Dunphy et al., 2018; Unterholzner and Dunphy, 2019). IFI16 est aussi capable de détecter l'ADNsb cytosolique, notamment d'origine virale. Dans ce cas, IFI16 peut aussi participer à la voie cGAS-STING. En effet, il a été montré une coopération entre IFI16 et cGAS pour l'activation de STING et la production d'IFN (Almine et al., 2017).

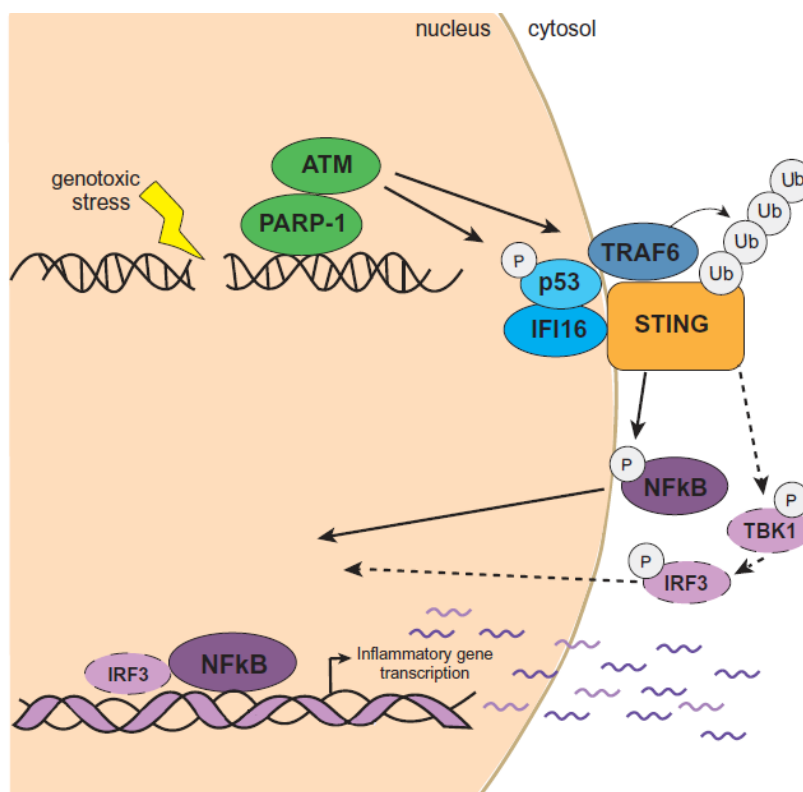


Figure 24 : Activation non-canonique de la voie STING : La signalisation des dommages à l'ADN par ATM, PARP1 et IFI16 mène à l'assemblage d'un complexe d'activation de STING non canonique au niveau du réticulum endoplasmique. Ce complexe contient IFI16, P53 TRAF6. L'ubiquitination de STING par TRAF6 induit une activation prédominante de NF-KB plutôt que TBK1/IRF3. Issu de Unterholzner, 2019.

Il existe d'autres senseurs d'ADN cytosoliques permettant l'activation d'une réponse immunitaire innée. AIM2 (pour Absent In Melanoma 2) détecte les fragments d'ADNdb cytosoliques de 80 nucléotides minimum, induisant la formation d'un complexe AIM2 inflammasome menant à l'activation de la caspase 1. DDX41 (pour DEAD-BOX Helicase 41) permet aussi de détecter les ADN cytosoliques et induit, via STING, l'activation de la voie NF- κ B et des IFN (Gasser et al., 2017).

3.1.2 Détection des ARN cytosoliques

Etant donné qu'une infection virale peut aussi produire des PAMPs en lien avec l'ARN tels que des ARN double brins (ARNdb), il est normal que les cellules possèdent des mécanismes de détection de ces derniers. Il existe notamment 2 groupes capables de lier l'ARN, à savoir RIG-I (pour Retinoic acid Inducible Gene I) et MDA5 (pour Melanoma Differentiation Associated gene 5). MDA5 permet notamment la détection de longs ARNdb et RIG-I plutôt celle d'ARN double brins et simple brin possédant une extrémité 5' triphosphate. Suite à la reconnaissance d'ARN, ces 2 protéines s'associent avec la protéine adaptatrice MAVS (pour Mitochondrial AntiViral Signaling protein). MAVS permet alors l'activation de IRF3 via TBK1, menant à la production d'IFN de type 1. La voie MAVS active aussi la voie NF- κ B et la production de cytokines inflammatoires. De plus, il existe un lien entre ADN cytosolique et activation de la voie MAVS (Zevini et al., 2017a). En effet il a été montré que des ADN cytosoliques riches en AT peuvent être transcrits par l'ARN polymérase III en ARNdb, alors détectés par RIG-I (Figure 25) (Chiu et al., 2009a).

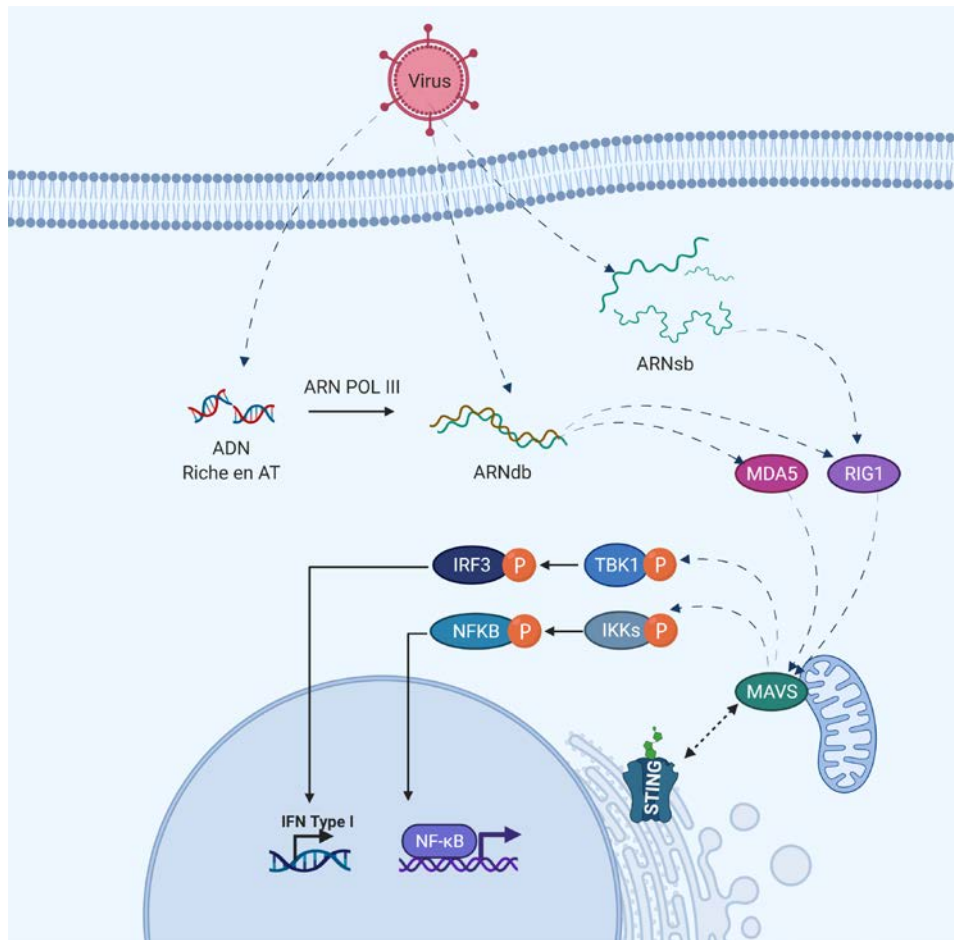


Figure 25 : Activation de la voie MAVS : Les virus libèrent leur ADN et ARN dans le cytoplasme de la cellule. RIG-I permet la reconnaissance des ARNsb et ARNdb et MDA5 des ARNdb. Les ADN riches en AT peuvent aussi être transcrits par l'ARN POLIII en ARNdb. Par la suite, RIG-I et MDA5 permettent l'activation de MAVS au niveau de la membrane mitochondriale. Cela a pour conséquence la phosphorylation de TBK1 et IKK permettant l'activation de IRF3 et NF-κB respectivement. Ces derniers vont transloquer dans le noyau et activer la transcription de facteurs inflammatoires. Adapté de Zevini et al, 2017.

3.1.3 Dégradation de l'ADN cytosolique.

Afin d'éviter l'activation excessive du système, il existe des mécanismes de dégradation des ADN cytosoliques faisant intervenir des désoxyribonucléases (DNase). Ainsi les ADN cytosoliques sont dégradés afin d'éviter leur accumulation pouvant avoir des conséquences négatives sur le fonctionnement cellulaire. Il existe 3 principales DNases participant à la dégradation des ADN cytosoliques.

TREX1 est une exonucléase possédant une activité 5'-3' capable de dégrader les ADN cytosoliques simple et double brins, ainsi que les micro-noyaux après dommages à l'ADN (Hu and Shu, 2020a). Cependant, l'oxydation des ADN cytosoliques a été montré comme inhibant la dégradation de ces derniers via TREX1 (Gehrke et al., 2013). En cas de dommages trop important, comme une forte dose d'irradiation, le niveau d'expression de TREX1 augmente (Vanpouille-Box et al., 2017a). De manière intéressante, après rayon γ , TREX1 se relocalise au

niveau des fourches de réplication des cellules en phase S. Il a été proposé que TREX1 dégrade des ADNsb de 60 à 65 nucléotides générés lors de la prise en charge de fourches bloquées après IR (Yang et al., 2007). De plus, TREX1 est capable d'éliminer les rétrotransposons (Stetson et al., 2008). A l'inverse, une déficience de TREX1 induit une accumulation d'ADN cytosoliques dans la cellule (Erdal et al., 2017a; Stetson et al., 2008).

SAMHD1, importante pour la régulation des niveaux cellulaires de nucléotides, a été montré comme empêchant l'accumulation d'ADNsb cytosoliques par son action au niveau des fourches de réplifications bloquées. En cas de déficience de SAMHD1, une résection anormale des fourches de réplication bloquées, par RECQ1 et une endonucléase telle que MRE11, induit une accumulation d'ADN cytosoliques (Coquel et al., 2018a). La DNase II, située au niveau des lysosomes, permet quant à elle la dégradation des ADN endocytés ainsi que ceux provenant du noyau de la cellule (Hartmann, 2017). Par ailleurs, l'accumulation d'hybrides ARN : ADN peut aussi mener à la production d'interféron de type I. Une déficience de la RNase H1, jouant un rôle dans la dégradation des hybrides, est associée à l'accumulation d'ADN cytosoliques. A l'inverse, la surexpression de la RNase H1 diminue les niveaux d'ADN cytosoliques après stress réplcatif (Shen et al., 2015).

Ces nucléases permettent d'éviter l'induction d'interféron de type 1 ainsi qu'une inflammation chronique causée par la détection d'ADN cytosoliques provenant du noyau des cellules. Des déficiences de ces protéines génèrent des maladies auto-immunes telle que le syndrome d'Aicardi-Goutières (AGS). Ce syndrome est causé par des mutations des gènes codants pour TREX1, RNase H2 ou SAMHD1 et est caractérisé par une production chronique d'interférons de type I (Coquel et al., 2019).

3.2 Sources et acteurs connus de la production d'ADN cytosoliques

La reconnaissance de l'ADN viral est connue pour induire une production de facteurs inflammatoires. De manière similaire, des données récentes montrent que les dommages à l'ADN peuvent initier une activation du système inné (Erdal et al., 2017a; Gasser et al., 2017; Härtlova et al., 2015a; Ho et al., 2016a).

3.2.1.1 Dommages à l'ADN

Plusieurs études ont montré un lien entre réponse aux dommages à l'ADN et activation des gènes d'IFN1 médiée par la détection d'ADN cytosoliques. Des dommages à l'ADN peuvent induire la production d'ADN cytosoliques et activer les mécanismes d'inflammation I (Figure 26) (Brzostek-Racine et al., 2011; Nastasi et al., 2020). De plus, l'une des caractéristiques des cellules cancéreuses est l'instabilité génétique et l'accumulation d'ADN dans le cytosol qu'il soit double brin ou simple brin (Hong et al., 2019).

Par exemple, un lien a été montré entre la persistance de dommage et la réponse immunitaire innée, dans des cellules de patients atteints de l'Ataxie Telangiectasie (AT). L'AT est une maladie causée par une mutation d'ATM, dont les symptômes sont entre autres, des prédispositions au cancer, une neurodégénérescence ainsi qu'une variété de syndromes inflammatoires et immuno-déficients. Cette étude montre une accumulation d'ADNsb dans le cytoplasme des cellules AT menant à la production d'IFN de type I, via cGAS et IFI16. De plus, un traitement à l'étoposide, produisant des dommages à l'ADN, induit aussi une accumulation d'ADNsb cytosoliques (Härtlova et al., 2015a). De nombreuses études ont ainsi montré que des agents génotoxiques mènent à l'induction d'IFN de type 1. En effet, le cisplatine, la mitomycine C et les rayons γ mènent à la production d'ADNsb cytosoliques et à l'activation des IFN de type I (Erdal et al., 2017a). Par ailleurs, les traitements à la camptothécine (Brzostek-Racine et al., 2011), l'Ara-C, l'aphidicoline, le HU (Ho et al., 2016a; Shen et al., 2015), induisent également l'activation des IFN.

De manière intéressante, la voie STING, via la reconnaissance d'ADN et de micro-noyaux par cGAS, a été montrée comme participant à la sénescence, au SASP (pour senescence associated secretory phenotype) et au vieillissement en lui-même. Cette inflammation liée à l'âge pourrait être due à une efficacité diminuée des protéines de la réparation ainsi que du système immunitaire aboutissant à l'accumulation de cellules sénescentes (Fontanilla et al., 2020; Rodier and Campisi, 2011; Willaume et al., 2021a).

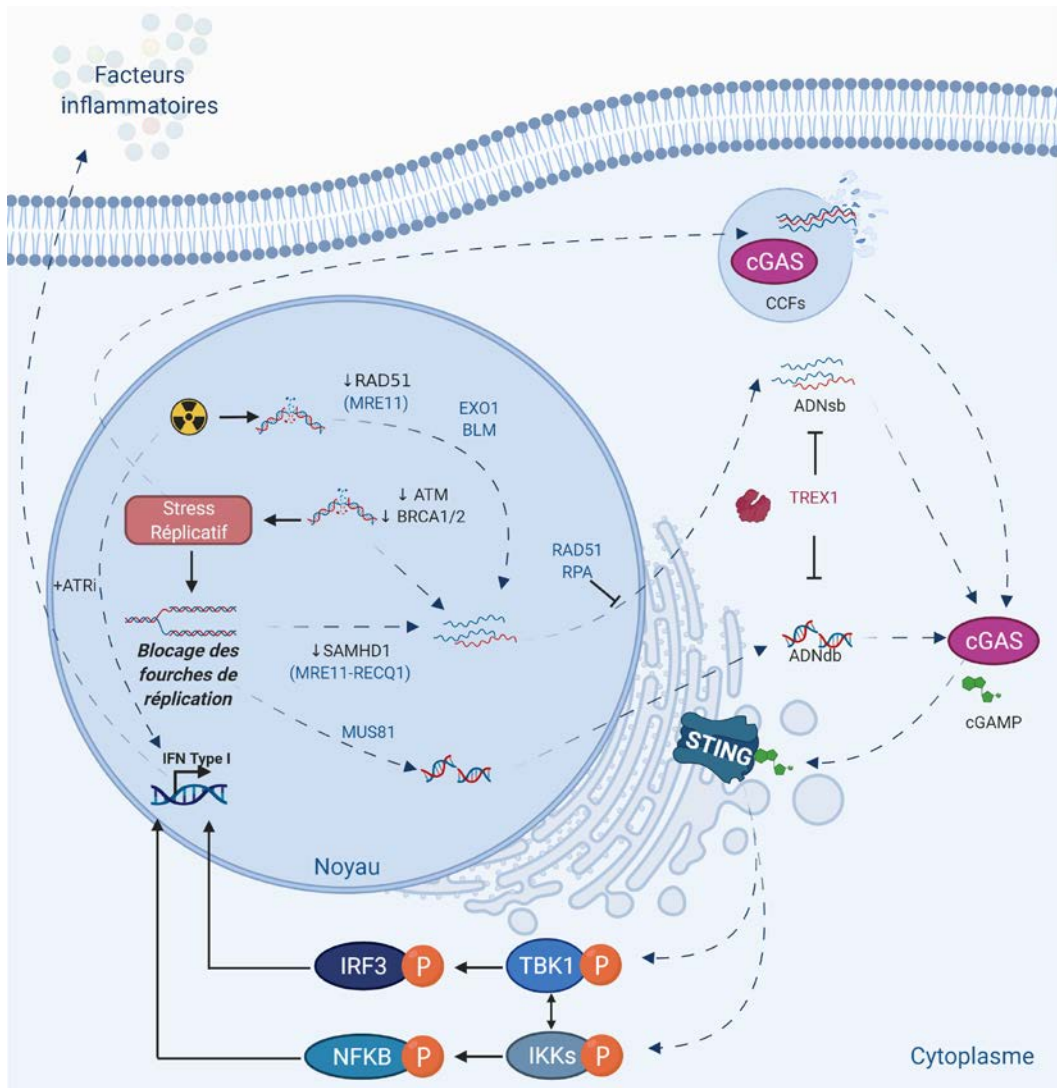


Figure 26 : Activation canonique de la voie STING après stress réplcatif ou dommages à l'ADN : L'ADN cytosolique est libéré suite à un stress génotoxique pouvant être provoqué par des facteurs endogènes (ROS, stress réplcatif, retro éléments, etc.), exogènes (agents thérapeutiques, IR, etc.) ou en cas de persistance de dommages à l'ADN (déficiency d'ATM ou BRCA1/2, etc.). L'ADN cytosolique pourrait être issu d'intermédiaires de la réparation ou généré lors de la prise en charge des fourches de réplication bloquées. En effet, MUS81 participe à la production d'ADNdb cytosolique. Aussi, la résection aberrante des fourches de réplication en l'absence de SAMHD1, mène à l'accumulation d'ADNsb cytosolique, médiée par une endonucléase telle que MRE11 et l'hélicase RECQ1. Après IR, EXO1 et BLM participent à la production d'ADN cytosolique. De plus, en cas de déficiency de RAD51, il y a production d'ADN cytosolique médiée par MRE11 après IR. Afin d'éviter l'accumulation d'ADN cytosolique, des protéines de la réparation telles que RAD51 ou RPA sont liées à l'ADNsb et empêchent leur clivage et leur passage dans le cytoplasme. Une fois dans le cytoplasme, l'ADN cytosolique, il n'est pas dégradé par TREX1, peut être détecté par le senseur d'ADN cGAS. Ces ADN cytosoliques peuvent être aussi générés lors de la rupture de l'enveloppe nucléaire ou de micronoyaux. L'activation de cGAS mène à la production de GMP-AMP cyclique (cGAMP) capable d'activer STING au niveau du réticulum endoplasmique. Après activation, STING transloque au niveau du Golgi où il recrute les kinases IKK et TBK1. Ces protéines activent NF-κB et TBK1 respectivement, qui vont transloquer dans le noyau et activer la transcription de facteurs inflammatoires. Adapté de Willaume et al, 2021.

3.2.1.2 Facteurs impliqués dans la production d'ADN cytosolique

Le stress réplicatif, en plus de ses conséquences sur la stabilité du génome, déclenche une réponse immunitaire innée via la production d'ADN cytosoliques (Figure 26). Différentes études proposent ainsi que les dommages en phase S contribuent à la production d'ADN cytosoliques et à la production d'IFN qui en découle. Il a par exemple été montré une augmentation des niveaux d'IFN en phase S par rapport à la phase M dans des cellules de cancers du sein déficientes pour BRCA1 (Parkes et al., 2017a). Une déficience en BRCA2 a aussi été montrée comme induisant l'activation du système immunitaire inné (Reisländer et al., 2019).

Il a été proposé que le blocage des fourches de réplication et leur prise en charge soit à l'origine de la production d'ADN cytosoliques (Coquel et al., 2018a; Ho et al., 2016a). En effet, il a été montré dans des cellules issues de cancers de la prostate (TRAMP-C2, murines) que l'accumulation d'ADN cytosoliques simple et double brins dépend de MUS81. De plus, MUS81 participe à la production d'IFN via la voie STING et à la réjection immune de la tumeur *in vivo* (Ho et al., 2016a). Dans cette étude, il a aussi été proposé un rôle d'ATR et de PARP1 dans la production d'ADN cytosoliques.

Les inhibiteurs de PARP ont été approuvés pour le traitement de patients atteints de cancer ovarien et de cancer du sein déficient en BRCA1 ou BRCA2, possédant une diminution de l'efficacité de la RH. Les inhibiteurs de PARP vont bloquer le site catalytique de PARP, empêchant sa dissociation de l'ADN ce qui génère un obstacle pour la fourche de réplication et entraînent la formation de CDB. De plus, en empêchant les PARP d'agir, les inhibiteurs PARP vont promouvoir la formation de CSB qui, lors de la réplication, seront converties en CDB. Ces CDB, dans les cellules déficientes BRCA1 ou BRCA2, entraîneront la mort des cellules (Bryant et al., 2005; Farmer et al., 2005). Une étude montre (Ho et al., 2016a), qu'un inhibiteur de PARP (NU1025) diminue la production d'ADN cytosoliques double brin. D'autres études ont aussi étudié le rôle de PARP sur la production d'ADN cytosoliques (Erdal et al., 2017a; Kim et al., 2020; Reisländer et al., 2019; Shen et al., 2019). A l'inverse, il a été montré qu'un traitement Talazoparib (inhibiteur de PARP1) dans des cellules HeLa, induit la production d'ADN cytosoliques double brin ainsi qu'une production d'interféron (Kim et al., 2020). Les mêmes observations ont été reportées pour plusieurs lignées cellulaires cancéreuses humaines ou murines (Shen et al., 2019). Par ailleurs, il a été montré qu'un traitement sur des cellules

MCF7 à l'olaparib, inhibiteur de PARP1 et PARP2, augmente la production d'ADN cytosoliques simple brin avant et après irradiation (Erdal et al., 2017a; Reisländer et al., 2019). Cependant, ces études ont utilisé différents inhibiteurs de PARP que dans Ho et al, avec des modes d'actions et cibles légèrement différentes, ce qui pourrait expliquer les différences observées.

Par ailleurs, le rôle d'ATR dans la production d'ADN cytosoliques a aussi été étudié. Dans des cellules de cancers colorectaux, l'inhibition d'ATR diminuerait la production d'ADN cytosoliques (Ho et al., 2016a). Cependant, une autre étude montre que l'inhibition d'ATR favorise la production d'IFN après irradiation (Feng et al., 2020a) ou potentiellement dans des cellules de cancers du sein déficientes pour BRCA1 (Parkes et al., 2017a). Cependant, ces études ont toutes utilisées des inhibiteurs d'ATR différents. Le rôle exact d'ATR et de PARP reste donc à approfondir.

D'autres acteurs de la prise en charge des fourches de réplication ont aussi été proposé comme responsables de la production d'ADN cytosoliques. Dans des cellules déficientes pour SAMHD1, il y a accumulation d'ADN cytosoliques simple brin et production d'IFN via la voie cGAS-STING. Cette production d'ADN cytosoliques est due à une dégradation incontrôlée par une endonucléase telle que MRE11, et est dépendante de l'hélicase RECQ1. L'implication d'autres facteurs a été testée dans cette étude après shSAMHD1 et traitement HU tels que WRN, BLM, DNA2 et CtIP. Néanmoins leur rôle sur la production d'ADN cytosoliques semble moins important que RECQ1 dans le cas d'une déficience en SAMHD1 (Coquel et al., 2018a).

La perte de protéines de la réparation des mésappariements (MMR) a aussi été montrée comme participant à la production d'ADN cytosoliques. Les tumeurs déficientes pour le MMR présentent une bonne réponse à l'immunothérapie grâce à une activation de la voie STING. En effet, il a été montré qu'en cas de déficience pour MLH1, protéine du MMR régulant EXO1, il y a accumulation d'ADN cytosoliques. Cette production d'ADN cytosoliques est médiée par EXO1 qui, en cas de perte de MLH1, induit une résection non contrôlée (Guan et al., 2021).

De manière intéressante, il a été proposé que RAD51 et RPA peuvent se lier/fixer à des fragments d'ADN simple brin, micro injectés dans la cellule et empêcher ainsi leur libération dans le cytosol. Leur déplétion augmente les niveaux de ces ADN cytosoliques ainsi que la production d'IFN (Wolf et al., 2016a). Le mécanisme de passage des ADN cytosoliques du noyau vers le cytoplasme des cellules reste inconnu à ce jour. Des données montrent qu'un

traitement leptomycine B, inhibiteur de l'exportine 1, sur des cellules sénescents inhibe le passage des ADN cytosoliques (Lan et al., 2019). Cela peut suggérer que les ADN cytosoliques ne traversent pas passivement la membrane nucléaire et nécessite un système actif. Cependant il faut garder à l'esprit que la leptomycine inhibe le transport de nombreux ARN messagers. Il se peut donc que la diminution d'ADN cytosoliques observée après traitement leptomycine ne soit pas due à l'inhibition de l'exportine 1.

La perte de RAD51 a aussi été proposée comme participant à la production d'ADN cytosoliques et le déclenchement de la voie STING dans le cas de cellules exprimant la progérine (sans IR). En effet, le syndrome de la progéria Hutchinson Gilford (HGPS) est provoqué par une mutation du gène de la lamine A, une protéine de l'enveloppe nucléaire. Cette mutation induit l'expression d'une forme farnésylée non maturée et tronquée de la protéine nommée progérine. Il a été montré que l'expression de la progérine induit, entre autres, un stress répliatif et l'activation de la voie STING. La diminution de l'expression de RAD51 dans les cellules exprimant la progérine participerait à ce phénotype (Coll-Bonfill et al., 2020; Willaume et al., 2021a).

Il a aussi été proposé que l'ADN cytosolique passe dans le cytosol via des fuites des micro-noyaux. Une instabilité génétique peut avoir pour conséquence la formation de ponts anaphasiques qui, lors de la mitose, peuvent former des micro-noyaux. La colocalisation de cGAS au niveau des micro-noyaux permet l'activation du système immunitaire inné et participe à la sénescence (Glück et al., 2017; Harding et al., 2017; Mackenzie et al., 2017). Par ailleurs, il a été montré qu'une surexpression de Lamine B2 ou Lamine B1, protéines de l'enveloppe nucléaire, contrecarre cette activation. Il est proposé que l'augmentation des niveaux de lamines rigidifieraient l'enveloppe des noyaux et des micro-noyaux des cellules et empêcherait les fuites d'ADN dans le cytosol (Glück et al., 2017; Lohard et al., 2020).

3.2.1.3 Radiations ionisantes comme source d'ADN cytosoliques

Après rayons γ , il a été montré une production d'ADNs^{sb} cytosoliques dans des cellules cancéreuses 2 à 3 heures après irradiation à 10 Gray (Gy : représente l'unité de dose absorbée). Les ADN cytosoliques produits après IR seraient d'une taille avoisinant les 20 nucléotides. Ceux-ci seraient, partiellement au moins, produits par des facteurs de la réparation impliqués dans la résection tels que l'hélicase BLM ou la nucléase EXO1.

Néanmoins, dans cette étude, la production d'ADN cytosoliques radio-induite n'a pas été prise en compte. En effet, si après siRNA EXO1 ou BLM, la quantité générale d'ADN cytosoliques semble diminuée, aussi bien avant qu'après RI. Ce n'est pas précisé, mais l'induction donc « radio-induite » (ratio ADN cytosoliques radio-induits sur ADN cytosoliques endogènes) semble similaire à celle des cellules contrôles, non déplétées pour Exo1 et BLM. Il est donc possible de penser que EXO1 et BLM participent de manière générale à la production d'ADN cytosoliques, mais pas spécifiquement aux mécanismes de production d'ADN cytosoliques radio-induite. Un siDNA2 montre aussi une diminution de la production d'ADN cytosoliques après irradiation, mais moins importante qu'après siEXO1 ou siBLM. De plus, MRE11 et CtIP ne semblerait pas avoir de rôle majeur dans la production d'ADN cytosoliques radio-induite. De plus, le mécanisme sous-jacent de production d'ADN cytosoliques et son origine reste flou/ n'est pas élucidé (Erdal et al., 2017a). Par ailleurs, une autre étude montre un rôle opposé de BLM sur l'activation du système immunitaire inné. Dans cette étude, la déficience de BLM dans des cellules immortalisées de patients atteints du syndrome de Bloom, induit une augmentation de la production d'interférons. Ceux-ci sont produits via la voie STING, activée par une augmentation du nombre de micro-noyaux. Les auteurs de l'article ont proposé que dans le cas des cellules cancéreuses de l'étude de Erdal et al, BLM serait réaffectée à la production d'ADN cytosoliques, néanmoins ce mécanisme impliquant BLM reste à élucider (Gratia et al., 2019).

Des données montrent aussi une production d'ADN cytosoliques double brin après exposition aux rayons X à 8 Gy, répété 3 fois. A 20 Gy, celle-ci est impactée par l'activation de l'expression de TREX1, dégradant les ADN cytosoliques, déclenchée par une forte dose d'irradiation, dont le seuil est d'environ 12 Gy. Ce seuil dépend des différentes lignées cellulaires irradiées (lignées murines TSA, MCA38 et 4T1). Ainsi, irradier de manière répétée, 3 fois 8 Gy, est plus efficace en terme de production IFN de type I, qu'une seule dose forte à 20 Gy (Vanpouille-Box et al., 2017a).

Des données montrent une conséquence d'un défaut de RAD51 dans la production d'ADN cytosoliques radio-induite par des ions fer à haut LET. En effet, il y a augmentation de la production de cytokines inflammatoires dans des cellules déplétées pour RAD51 via la voie cGAS-STING. Cela est associé à une augmentation de la production d'ADN cytosoliques double et simple brin plus importante dans ces cellules après IR, notamment dans celles en phases

S/G2. Cette production d'ADN cytosoliques est inhibée après traitement à la mirin (inhibiteur de MRE11). Il a donc été proposé qu'après irradiation dans des cellules déplétées pour RAD51, la production d'ADN cytosoliques soit due à la dégradation des fourches de réplication médiée par MRE11, d'habitude protégées par RAD51 (Bhattacharya et al., 2017a). Néanmoins, dans (Erdal et al., 2017a), un siMRE11 n'inhibe pas la production d'ADN cytosoliques après IR. Les résultats quant à MRE11 observé dans (Bhattacharya et al., 2017a) sont peut-être exclusif à la déficience en RAD51. Cependant le type de radiation, la dose et le type cellulaire utilisés dans ces études sont différents. Ces résultats suggèrent qu'après radiations ionisantes, une part des ADN cytosoliques soient produits au niveau des fourches de réplication bloquées.

De plus, une autre étude montre que l'inhibition d'ATR est capable d'augmenter la production d'IFN de type I après radiations ionisantes. De manière intéressante, en cas de blocage G2/M après traitement au RO-3306 (inhibiteur CDK1), il y a un défaut de l'activation des voies d'inflammation. Cependant, cette étude met en avant une certaine disparité entre différentes cellules tumorales. Aussi, si certaines comme les 4T1 reposent sur la voie cGAS-STING pour l'induction d'une réponse inflammatoire, d'autre comme les HTC116 reposent plutôt sur l'activation de la voie MAVS. Cette activation de la voie des MAVS serait potentiellement due à la conversion d'ADN riche en AT en ARN simple ou double brin riche en AU, à l'aide de l'ARN polymérase III (Feng et al., 2020a). Cependant, aucune mesure directe d'ADN cytosoliques ou d'ARN cytosoliques n'a été réalisée dans cette étude.

Récemment, il a été montré que l'élévation des ROS après IR et l'oxydation de l'ADN mitochondrial (ADNmt) libéré dans le cytosol participe à la production d'IFN via la voie STING (Fang et al., 2020). D'autant plus que, *in vitro*, l'oxydation des ADN cytosoliques confère une résistance à TREX1 et améliore la production d'IFN via STING (Gehrke et al., 2013). Les mitochondries sont des organites des eucaryotes ayant conservées leur ADN au fil de l'évolution. L'ADNmt code pour diverses protéines jouant des rôles dans le système de respiration mitochondriale. La voie STING permet aussi la détection d'ADN cytosoliques d'origine mitochondriale ainsi que la production d'IFN (West et al., 2015).

3.2.1.4 Activation de la voie STING par les rétrotransposon

Lorsque de l'ADN viral se retrouve dans le cytoplasme des cellules, il déclenche l'activation de la voie cGAS-STING. Ces mécanismes de défense contre les pathogènes sont aussi utilisés en

cas de dérégulation des éléments transposables présents dans le génome des cellules. L'élément transposable LINE-1 (pour Long interspersed Nuclear Element) est le plus ubiquitaire et représente environ 17% du génome humain. Afin de maintenir ces éléments transposables réprimés, ces derniers sont hyperméthylés afin de maintenir leur promoteur inactif. Cependant, l'exposition à des stress exogènes comme l'irradiation est connue pour altérer le niveau de méthylation de LINE-1. Cela a pour conséquence une perte du contrôle épigénétique de LINE-1, et ainsi sa réactivation (Koturbash, 2017; Saleh et al., 2019).

Il a été montré l'implication de SLX4 et de MUS81 dans la régulation des niveaux de LINE1. En effet, il y a augmentation des niveaux d'IFN dans des cellules de patients FA déficientes pour SLX4. Il a été montré la présence d'ADN cytosoliques simple brin dans les cellules de patient déficientes pour SLX4 (cellules RA3331). La complémentation des cellules de patient FA avec SLX4 sauvage inhibe la production d'IFN et diminue les niveaux d'ADN cytosolique. A l'inverse, ce n'est pas le cas avec une forme mutée de SLX4 n'interagissant pas avec MUS81. Cela semble être associé à une augmentation des niveaux de d'ADNsb cytosoliques et l'activation de la voie cGAS-STING. Il a donc été proposé que SLX4 et MUS81 régulent négativement le niveau de LINE-1 en clivant ce dernier, de manière similaire à TREX1 (Brégnard et al., 2016a). Comment exactement SLX4 et MUS81 parviennent à limiter l'accumulation de LINE-1 dans le cytoplasme reste à déterminer. Cependant, il a été montré dans les cellules de cancers de la prostate que MUS81, un des partenaires de SLX4, à l'inverse, participe à la production d'ADN cytosoliques nécessaire à la production d'IFN (Ho et al., 2016a). Néanmoins, le type cellulaire utilisé (cellules de patients FA versus cellules de cancers de la prostate murines) est différent entre ces 2 études, ainsi que la technique de marquage d'ADN cytosoliques. Le rôle précis de MUS81 et de SLX4 reste encore à déterminer.

3.3 Impact de la détection des acides nucléiques en thérapie

3.3.1 Rôle anti-tumoral de la voie STING

Le système immunitaire inné joue un rôle important dans les mécanismes de surveillance du cancer. La voie STING permet de moduler le micro-environnement immunitaire de la tumeur et de recruter de cellules immunitaires. Elle joue ainsi le rôle de « pont » entre réponse innée et adaptative (Yu and Liu, 2021).

Les cellules tumorales sont usuellement accompagnées de dommages à l'ADN et d'une production d'ADN cytosoliques. Par exemple, il a été retrouvé de l'ADN télomérique extrachromosomal (ECTR pour ExtraChromosomal Telomere Repeat) dans le cytosol de cellules cancéreuses ALT. Ces ADN cytosoliques déclenchent la production d'IFN et inhibent la croissance cellulaire de fibroblastes normaux. Néanmoins, certaines lignées cancéreuses ALT présentent une voie STING défectueuse leur permettant d'ignorer les effets anti tumoraux de cette voie. En effet, l'expression de cGAS et STING est souvent éteinte dans les lignées ALT. C'est aussi le cas pour ATRX, un suppresseur du mécanisme ALT, qui a été montré dans cette étude comme participant avec STING à la détection des ADN cytosoliques (Chen et al., 2017).

L'ADN cytosolique présent dans les cellules tumorales où la voie STING est active, permet la production d'IFN. Cela permet l'activation de cellules T spécifiques aux tumeurs, leur infiltration dans la tumeur, ainsi que la maturation de cellules dendritiques. Les cellules dendritiques, macrophages et « natural killer » (NK) permettent l'élimination de cellules cancéreuses endommagées. Par la suite, les cellules dendritiques présentent des antigènes associés à la tumeur afin d'activer les cellules T CD8+ et éliminer les cellules cancéreuses (Yu and Liu, 2021).

La réponse immunitaire aux ADN cytosoliques a été montrée comme pouvant contribuer à la radiothérapie (RT). En effet, la RT a été montrée comme pouvant amorcer/activer le système immunitaire. Cela peut expliquer que des patients atteints de cancers métastatiques voient leurs métastases réduire de manière indirecte, alors que le lieu de l'irradiation était éloigné de ces dernières (effet abscopal) (Demaria et al., 2015a). Il a été montré que la voie STING et la production d'IFN de type 1 étaient essentielles afin de produire une réponse immunitaire adaptative suite à l'irradiation et permettre l'élimination de la tumeur (Burnette et al., 2011a; Deng et al., 2014a). Dans cette réponse, TREX1 qui permet la dégradation des ADN cytosoliques semble jouer un rôle central. En effet, une étude montre qu'une irradiation à trop forte dose induit une augmentation de l'expression de TREX1. Dès lors, la production d'IFN se trouve réduite et l'effet abscopal de l'irradiation aboli (Vanpouille-Box et al., 2017a).

Par ailleurs, il a été proposé que la voie STING participe à l'activité d'antimitotiques utilisés dans le traitement des cancers. En effet, le paclitaxel, un antimitotique perturbant les mitoses de cellules proliférantes, engendre la formation de micronoyaux. La rupture de l'enveloppe des micronoyaux ainsi formés active la voie STING. Cela permet d'amorcer l'apoptose dans les

cellules avoisinantes via l'induction paracrine de la protéine pro-apoptotique NOXA, favorisant l'effet antitumoral du paclitaxel *in vivo* (Lohard et al., 2020).

L'activation de la voie STING a aussi été montrée comme pouvant favoriser l'immunothérapie anti-cancéreuse. En effet, certaines cellules cancéreuses possèdent la capacité d'échapper au système immunitaire en exprimant à leurs surfaces des protéines possédant des fonctions immuno-suppressives. L'une d'entre elle est PD-L1, qui se fixe au récepteur PD-1 des cellules T, empêchant leur cytotoxicité. Une autre est B7, qui interagit avec CTLA-4 sur les cellules T et les empêche de s'activer. Des thérapies immunitaires (ou immuno-thérapies) ont été mises au point, à base d'anticorps anti PD-1, PD-L1 ou CTLA4, améliorant ainsi la réponse immunitaire et inhibant la croissance tumorale (Reisländer et al., 2020). Néanmoins certains patients possèdent des tumeurs peu immunogènes (dites tumeurs « froides ») et répondants moins à ce genre de traitement. La radiothérapie et l'activation de la voie STING ont été proposées comme permettant d'améliorer l'immunothérapie en amorçant les cellules T.

De plus, il a été suggéré que des exosomes dérivés de tumeurs (TEX pour Tumor-derived-exosome), possédant de l'ADN, puissent amorcer le système immunitaire. Les exosomes sont des microvésicules membranaires (30-100 nm) secrétés par tous types cellulaires, contenant une variété de molécules dont de l'ADN. Les TEX possèdent plus d'ADN que les exosomes de cellules normales et possèdent des antigènes de la cellule tumorale dont ils sont originaires. Ils peuvent être transférés à des cellules dendritiques, macrophages, NK et ainsi activer la réponse immunitaire. Après irradiation, les cellules cancéreuses produisent des TEX portant de l'ADNdb, dont la quantité est régulée par TREX1. Ainsi il a été montré que des TEX provenant de cellules irradiées possèdent une capacité anti-tumorale accrue. Ainsi l'injection de TEX provenant de cellules de patients irradiés pourrait permettre la mise au point d'un système de vaccination anti-tumorale (Diamond et al., 2018).

Finalement, en plus de moduler le micro-environnement tumoral, l'activation de la voie STING permet de moduler la sénescence. Par exemple la perte de cGAS facilite l'immortalisation de cellules primaires (Yang et al., 2017). La voie STING peut être à l'origine du SASP, qui permet de propager la sénescence de manière paracrine (Glück et al., 2017) et de recruter le système immunitaire qui participe à l'élimination des cellules sénescents. Ceci pourrait participer aux effets anti-tumoraux de la radiothérapie ou de la chimiothérapie.

De nombreuses données montrent donc que l'activation de la voie STING possède un effet anti-tumoral participant la surveillance des cellules cancéreuses, à l'amorçage du système immunitaire ainsi qu'à la sénescence. Dès lors, des agonistes et antagonistes pharmacologiques de STING ont été développés afin de moduler la réponse anti-tumorale. Des agonistes permettant l'activation de STING pourraient servir d'adjuvants afin d'améliorer l'efficacité de la radiothérapie, de la chimiothérapie et de l'immunothérapie (Amouzegar et al., 2021; Le Naour et al., 2020).

3.3.2 Rôle pro-tumoral de la voie STING.

A l'inverse de son rôle anti-tumoral, une inflammation chronique médiée par la voie STING pourrait former un terrain privilégié pour la cancérogenèse.

Il a été montré que la voie STING pouvait induire la formation de métastases cérébrales de cancer du poumon ou du sein. Les cellules cancéreuses produisent du cGAMP qui est transmis aux astrocytes. Ces derniers produisent alors des IFN de type 1, ainsi que du TNF α , qui favorise la prolifération des cellules cancéreuses et la résistance à des agents thérapeutiques (Chen et al., 2016). Aussi, la voie STING est capable d'activer une série de gènes impliqués dans la transition épithélio-mésenchymateuse (EMT) et favoriser la formation de métastases (Bakhoun et al., 2018).

Finalement, la voie STING peut être anti ou pro-tumorale selon le type et le contexte cellulaire. De plus, il est probable que les activations courtes ou chroniques de cette voie ont des conséquences différentes. En effet, une activation transitoire de STING possède une fonction anti-tumorale via la sécrétion d'IFN, l'induction d'une sénescence et la stimulation d'une surveillance immunitaire. En revanche, une stimulation chronique via la voie STING (et un microenvironnement inflammatoire) permettrait aux cellules cancéreuses de s'adapter et ainsi favoriser un développement tumoral, la résistance à la sénescence ou aux thérapies anti-tumorales.

Objectifs de thèse

De manière importante, des liens entre persistance de dommages à l'ADN et inflammation existent. En effet, des études récentes montrent que suite à un traitement génotoxique comme les rayonnements ionisants, ou suite à un stress réplicatif, ou encore de manière plus générale suite à des défauts de réponse aux dommages à l'ADN, il y a libération dans le cytosol de fragments d'ADN. Cet ADN cytosolique est retrouvé dans de nombreuses cellules cancéreuses et induit la production de cytokines inflammatoires par le biais de l'activation d'une voie du système immunitaire inné, la voie cGAS-STING. Un lien a été mis en évidence entre l'activation de la voie cGAS-STING et l'efficacité de la radiothérapie. En effet, la production d'interférons et de facteurs inflammatoires déclenche une réponse immunitaire innée permettant ainsi le recrutement de cellules immunitaires et la mort immune des cellules tumorales. De plus, la voie STING participerait aux effets abscopaux après irradiation et pourrait être à la base de nouvelles stratégies thérapeutiques de vaccinations anti-tumorales.

Des données du laboratoire et de la littérature montrent une production d'ADN cytosoliques après irradiation. La nature, l'origine et les mécanismes de production de ces fragments d'ADN sont encore mal connus à ce jour. Mon projet a pour objectif de caractériser les mécanismes impliqués dans la production d'ADN cytosoliques après irradiation ainsi que d'étudier leurs conséquences sur l'inflammation. Etant donné que le stress réplicatif est connu pour médier la production d'ADN cytosoliques, j'ai tout d'abord étudié l'implication d'un stress réplicatif radio-induit sur la production d'ADN cytosoliques. Je me suis ensuite intéressé à des acteurs moléculaires participant à la gestion des fourches de réplication bloquées. Enfin, j'ai étudié l'impact du stress oxydant radio-induit dans la production d'ADN cytosoliques après IR.

L'identification des acteurs responsables de la formation d'ADN cytosoliques présente des intérêts fondamentaux, pour caractériser les liens existants entre stabilité du génome, inflammation et immunité, mais aussi appliqués pour prédire ou potentialiser la réponse thérapeutique anti-cancéreuse.

II : Résultats

SLX4 and oxidative stress play a major role in cytosolic DNA production upon genotoxic stress.

Authors

Simon Willaume¹, Paul Wanschoor¹, Pauline Chaumerliat¹, Caroline Chabance-Okumura¹, Benoit Thézé¹, Sophie Barillé-Nion², Anna Campalans³, Pierre-Henri Gaillard⁴, Emilie Rass^{1, *} and Pascale Bertrand^{1, *}

Affiliations

¹ Université de Paris and Université Paris Saclay, INSERM, UMR Stabilité Génétique, Cellules Souches et Radiations, “DNA Repair and Ageing” Team, iRCM/IBFJ, DRF, CEA, F-92265, Fontenay-aux-Roses, France

² Université de Nantes, INSERM, UMR Adaptation au stress et échappement tumoral, CRCINA 8 quai Moncoussu 44007 Nantes, France

³ Université de Paris and Université Paris Saclay, iRCM/IBFJ, CEA, UMR Stabilité Génétique Cellules Souches et Radiations, “Genetic Instability Research” Team, F-92265, Fontenay-aux-Roses, France

⁴ Centre de Recherche en Cancérologie de Marseille, CRCM/UMR7258, Marseille, France

* To whom the correspondence should be addressed: **P. Bertrand or E. Rass**, Université de Paris and Université Paris Saclay, INSERM, iRCM/IBFJ, CEA, UMR Stabilité Génétique, Cellules Souches et Radiations, 18 route du Panorama, F-92265, Fontenay-aux-Roses, France

E-mail: pascale.bertrand@cea.fr; phone: 33(0)146548846 or emilie.rass@cea.fr; 33(0)146549295

Abstract

Ionizing radiation and DNA damage are known to activate the innate immune system through cytosolic DNA production and sensing. This activation participates to the efficiency of immune-induced death of tumoral cells upon radiotherapy. Yet, precise mechanisms of cytosolic DNA production after ionizing radiations are still unknown. The current study reports that, after IR, cytosolic DNA production mainly occurs during S/G2 phase, suggesting the contribution of a radio-induced replicative stress. SLX4, a key player in the maintenance of genome stability, which acts as a scaffold for multiple DNA repair proteins, is required for cytosolic DNA production and activation of TBK1/STAT1 pathway. The importance of radio-induced reactive oxygen species (ROS) and the role the glycosylase NTH1, in the production of cytosolic DNA after ionizing radiation is also highlighted. Additionally, the present data reveal a role of SLX4 in the generation of cytosolic DNA after oxidative stress. Finally, the involvement of SMARCAL1 and FANCM is shown, therefore likely implicating replication fork reversal in radio-induced cytosolic DNA production. Thus, we propose a new model for this cytosolic DNA production. ROS and subsequent DNA damages induce replicative stress, likely through the recognition of oxidative damage by NTH1 (and other glycosylase). This generates replication fork stalling and reversal by SMARCAL1 and FANCM. Finally, chromosomal DNA fragments is released in a SLX4 dependent manner.

Mechanistic understanding of ionizing radiation induced cytosolic DNA and type I interferon and apprehending how to modulate this signaling should help to increase the efficiency of radiotherapy.

Introduction

The genomic DNA of cells is challenged by endogenous and exogenous sources such as ionizing radiation (IR). Radiotherapy (RT) is used as a major treatment of cancer (Orth et al., 2014). IR leads to diverse type of DNA damage either by direct effect, or indirect through reactive oxygen species (ROS) generation (Sage and Shikazono, 2017). In case of deficient DNA damage response (DDR) or DNA repair, or in presence of overwhelming damages which challenge the genome integrity, the cell can undergo cell death or senescence (Ciccia and Elledge, 2010). Aside from producing lethal DNA damage that kill tumor cell, IR is known to activate the innate immune system through cytosolic DNA (cytoDNA) production leading to immune cell death (Deng et al., 2014b; Vanpouille-Box et al., 2017b). This could also account for radiotherapy efficiency and abscopal effect of IR and thus for metastases clearance (Vanpouille-Box et al., 2017b). However, despite the importance of its understanding, the molecular mechanism (and actors) involved in this radio-induced production is not identified.

The host immune system is essential for the defense against pathogens and cancers cells. The innate system is initiated by the recognition of molecular patterns, including cytosolic nucleic acid, either DNA and/or RNA. Their detection is carried by different DNA sensor, e.g. cGAS, which detect cytosolic DNA. Upon cytoDNA detection, cGAS catalyzes the production of cyclic GMP-AMP (cGAMP), triggering the STING pathway and the activation of a signaling cascade. Briefly, STING recruitment of TANK binding kinase-1 (TBK1) mediates phosphorylation of the transcription factor IRF3, which activates type 1 interferon (IFN) production. STING also allows the activation of the NF- κ B pathway (Hu and Shu, 2020b). The secreted type I IFNs interacts with their receptors and leads to the activation of the JAK-STAT (signal transducers and activators of transcription) pathway. Upon phosphorylation, the different STATs translocate to the nucleus and initiate the transcription of IFN-stimulated genes (ISGs) (Ivashkiv and Donlin, 2014b). Type I IFNs induce cell-intrinsic defense mechanisms, promote the activation of immune cells, and stimulate adaptive immune responses (Ivashkiv and Donlin, 2014b).

Aside from pathogens and exogenous sources, DNA damage persistence such as mediated by ATM deficiency, or replication stress leads to cytoDNA production and activation of immune responses (Coquel et al., 2018b; Härtlova et al., 2015b; Ho et al., 2016b). DNA replication progression is constantly challenged by numerous obstacles, such as DNA lesions, but also

collisions with active transcription mechanism, tightly bound protein–DNA complexes or unusual DNA structures. Replication stress is defined as the temporary slowing or stalling of replication forks (RFs) due to those encountered obstacles (Berti and Vindigni, 2016b). It can lead to the presence of self-derived DNA in the cytoplasmic compartment. Moreover, studies show that DNA damage in S phase contribute to cytoDNA production and to the subsequent IFN production (Parkes et al., 2017b). These cytoDNA were proposed to be produced, at least in part, during mechanisms allowing the DNA replication machinery to overcome DNA lesions or intrinsic RF obstacles. For example, SAMHD1 deficiency, such as mutation found in the inflammatory disease Aicardi-Goutières syndrome, leads to the RECQ1-dependent cleavage of stalled forks, inducing the release of DNA fragment into the cytosol and an inflammatory response (Coquel et al., 2018b).

One of the proposed models for rescuing stalled or damaged forks is based on a mechanism in which the replication forks reverse. RF reversal is the conversion of a stalled RF into a four-way junction by reannealing of parental strands and coordinated annealing of nascent strands. This mechanism is considered as a protection against nuclease degradation. The restart of the stalled or reversed RF is often conditioned to the action of DNA structure specific endonucleases (SSE) (Pasero and Vindigni, 2017). The SLX4 protein is a scaffold for a number of proteins with diverse functions in genome maintenance mechanisms ranging from homologous recombination repair (HR) and interstrand DNA cross-links (ICLs) repair to mechanisms that contribute to stalled or reversed RF processing. Many of SLX4 functions rely on the ability of SLX4 to interact with the SSEs: SLX1, MUS81-EME1, XPF-ERCC1 (altogether, called the SMX complex) (Guervilly and Gaillard, 2018b). Indeed, if SSE are key proteins of HR and stalled fork processing, uncontrolled DNA cleavage by SSEs is potentially dangerous for the integrity of the genome. Therefore, SSE are tightly controlled and their actions are coordinated by SLX4. Interestingly, the MUS81-EME1 complex, which cleaves branched DNA structures at stalled RF, has been implicated in cytoDNA production and STING activation in colorectal cancers cells (Ho et al., 2016b).

Cytosolic nucleic acid-sensing pathways not only mediate the immune defenses against pathogen infection but can also potentiate efficient antitumor immune responses. Indeed, the cGAS/STING pathway has been linked with radiotherapy efficiency. IR-mediated tumor regression was shown to depend on production of cytoDNA and inflammatory cytokines by

the STING pathway to induce tumor immune rejection (Burnette et al., 2011; Demaria et al., 2015; Deng et al., 2014; Vanpouille-Box et al., 2017).

While IR has also been shown to produce cytoDNA, the nature and origin of these DNA fragments are still debated. Evidences suggest that they might partially be generated by end resection enzymes such as EXO1 and BLM (Erdal et al., 2017b). Other data suggest that cytoDNA generated after IR, could originate from stalled RFs. Indeed, it has been reported that loss of RAD51 increases cytoDNA production after high LET radiation in cells in S/G2 phase, in a MRE11-dependant manner (Bhattacharya et al., 2017b). Additionally, inhibition of ataxia telangiectasia mutated rad3 related (ATR), which play an important role in replication stress response, potentiate interferon response after IR through cytoDNA sensing pathway (Feng et al., 2020b).

IR also generate DNA damage directly or indirectly through oxidizing reactive species. ROS can cause replicative stress, revealed by a decrease in RF speed and increase in RF reversion (Klattenhoff et al., 2017b; Wilhelm et al., 2016b; Zellweger et al., 2015b). Modified bases, such as 8-oxoguanines, do not block the RF progression and are mutagenic if they are not repaired before replication. Nonetheless, other oxidized bases induce distortion in the regular structure of DNA and are obstacle for the RF, leading to replication stress (Aller et al., 2007). Thymine glycol (TG) is the main oxidized base produced after IR and is a blocking damage for the RF (Lomax et al., 2013). Interestingly, DNA glycosylases involved in base excision repair (BER) of TG, such as NTH1, NEIL 1, NEIL2 and NEIL3 are found on replication forks by IPOND (Bjørås et al., 2017b). Expression of NEIL1 (Hazra et al., 2002), NEIL3 (Neurauter et al., 2012b) and NTH1 (Luna et al., 2000), is increased during S phase, suggesting a key role of these DNA glycosylases during replication.

It is crucial to understand the mechanism of IR- induced cytosolic DNA (and subsequent innate immunity), since it has been proposed to participate to radiotherapy efficacy.

In this study, we report that cytoDNA production after IR occurs mainly in S/G2/M phase, likely due to a radio-induced replicative stress. The radio-induced cytoDNA production and the subsequent activation of the innate pathway (TBK1-STAT pathway) is strictly dependent on SLX4, a key protein of genome maintenance. In addition, the present data also reveal the importance of radio-induced reactive oxygen species (ROS) and the role the glycosylase NTH1

in the production of cytosolic DNA. Finally, the involvement of FANCM and SMARCAL1 in this mechanism, highlight the fork reversal as an important structure in cytosolic DNA production.

Identifying new actors of IR-induced cytosolic DNA production should allow a proposal of new predictive markers of anti-tumor treatment efficacy and new anti-tumor strategies to modulate innate immunity in order to increase the efficiency of radiotherapy.

Results

Ionizing radiation induced cytosolic ssDNA production

First, we observed that the γ -irradiation of the mammalian cell, MCF7, induced the accumulation of ssDNA in the cytoplasm of the cells. As performed by McHugh group (Erdal et al., 2017b), MCF7 Cells were pre-labeled with bromodeoxyuridine (BrdU) for 1.5 cell cycles (36h) and subsequently treated with 10Gy of IR. BrdU foci were visualized by immunofluorescence using an anti-BrdU antibody. In these experiments, no denaturation step was performed prior to immunostaining, therefore, BrdU foci observed correspond to labeled cytosolic ssDNA (Fig 1A). Through automated analysis (home-made macro developed for this study) via the software Cellprofiler, the nucleus of the cells was excluded from analysis and only cytoplasmic foci were counted (Fig 1B). To confirm that BrdU-labeled foci represent the accumulation of DNA fragments, cells were treated with DNase1, which eliminated the staining (Fig. 1C). Additionally, co-staining of cells with COXIV, a marker of mitochondria, indicates that BrdU foci and mitochondria overlaps are negligible (Fig 1C). A 10Gy irradiation induced a significant increase of cytoDNA as soon as 1h after IR, with a peak at 2h, and a decrease to basal level over time (>8h) (Fig 1D, 1E). We confirmed as already reported (Erdal et al., 2017b) that the cell cycle distribution profile of the MCF7 cells was not affected by BrdU labeling (Fig 1F). These observations are consistent with other studies reporting that IR and DNA damage can induce the accumulation of ssDNA in the cytosol of the cells (Erdal et al., 2017b; Ho et al., 2016b; Pasero and Vindigni, 2017; Vanpouille-Box et al., 2017b).

Ionizing radiation induced cytosolic ssDNA production mainly during S/G2/M phase

Several studies indicate that cytoDNA could emerge from the restart of stalled RF by nuclease degradation (Coquel et al., 2018b; Ho et al., 2016b). Indeed, a replicative stress mediated by

a hydroxyurea (HU) treatment leads to a significant increase in cytoDNA production (Fig 2A, 2B). Thus, we hypothesized that cytoDNA production after IR could in part originate from a radio-induced replicative stress. To determine whether or not it was necessary for the cell to progress through S phase to generate cytoDNA, we blocked cells in G1 using mimosin, after BrdU incorporation (Fig 2B). G1 blockade of MCF7 cells leads to an inhibition of cytoDNA production after IR (Fig 2C, 2D). This suggests the necessity of the cell to pass through S phase to produce cytoDNA. To avoid potential chemical bias of mimosin treatment, we investigate the production of cytoDNA in asynchronous population, using geminin as a S/G2/M cycle phase marker. Therefore, geminin labelled cells are in S/G2/M phase and unlabeled cells are in G1. Our results were similar to those obtained after mimosin treatment. Indeed, cells in G1 phase produced significantly less cytoDNA after IR compared to cells in S/G2/M phase (Fig 2E, 2F). Our data suggest that a significant proportion of cytoplasmic self-DNA comes from cells in S/G2/M phase, suggesting an involvement of a radio-induced replicative stress.

[SLX4, a key player of cytosolic DNA production and innate pathway activation after IR](#)

To identify key actors of the cytosolic ssDNA fragments production, we investigated the role of SLX4, which is a key factor involved in genome maintenance, especially in stalled RF management. Thus, we analysed the role of SLX4 in cytoDNA production after IR using siRNA against SLX4 (siSLX4) or a non-targeting control siRNA (siCTRL). Depletion of SLX4 abolished cytoDNA production after IR (Fig 3A, 3B) without significantly altering cytoDNA basal levels (Fig S1A). Depletion levels were around 70% for SLX4 at the protein level (Fig 3C). The cell cycle distribution profile of the MCF7 cells was not affected by SLX4 depletion, suggesting that the inhibition of cytosolic radio-induced foci formation could not be explained by altered cell cycle progression (Fig 3D). To confirm those results, SLX4 Knockout (KO) cell lines were created using CRISPR-Cas9. SLX4 was successfully depleted compared to control cell lines (Puro) that received an empty vector (Fig 4A). Remaining staining in western blot is probably due to antibody background as seen in another study (Fregoso and Emernan, 2016). Radio-induced cytosolic DNA production was inhibited in SLX4 KO cells compared to control cell line (Fig 4B, 4C). Additionally, cytoDNA production after HU treatment was also partially reduced in SLX4 KO cells (Fig 4D). The cell cycle profile was not altered in SLX4 KO cells (Fig 4E). We also confirm the absence of IR-induced cytoDNA in SLX4 KO cells by an anti ssDNA antibody labelling

(without BrdU incorporation) (Fig S1B, S1C). Altogether, those results demonstrate that SLX4 is a major player in cytoDNA production after IR.

To further investigate the role of SLX4 in the innate immune response mediated by nucleic acid sensing, we studied the activation of the protein TBK1. TBK1 can be phosphorylated upon STING pathway activation. In control cells, TBK1 phosphorylation follows cytoDNA production kinetic. This was not observed in SLX4 KO cells (Fig 4F). Also phosphorylation of STAT1 (p-STAT1) is a well-known and efficient activation marker of type I IFN signaling. Our results show a significant increase in phosphorylation of STAT1 48h after IR in control cells (Fig 4G). In contrast, STAT1 phosphorylation was inhibited in SLX4 KO cells, which is concordant with the inhibition of cytoDNA production.

A recent study showed that upon IR, the MAVS-dependent RNA sensing pathway is activated (Feng et al., 2020b). Indeed, once in the cytoplasm of the cells, A-T rich DNA can be transcribed in dsRNA via the RNA pol III (Chiu et al., 2009b; Zevini et al., 2017b). We observed an increase in MDA5 protein levels, a dsRNA sensor, after IR in control cells, suggesting an activation of the MAVS pathway, which also leads to type I IFN production. MDA5 upregulation after IR was inhibited in SLX4 KO cells (Fig S1D). These results demonstrate that SLX4 plays a major role in cytoDNA production after IR and in innate pathway activation.

SLX4 partners are involved in cytosolic DNA production

SLX4 binds and regulates three important SSEs: SLX1, MUS81-EME1 and XPF-ERCC1 involved in stalled RF processing (Guervilly and Gaillard, 2018). To assess whether the role of SLX4 in cytoDNA production relies or not on its interaction with its associated SSEs, we used HeLa cells containing a Doxycycline (DOX) inducible wild type form of SLX4 (WT SLX4) or a mutant of SLX4 (SMX SLX4) that is unable to interact with the three SSE partners (Takedachi et al., 2020,). We confirmed our previous results using 5'3' UTR SLX4 siRNA on HeLa cells and the cytoDNA production after WT SLX4 induction with DOX was restored (Fig 5A, 5B). In contrast, expression of SMX SLX4 did not restore cytoDNA production after IR (Fig 5C, 5D). This demonstrates that cytoDNA production after IR relies in part on one of SLX4 SSEs partners. To examine which one of the SLX4 partners was responsible for cytoDNA production, we use siRNA to deplete either SLX1, MUS81 or ERCC1. Depletion levels were around 75% at the protein level for each tested proteins (Fig 6 A). We also checked that the depletion of SLX1, MUS81 and ERCC1 did not

affect the cell cycle profile of the cells (Fig S2A). Single depletion of SLX1, MUS81 and ERCC1 leads to intermediary inhibition of cytoDNA production (Fig 6B, 6C, 6D, 6E). The fact that no major partner was identified could be due to pathway redundancies between these proteins or a partial depletion by siRNAs. In addition, as IR leads to a variety of DNA damages, cytoDNA could emerge from diverse DNA structures managed by SLX4 and its partners and the depletion of only one actor would not prevent cleavage of all these structures.

Radio-induced ROS are necessary for cytosolic DNA production

ROS induce a multitude of oxidative modified bases in DNA and single strand breaks (Sies et al., 2017b) Considering that γ -rays are responsible for the generation of ROS by water radiolysis (Sage and Shikazono, 2017), we investigate the role of ROS in cytoDNA production.

Prior to IR, we treated the cells with N-acetyl-cystein (NAC), an antioxidant molecule also known for its anti-inflammatory effect (Turkmen et al., 2019). NAC pretreatment inhibited cytoDNA production after IR (Fig 7A, 7B). Additionally, cells exposed to oxygen peroxide (H_2O_2) showed increased levels of cytoDNA (Fig 7C, 7D). Consequently, we conclude that radio-induced ROS play a major role in cytoDNA production. Given the fact that ROS generate replicative stress, we explored the role of SLX4 in cytoDNA production after ROS. Our results demonstrate that SLX4 depletion also inhibited cytoDNA production mediated by H_2O_2 (Fig. 7E, 7F).

Among base lesions, TG is one of the most predominant base oxidative modifications after IR and is a blocking lesion for RF. To assess whether, BER was involved in cytoDNA production after IR, we examined the role of NTH1, one of the DNA glycosylases responsible for TG removal. NHT1 depletion by siRNA leads to a significant diminution of cytoDNA production after IR compared to siCTRL (Fig 8A, 8B, 8C). Cell cycle profiles were also not altered upon NTH1 depletion (Fig S2B). Interestingly, a study indicates that NTH1 overexpression leads to DNA damage and replicative stress, independently of its catalytic capacities to excise oxidized bases (Limpose et al., 2018). In our preliminary experiments, NTH1 overexpression, either WT or catalytic mutant, leads to increased cytoDNA production (Fig S3A, S3B). Consequently, the cytoDNA production after NTH1 deregulation that we observed could be due to replicative stress.

Replication fork reversal is involved in cytosolic DNA production

Additionally, ROS, alongside with other DNA damaging agent, are known to induce replicative stress and fork reversal (Zellweger et al., 2015b). SSE, coordinated by SLX4, might also cleave reversed fork, which will generate a one-ended DSB (Willaume et al., 2021b).

Consequently, radio-induce ROS could generate replicative stress and RF reversal which would be a structure recognized by SLX4 inducing cytoDNA production. Considering that DNA translocases such as SMARCAL1 or FANCM are involved in fork reversal, we depleted those proteins using siRNA and extinction levels were around 80% (Fig 9A). Our results show that the depletion of either SMARCAL1 or FANCM inhibited the cytoDNA production after IR (Fig 9B, 9C, 9D). Additionally, RAD51 depletion, which is also required for fork reversal, partially decreased cytoDNA production after IR (Fig 9A, 9E). Here again, cell cycle profiles were not altered after siRNA against these different proteins (Fig S2C). Altogether, those results show that proteins involved in RF reversal are required for cytoDNA production after IR.

Discussion

Cytosolic DNA production and ensuing innate immune response activation are one consequence of genomic instability such as replicative stress. Relieve from replicative stress involves specialized proteins that manage and process stalled RF. Among those, the SLX4 protein, implicated in various genome maintenance mechanisms, presents a specialized function as a recruitment platform for other key players including SSE responsible of stalled RFs processing.

In this study, we show that the cytoDNA production after IR occurs mainly in S/G2/M phase, likely due to a radio-induced replicative stress. The radio-induced cytoDNA production and the subsequent activation of the innate pathway is dependent on SLX4, a key protein of genome maintenance. We demonstrated the importance of its SSE partners in cytoDNA. As IR also generate DNA damage directly or indirectly through ROS, which can cause replicative stress, we studied their impact on cytoDNA production. Thus, we identified a key role of radio-induced OS for radio-induced cytosolic DNA. Depletion of SLX4 decreases the production of cytoDNA after H₂O₂, revealing a new role of SLX4 in management of OS. Our data highlight NTH1, a DNA glycosylase involved in BER and TG removal, as an actor of cytoDNA production

after IR and OS. Finally, we show the involvement in this mechanism of FANCM and SMARCAL1, highlighting the reversed fork as an important intermediate structure for cytosolic DNA production.

The importance of SLX4 in the maintenance of genome stability is supported by the fact that bi-allelic mutations of SLX4 (also known as FANCP) can cause Fanconi anemia (FA), a rare genetic disorder. Studies have also proposed a link between SLX4 and innate immune response. Especially, cytoDNA sensing was analysed in Fanconi Anemia patient cells (Brégnard et al., 2016b). This study showed that a SLX4 defect in RA3331 cells (FA patient cell line deficient for SLX4) leads to an increase inflammatory response. Decrease in cytoDNA levels is observed after transfection with WT SLX4 but not with a mutant form of SLX4, lacking interaction with MUS81. They identified part of this cytoDNA to be LINE-1 retrotransposon sequences, known to activate DNA sensing pathways. The authors therefore propose that MUS81-SLX4 complex cleaves and promotes retrotransposon degradation, thus limiting innate pathway activation and inflammatory response (Brégnard et al., 2016b). This differs from our study, as we did not observe an increase in cytoDNA basal level in two different cell lines. Divergence in cytoDNA detection methods and cell types, as well as in cell cycle progression, such as a G1 blockage, could account for such differences. In addition, another study shows that MUS81, a key partner of SLX4, mediates cytoDNA production in murine colorectal cancer cell line (Ho et al., 2016b).

We also demonstrate that ROS are essential for cytoDNA production after IR. Moreover, SLX4 is involved in cytoDNA production after H₂O₂ treatment, highlighting a new role of SLX4 in the management of DNA damage mediated by ROS. We show the participation of the NTH1 glycosylase in cytoDNA production. Interestingly, DNA glycosylases, including NTH1 and NEIL1, are found at the replication fork in IPOND and are probably involved in replicative associated BER (Bjørås et al., 2017b). The DNA glycosylases of NEIL family are capable of binding to oxidized base on ssDNA at replication fork, and are involved in a pre-replicative repair mechanism especially NEIL1. Indeed, during DNA replication, the exposed ssDNA formed is more susceptible to ROS attacks than the duplex DNA. NEIL1 possesses the ability to recognize modified base in ssDNA templates in a non-productive way, thus preventing DSB formation. In this model, NEIL1, which is induced in S-phase, detect the oxidative DNA lesion in front of the RF and signal the lesion. It has been proposed that this is followed by fork stalling,

regression and repair in the re-annealed duplex (Hegde et al., 2013b). NEIL1 also functionally associates with WRN and potentially SMARCAL1, presumably to coordinate fork regression or resolution (Popuri et al., 2010; Rangaswamy et al., 2017b). Therefore, the role of NEIL1 in radio-induced cytoDNA production should be investigated. In addition, in the model proposed by Hegde et al, NEIL2 can also serve as a backup when NEIL1 is missing, although NEIL2 is not upregulated in S/G2 phase in contrast to NEIL1. More recently, NEIL3 was shown to be induced in S/G2 phase and is able to excise oxidized base from single stranded DNA unlike NEIL1, which needs double stranded DNA (Albelazi et al., 2019b). Because of redundancies between DNA glycosylases, investigating their role in cytoDNA production could lead to a better understanding of their role at replication fork.

As we show that SMARCAL1 or FANCM depletion leads to cytoDNA inhibition, we hypothesize that ROS- and DNA glycosylases-mediated RF regression is an essential step for cytoDNA production after IR. Although NTH1 was excluded from Hedge's model due to its inability to bind ssDNA *in vitro*, NTH1 depletion in our cells leads to a significant decrease in cytoDNA production after IR. As NTH1 is also found on nascent DNA (Bjørås et al., 2017b) and its expression is increased in S phase (Luna et al., 2000), its role in replication-associated BER remains to be further explored. Even if fork reversal to promote repair might be mediated by NEIL1, the repair of the modified base on the re-annealed duplex after fork reversal could be done by the glycosylase with the most affinity for the lesion. Considering that some base modification such as TG, induce distortion in the double helix (Lomax et al., 2013), their repair might be needed before proceeding with SLX4 mediated restart of the replication fork. Thus reversed RF (mediate either by SMARCAL1 and/or FANCM) will be an important intermediate structure to allow the repair of these lesions and to protect the RF. Recently, a study showed an increase in cytoDNA sensing pathway after IR upon ATR inhibition (Feng et al., 2020b). ATR is known to negatively regulate SMARCAL1 and upon ATR inhibition, SMARCAL1 was proposed to freely reverse RF which would be converted into DSB by SLX4 and CtIP (Couch et al., 2013b). Thus, RF reversal could be involved in the increase of cytoDNA production after IR observed after ATR inhibition. Additionally, several other proteins such as ZRANB3 or HTLF participate to RF reversal, and their role in cytoDNA production remain to be elucidated.

Our results also show a decrease in cytoDNA production after IR following RAD51 inhibition. RAD51, aside from its role in strand invasion during HR, is known to participate to fork reversal

(Zellweger et al., 2015b). Although not essential for fork regression, a stable RAD51 filament is required for the reversed fork protection from degradation (Mijic et al., 2017a). Interestingly, RAD51 has been proposed to prevent DNA fragments from escaping the nucleus, thus preventing cytoDNA accumulation (Wolf et al., 2016b). It has been reported that RAD51 deficiency leads to an increase in cytoDNA production after IR in several cancer cell lines (Bhattacharya et al., 2017b). This study shown that loss of RAD51 induces cytoDNA production, mediated by MRE11 degradation, 8h after IR. In our study, RAD51 depletion leads to a decreased cytoDNA production after IR, but we did not check 8h after IR in our cell line. Moreover, in their study, the 2 Gy irradiation doses were made by High linear energy transfer (LET) iron particles, different from the low LET γ -ray we used. The incidence of LET on cytoDNA production has not been studied yet. High LET radiation are known to generate more complex DNA damage that are challenging for the cell to repair, compared to low LET (Georgakilas et al., 2013b). This difference in term of induced DNA damage complexity could be the reason behind our different results. Nonetheless, as SLX4 generate DSB at the RF, reversed or not, the role of MRE11 in our model should be also investigated.

Furthermore, RF reversal and SLX4 are needed for cytoDNA production after IR, but which precise structure is cleaved by SLX4 remains uncertain. CytoDNA could originate from a SLX4 mediated cleavage of the reversed fork itself, but the reversed fork might also be an intermediary structure. Indeed, reversed fork can be remodeled by helicases such as RECQ1, thus restoring the fork to its original state, allowing replication restart (Berti et al., 2013b). The subsequent cleavage by SLX4 of the newly restored RF could be the source of cytoDNA.

Altogether, the results of this study allow us to propose a model that presents the interplay between SLX4 and immune signaling in response to DNA damage, replication stress and ROS (Fig. 10). IR, aside from generating direct DNA lesions, also generate ROS that induce replicative stress. Oxidized bases and DNA glycosylases of the NEIL family induce RF stalling and reversal mediated by SMARCAL1, FANCM (and possibly with the implication of RAD51). NTH1 or another glycosylase, once on a re-annealed double stranded sequence, would then proceed to the repair of the oxidative lesion mediated by the BER pathway. Removal of the modified base would allow the processing of the stalled RF to resume. The reversal of the fork is a key step for cytoDNA production mediated by at least one of the SMX SSE, coordinated by SLX4. This reversed fork is either the structure directly cleaved by SLX4 and its SSEs, or an

intermediary of mechanism that will remodel the fork in a different structure also cleaved by SLX4.

In summary, we Identified new actors of IR-induced cytosolic DNA production and thus potential modulators of innate immunity. Thus, our results improve our understanding on the molecular mechanisms of innate immune activation upon anti-tumor treatments and would allow to propose new predictive markers and new anti-tumor treatment strategies.

Acknowledgments

General: We acknowledge XXX for helpful discussions and their comments on the manuscript.

All data needed to evaluate the conclusions in the paper are present in the paper and/or the Supplementary Materials.

Funding: This work was supported by the Radiobiology segment' CEA grant, EDF grant, Ligue Nationale Contre le Cancer (Ile de France committee), Association for Research against Cancer (Fondation ARC) and INSERM house funding. SW is recipient of CEA DRF "Phare" fellowship and of a Fondation ARC fellowship. PW is recipient of a Ligue Nationale Contre le Cancer fellowship.

Authorship contributions: SW, ER and PB wrote the paper. PB, ER and SW conceived the experiments. SW performed the majority of the experiments. PW, PC and CC-O performed some experiments. BT developed several in-house scripts for imaging analysis. SB-N produces SLX4 KO cell line. AC and P-HG provided their expertise and biological reagents.

Competing interests: The authors declare that they do not have a conflict of interest or any competing financial interests.

Figures and legends

Figure 1: IR increase the level of cytosolic ssDNA.

(A) Experimental representation of cytosolic ssDNA labeling with BrdU. (B) Representation of automated cytoDNA foci counting via Cellprofiler software. Nuclei are segmented and a region of interest is extended allowing cytoplasm identification. (C) Cytosolic DNA staining (green) after DNase 1 treatment (left) and co-staining with the mitochondrial protein COX IV (red) (right). (D) Representative confocal images of MCF7 cells with BrdU preincorporated for 36h (1.5 cell cycles) subjected to 10Gy IR. Cells were stained for DNA (DAPI; blue), BrdU (green), scale bar 10 μ M. (E) Quantification of BrdU foci per cytoplasm at the indicated time points following 10 Gy of IR, n=12. Paired T-test, **p<0.01, ***p<0.001. (F) Cell cycle analysis on MCF7 upon BrdU (10 μ M 36h) treatment or not, n=1

Figure 2: Cytosolic DNA production occurs mainly in S/G2/M phase cells.

(A) Left, Representative confocal images of MCF7 treated with HU 1mM for 24h; Cells were stained for DNA (DAPI; blue), BrdU (green), scale bar 10 μ M. Right, quantification of BrdU foci per cytoplasm following HU treatment or not, n=12. (B) Cell cycle analysis on MCF7 upon HU (1mM 24h) or mimosin (500 μ M, 24h) treatment or not. (C) Representative confocal images of MCF7 cells after mimosin synchronization or not; subjected to 10Gy IR; Cells were stained for DNA (DAPI; blue), BrdU (green), scale bar 10 μ M. (D) Quantification of BrdU foci per cell cytoplasm at the indicated time points following 10Gy of IR with or without mimosin synchronization, n=5. Paired T-test, **p<0.01, ***p<0.001. (E) Representative confocal images of asynchronous MCF7 cells subjected to 10Gy IR; Cells were stained for DNA (DAPI; blue), BrdU (green) and Geminin (red), scale bar 10 μ M. (F) Quantification of cytoDNA induction at the indicated time points following 10 Gy of IR, in Geminin-stained cell (S/G2/M) or not (G1), n= 5. Welch's T test, *p<0.05, **p<0.01

Figure 3: Role of SLX4 in cytosolic DNA production.

(A) Representative confocal images of MCF7 cells subjected to 10Gy IR; Cells were pretreated with siRNA against SLX4 or a non-targeting pool (siCTRL) for a total of 48 h before irradiation. Cells were stained for DNA (DAPI; blue), BrdU (green), scale bar 10 μ M. (B) Quantification of cytoDNA induction at the indicated time points following 10 Gy of IR treated of not with siSLX4,

n=8. (C) Western Blot images and quantification to verify knock-down of SLX4, n=6. (D) Cell cycle analysis on MCF7 after siSLX4 or not, n=1. Welch's T test, *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001

Figure 4: SLX4 KO inhibits cytoDNA production and inflammatory pathway activation.

(A) Western Blot images and quantification to verify knock-out of SLX4, n=4. (B) Representative confocal images of control (Puro) or SLX4 KO MCF7 cells subjected to 10Gy IR. Cells were stained for DNA (DAPI; blue), BrdU (green), scale bar 10µM. (C) Quantification of cytoDNA induction at the indicated time points following 10 Gy of IR, in control cell (puro) or SLX4 KO cells, n=5. (D) Quantification of cytoDNA induction at the indicated time points after HU treatment (1mM, 24h), in control cell (puro) or SLX4 KO cells, n=3. (E) Cell cycle analysis on MCF7 control or SLX4 KO N=1. (F,G) Western Blot quantification of pTBK1 and pSTAT1 level upon 10Gy at the indicated time point, n=2 and 4 respectively. Welch's T test, *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001

Figure 5: SLX4 binding SSEs are involved in cytoDNA production after IR

(A) Representative confocal images of HeLa to 10Gy IR. Cells were treated with siSLX4 5'3' UTR or siCTRL 48h our before IR. WT SLX4 is induced with 10nM of doxycycline (DOX) 48h before IR. Cells were stained for DNA (DAPI; blue), BrdU (green), SLX4 HA tagged (red) scale bar 10µM. (B) Quantification of cytoDNA induction at the indicated time points following 10 Gy of IR, in cells treated with 5'3' UTR siSLX4 or CTRL, with DOX treatment or not, n=3. (C) Representative confocal images of HeLa to 10Gy IR. Cells were treated with siSLX4 5'3' UTR or siCTRL 48h our before IR. WT SMX SLX4 is induced with 10nM of doxycycline (DOX) 48h before IR. Cells were stained for DNA (DAPI; blue), BrdU (green), SLX4 HA tagged (red) scale bar 10µM. (D) Quantification of cytoDNA induction at the indicated time points following 10 Gy of IR, in cells treated with 5'3' UTR siSLX4 or CTRL, with DOX treatment or not, n=3

Figure 6: Individual roles of SSE coordinated by SLX4 in the cytosolic DNA production.

(A) Western Blot images and quantification to verify knock-down of MUS81, ERCC1 and SLX1, n=5, 3, 5, respectively. (B) Representative confocal images of MCF7 cells subjected to 10Gy IR. Cells were pretreated with siRNA against different SSE or a non-targeting pool (siCTRL) for a total of 48 h before irradiation. Cells were stained for DNA (DAPI; blue), BrdU (green), scale bar 10µM. (C, D, E) Quantification of cytoDNA induction at the indicated time points following

10Gy of IR treated of not with siRNA targeting MUS81, ERCC1 or SLX1, n= 5, 4, 6, respectively. Welch's T test, *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001

Figure 7: Role of the radio-induced oxidative stress in cytoDNA production.

(A) Representative confocal images of MCF7 cells subjected to 10Gy IR; Cells were pretreated with N-acetyl-cysteine (NAC, 100 μ M) for 2h before irradiation. Cells were stained for DNA (DAPI; blue), BrdU (green), scale bar 10 μ M. (B) Quantification of cytoDNA induction at the indicated time points following 10Gy of IR, pretreated or not with NAC, n= 5. (C) Representative confocal images of MCF7 cells subjected to 10Gy IR; Cells were pretreated with oxygen peroxide (H₂O₂, 1mM) for 2h before irradiation. Cells were stained for DNA (DAPI; blue), BrdU (green), scale bar 10 μ M. (D) Quantification of cytoDNA induction at the indicated time points following 10Gy of IR, pretreated or not with H₂O₂, n= 7. (E) Representative confocal images of MCF7 cells subjected to oxygen peroxide (H₂O₂, 1mM) for a total of 2h before. Cells were treated with siSLX4 or siCTRL 48h before H₂O₂ treatment Cells were stained for DNA (DAPI; blue), BrdU (green), scale bar 10 μ M (F) Quantification of cytoDNA induction treated or not with H₂O₂, with siSLX4 or siCTRL, n=3. Welch's T test, *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001

Figure 8: SLX4 depletion inhibits cytoDNA production after oxidative stress

(A) Representative confocal images of MCF7 cells subjected to 10Gy IR; Cells were pretreated with siRNA against NTH1 or a non-targeting pool (siCTRL) for a total of 48 h before irradiation. Cells were stained for DNA (DAPI; blue), BrdU (green), scale bar 10 μ M. (B) Quantification of cytoDNA induction at the indicated time points following 10Gy of IR treated of not with siRNA targeting NTH1, n=6. (C) Western Blot images and quantification to verify knock-down of NTH1, n=6. Welch's T test, *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001

Figure 9: Role of different actors of replication fork reversal in cytoDNA production

(A) Western Blot images and quantification to verify knock-down of SMARCAL1, FANCM and RAD51, n=3, 1, 3, respectively. (B) Representative confocal images of MCF7 cells subjected to 10Gy IR. Cells were pretreated with siRNA against different actors of fork reversal or a non-targeting pool (siCTRL) for a total of 48 h before irradiation. Cells were stained for DNA (DAPI; blue), BrdU (green), scale bar 10 μ M. (C, D, E) Quantification of cytoDNA induction at the indicated time points following 10Gy of IR treated of not with siRNA targeting SMARCAL1, FANCM and RAD51, n=4. Welch's T test, *p<0.05, **p<0.01,

Figure 10: Model of cytosolic DNA production after IR

See text for more information.

[Supplemental figures and legends](#)

Figure S1: SLX4 KO inhibits cytoDNA production and inflammatory pathway activation.

(A) Quantification of cytoDNA induction following siRNA against SLX4 or a non-targeting pool (siCTRL) for a total of 48 h (B) Representative confocal images of control (Puro) or SLX4 KO MCF7 cells subjected to 10Gy IR. Cells were stained for DNA (DAPI; blue), ssDNA (green), scale bar 10 μ M. (C) Quantification of cytoDNA induction at the indicated time points following 10 Gy of IR, in control cell (puro) or SLX4 KO cells, n=2. (D) Western Blot quantification of MDA5 level upon 10Gy at the indicated time point, n=5. Welch's T test, *p<0.05, **p<0.01,

Figure S2: Cell cycle analysis after different siRNA.

(A) Cell cycle analysis on MCF7 after siRNA against MUS81, ERCC1, SLX1 or CTRL, n=1. (B) Cell cycle analysis on MCF7 after siNTH1 or CTRL, n=1. (C) Cell cycle analysis on MCF7 after siRNA against SMARCAL1, FANCM, RAD51 or CTRL, n=1.

Figure S3: Overexpression of NTH1 leads to cytoDNA induction.

(A) Representative confocal images of MCF7 cells. Cells were pretreated with either GFP WT NTH1 plasmid, GFP mut NTH1, or an empty vector (EV) as control, 48h before imaging. Cells were stained for DNA (DAPI; blue), BrdU (red). The GFP signal is in green for WT NTH1 or mut NTH1. (B) Quantification of cytoDNA induction in MCF7 cells, transfected with an empty vector (EV), or a plasmid containing either GFP WT NTH1 or GFP mut NTH1, n=1.

Material and Methods

Cell lines and culture procedures

Cancer cell lines MCF7 were a gift from Dr. Germain Rousselet. MCF7 cells were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 10% (v/v) fetal calf serum, and penicillin (200 IU/ml) at 37°C with 5% CO₂. HeLa cells were a gift from Dr. Pierre Henry Gaillard and are characterized in (Takedachi et al., 2020). HeLa cells were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 10% (v/v) Tetracycline free fetal calf serum and penicillin (200 IU/ml) at 37°C with 5% CO₂. HeLa were cultured with 100 µg/ml hygromycin B and 2 µg/ml blasticidine to maintain the genomic FRT site and drugs were removed for the experiment. For BrdU incorporation, cells were incubated with 10µM BrdU (10 280 879 001, sigma) for 1.5 cell cycle and returned to BrdU-free medium before irradiation. For HU and H₂O₂ (Sigma) treatment, cells were incubated with 1mM HU or H₂O₂ for 24h or 2h respectively. SLX4-WT or SLX4-SMX induction on HeLa cells was made with 10ng/mL doxycycline.

Knock-out cells line

The CRISPR Cas9 -induced knock-out (KO) cell lines were kindly made by Dr Sophie Barril -Nion. For the CRISPR Cas9-induced knock-out (KO) cell lines, single guide (sg) RNA sequences targeting human SLX4 genes were designed using the CRISPR design tool (<http://crispor.tefor.net>). The following guide sequence was designed: TTCTTGCTGGTTACCCGTCT. The guide sequence described was cloned in the plentiCRISPRV2 vector (Addgene plasmid #52961). Cells were selected using 1µg/ml puromycin and KOs were confirmed by immunoblot analysis.

Irradiation and dosimetry

Irradiations were performed on a GSRD 1 irradiator from GSM Company. It is a self-shielded irradiator with four sources of 137 C sium with a total activity around 180.28 TBq in March 2014 and which emits gamma ray. Sample were irradiated at different one single doses: 10Gy with an output 1.6 Gy/min take the radioactive decrease into account. Samples were irradiated in box with 6 wells or 96 wells plates. Prior to irradiate, dosimetry was performed. A cylindrical ionizing chamber 31010 by PTW was used as the recommendation of the AAPM'S TG-61. This ionizing chamber has a cavity of 0.125 cm³ calibrated in 137 Cesium air kerma free

in air at the PTB reference facility number 210382401. The polarity and the ion recombination were measured for this 137-cesium source. Each measurement was corrected by the KTP factor to take the variation of temperature and atmospheric pressure into account.

Transfection

For the various experiments, 80×10^3 (MCF7) or 40×10^3 (HeLa) cells were plated 2 days before transfection. For siRNA, cells were transfected with 10 μ M specific siRNA to different genes (ON-TARGET plus SMARTpool, Dharmacon) or with non-targeting control pool (Dharmacon) using INTERFERin (Polyplus Transfection) under conditions specified by the manufacturer. For NTH1 overexpression, MCF7 cells were transfected using the jetPEI transfection reagent under the conditions specified by the manufacturer (polyplus transfection). The GFP WT NTH1 and GFP mut NTH1 plasmid were a kind gift from Dr. Anna Campalans. siSLX4 UTR targeting the 5'UTR and 3'UTR of SLX4 consists of a mix of two siRNAs:

SLX4 UTR87 (GCACCAGGUUCAUAUGUAUdTdT)

SLX4 UTR7062 (GCACAAGGGCCCAGAACAAdTdT)

In addition, siRNA for SLX4 (L-014895-00-0005) FANCM (L-021955-00-0005), SMARCAL1 (L-013058-00-0005), SLX1A (M-1907000-00-0005), NTH1 (L-009345-00-0005), MUS81 (L-016143-01-0005), ERCC1 (L-006311-00-0005), RAD51 (L-003530-00-0005)) and the non-targeting pool (D-001810-10-50) were purchased from Dharmacon.

Immunofluorescence

Forty-eight hours after siRNA transfection, MCF7 or HeLa grown on glass coverslips were fixed in 2% (w/v) paraformaldehyde for 20 min and washed three times in PBS before a permeabilization step with 0.5% Triton X-100 in PBSw for 15 min. After permeabilization, saturation was performed with PBSw-BSA 2% containing 0.05% Tween 20 for 1 hour at room temperature. Cells were then immunolabeled in non-denaturing condition using the following antibodies diluted with PBSw-1%BSA containing 0.05% Tween 20 for 90 min at room temperature: anti BrdU (347580, clone B44, BD Bioscience); Anti ssDNA (MAB3868, Millipore); Anti Geminin (52508s, cellsignalling); anti HA tag C29F4 (3724, cell signaling), anti COXIV (Cell signaling, 4850s), anti-double stranded DNA (Abcam, AB27156). After 3 washes with PBSw, cells were then probed with a secondary anti-mouse or anti-rabbit antibody coupled to Alexa Fluor 488 or 594, respectively (Life Technologies) followed by 3 washes with PBSw.

Counterstaining was performed with 4',6- diamidino-2-phenylindole (DAPI; 1 mg/ml) in PBSwo. After 3 washes, slides were mounted with fluorescent mounting medium (Fluoromount-G, Southern Biotech).

Synchronization and cell cycle analysis

For mimosin synchronization, cells were treated with 500 μ M mimosin (Sigma) for 24h after BrdU incorporation. Cells were exposed to 10 μ M EdU for 1h before fixation with PFA 4%. Click-it chemistry were done using Click-i EdU Alexa Fluo 488 Flow Cytometry Assay Kit (Invitrogen, C10420) following standard protocol. DNA was stained using FxCycle Far Red Stain (Invitrogen, F10348) following standard protocol specified by the manufacturer. Acquisition were made on the FACS CANTO II (BD bioscience).

Western Blotting analysis

Cells were lysed in a buffer containing Tris 1M pH7.5, NaCl 600mM, NP40 0.5%, EDTA 0.1mM and protease and phosphatase inhibitors. We resolved the denatured protein extracts (25 to 50 mg) using 10% SDS–polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) or 3 to 8% NuPAGE tris-acetate gels, transferred the proteins onto a nitrocellulose membrane, and probed the membrane with the following primary antibodies: FANCM (Novus, NBP2-50418); SMARCAL1 (Cell signaling, 44717s); SLX4 (Bethyl, A302-270A); MUS81 (Novus, NB 100-2064); ERCC1 (Novus, NB 100-117); SLX1 (proteintech, 21151-1-ap); RTEL1 (Novus, NBP2-22360); MDA5 (Cell Signaling, 5321S); NTH1 (Abcam, 48508); Actin (thermos A2066); Vinculine (Abcam AB18058); PSTAT1, (Cell signaling, 9177s); STAT1 (Cell signaling, 9172s); PTBK1, (Cell signaling, 5483s), TBK11 (Cell signaling, 3504s). Immunoreactivity was visualized with secondary fluorescent antibody alexa fluor plus anti Rabbit 700/800 (A32734/A32735) and anti mouse (A32729/A32730). Fluorescent signals were acquired with Odyssey imager (LI-COR Biosciences) and quantified with Image Studio software (LI-COR Biosciences).

Microscope equipment and digital microscopy image analyses

Images were obtained on a confocal spinning Disc, with Yokogawa W1 head, using 60x Nikon oil immersion objective and a Prime95 camera. Raw data images acquired with linear and full display range. All digital images were processed in batch with the CellProfiler software V2.2. The segmentation of each structure of interest (i.e., nuclei, cytoplasm and foci) was based on

an adaptive labeling–dependent threshold. The consistency of the automatic segmentation was controlled visually on the original images supplemented with the outlines of identified objects. Measurement data for each object were collected by CellProfiler during the pipeline run and then further analyzed using the KNIME analytics platform for calculation of per cytoplasm or nuclei parameters.

Statistical analysis

For all immunofluorescence experiments, a minimum of 100 cells was scored per time point and median from at least three independent experiments. Data are expressed as median \pm SEM. Statistical analyses [unpaired t test or Welch's t test] were performed using GraphPad Prism 9.1 (GraphPad Software Inc.). $P < 0.05$ is represented by one asterisk, $P < 0.01$ is represented by two asterisks, and $P < 0.001$ is represented by three asterisks.

References

- Albelazi, Martin, Mohammed, Mutti, Elder, 2019. The Biochemical Role of the Human NEIL1 and NEIL3 DNA Glycosylases on Model DNA Replication Forks. *Genes* 10, 315. <https://doi.org/10.3390/genes10040315>
- Berti, M., Ray Chaudhuri, A., Thangavel, S., Gomathinayagam, S., Kenig, S., Vujanovic, M., Odreman, F., Glatter, T., Graziano, S., Mendoza-Maldonado, R., Marino, F., Lucic, B., Biasin, V., Gstaiger, M., Aebersold, R., Sidorova, J.M., Monnat, R.J., Lopes, M., Vindigni, A., 2013. Human RECQ1 promotes restart of replication forks reversed by DNA topoisomerase I inhibition. *Nat Struct Mol Biol* 20, 347–354. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2501>
- Berti, M., Vindigni, A., 2016. Replication stress: getting back on track. *Nature Structural & Molecular Biology* 23, 103–109. <https://doi.org/10.1038/nsmb.3163>
- Bhattacharya, S., Srinivasan, K., Abdisalaam, S., Su, F., Raj, P., Dozmorov, I., Mishra, R., Wakeland, E.K., Ghose, S., Mukherjee, S., Asaithamby, A., 2017. RAD51 interconnects between DNA replication, DNA repair and immunity. *Nucleic Acids Research* 45, 4590–4605. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx126>
- Bjørås, K.Ø., Sousa, M.M.L., Sharma, A., Fonseca, D.M., Sjøgaard, C.K., Bjørås, M., Otterlei, M., 2017. Monitoring of the spatial and temporal dynamics of BER/SSBR pathway proteins, including MYH, UNG2, MPG, NTH1 and NEIL1–3, during DNA replication. *Nucleic Acids Research* 45, 8291–8301. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx476>
- Brégnard, C., Guerra, J., Déjardin, S., Passalacqua, F., Benkirane, M., Laguet, N., 2016. Upregulated LINE-1 Activity in the Fanconi Anemia Cancer Susceptibility Syndrome Leads to Spontaneous Pro-inflammatory Cytokine Production. *EBioMedicine* 8, 184–194. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2016.05.005>
- Burnette, B.C., Liang, H., Lee, Y., Chlewicki, L., Khodarev, N.N., Weichselbaum, R.R., Fu, Y.-X., Auh, S.L., 2011. The Efficacy of Radiotherapy Relies upon Induction of Type I Interferon-Dependent Innate and Adaptive Immunity. *Cancer Research* 71, 2488–2496. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-2820>
- Chiu, Y.-H., MacMillan, J.B., Chen, Z.J., 2009. RNA Polymerase III Detects Cytosolic DNA and Induces Type I Interferons through the RIG-I Pathway. *Cell* 138, 576–591. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.06.015>
- 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>
- Coquel, F., Silva, M.-J., Técher, H., Zadorozhny, K., Sharma, S., Nieminuszczy, J., Mettling, C., Dardillac, E., Barthe, A., Schmitz, A.-L., Promonet, A., Cribier, A., Sarrazin, A., Niedzwiedz, W., Lopez, B., Costanzo, V., Krejci, L., Chabes, A., Benkirane, M., Lin, Y.-L., Pasero, P., 2018. SAMHD1 acts at stalled replication forks to prevent interferon induction. *Nature* 557, 57–61. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0050-1>
- Couch, F.B., Bansbach, C.E., Driscoll, R., Luzwick, J.W., Glick, G.G., Betous, R., Carroll, C.M., Jung, S.Y., Qin, J., Cimprich, K.A., Cortez, D., 2013. ATR phosphorylates SMARCA1 to prevent replication fork collapse. *Genes & Development* 27, 1610–1623. <https://doi.org/10.1101/gad.214080.113>
- Demaria, S., Golden, E.B., Formenti, S.C., 2015. Role of Local Radiation Therapy in Cancer Immunotherapy. *JAMA Oncol* 1, 1325. <https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2015.2756>
- Deng, L., Liang, H., Xu, M., Yang, X., Burnette, B., Arina, A., Li, X.-D., Mauceri, H., Beckett, M., Darga, T., Huang, X., Gajewski, T.F., Chen, Z.J., Fu, Y.-X., Weichselbaum, R.R., 2014.

- STING-Dependent Cytosolic DNA Sensing Promotes Radiation-Induced Type I Interferon-Dependent Antitumor Immunity in Immunogenic Tumors. *Immunity* 41, 843–852. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2014.10.019>
- Erdal, E., Haider, S., Rehwinkel, J., Harris, A.L., McHugh, P.J., 2017. A prosurvival DNA damage-induced cytoplasmic interferon response is mediated by end resection factors and is limited by Trex1. *Genes & Development* 31, 353–369. <https://doi.org/10.1101/gad.289769.116>
- Feng, X., Tubbs, A., Zhang, C., Tang, M., Sridharan, S., Wang, C., Jiang, D., Su, D., Zhang, H., Chen, Z., Nie, L., Xiong, Y., Huang, M., Nussenzweig, A., Chen, J., 2020. ATR inhibition potentiates ionizing radiation-induced interferon response via cytosolic nucleic acid-sensing pathways. *EMBO J* 39. <https://doi.org/10.15252/emboj.2019104036>
- Fregoso, O.I., Emerman, M., 2016. Activation of the DNA Damage Response Is a Conserved Function of HIV-1 and HIV-2 Vpr That Is Independent of SLX4 Recruitment. *mBio* 7, e01433-16, [/mbio/7/5/e01433-16.atom](https://doi.org/10.1128/mBio.01433-16). <https://doi.org/10.1128/mBio.01433-16>
- Georgakilas, A.G., O'Neill, P., Stewart, R.D., 2013. Induction and Repair of Clustered DNA Lesions: What Do We Know So Far? *Radiation Research* 180, 100–109. <https://doi.org/10.1667/RR3041.1>
- Guervilly, J.-H., Gaillard, P.H., 2018. SLX4: multitasking to maintain genome stability. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* 53, 475–514. <https://doi.org/10.1080/10409238.2018.1488803>
- Härtlova, A., Erttmann, S.F., Raffi, F.A.M., Schmalz, A.M., Resch, U., Anugula, S., Lienenklaus, S., Nilsson, L.M., Kröger, A., Nilsson, J.A., Ek, T., Weiss, S., Gekara, N.O., 2015. DNA Damage Primes the Type I Interferon System via the Cytosolic DNA Sensor STING to Promote Anti-Microbial Innate Immunity. *Immunity* 42, 332–343. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2015.01.012>
- Hazra, T.K., Izumi, T., Boldogh, I., Imhoff, B., Kow, Y.W., Jaruga, P., Dizdaroglu, M., Mitra, S., 2002. Identification and characterization of a human DNA glycosylase for repair of modified bases in oxidatively damaged DNA. *PNAS* 99, 3523–3528. <https://doi.org/10.1073/pnas.062053799>
- Hegde, M.L., Hegde, P.M., Bellot, L.J., Mandal, S.M., Hazra, T.K., Li, G.-M., Boldogh, I., Tomkinson, A.E., Mitra, S., 2013. Prereplicative repair of oxidized bases in the human genome is mediated by NEIL1 DNA glycosylase together with replication proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110, E3090–E3099. <https://doi.org/10.1073/pnas.1304231110>
- Ho, S.S.W., Zhang, W.Y.L., Tan, N.Y.J., Khatoor, M., Suter, M.A., Tripathi, S., Cheung, F.S.G., Lim, W.K., Tan, P.H., Ngeow, J., Gasser, S., 2016. The DNA Structure-Specific Endonuclease MUS81 Mediates DNA Sensor STING-Dependent Host Rejection of Prostate Cancer Cells. *Immunity* 44, 1177–1189. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2016.04.010>
- Hu, M.-M., Shu, H.-B., 2020. Innate Immune Response to Cytoplasmic DNA: Mechanisms and Diseases. *Annu. Rev. Immunol.* 38, 79–98. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-070119-115052>
- Ivashkiv, L.B., Donlin, L.T., 2014. Regulation of type I interferon responses. *Nat Rev Immunol* 14, 36–49. <https://doi.org/10.1038/nri3581>
- Klattenhoff, A.W., Thakur, M., Chu, C.S., Ray, D., Habib, S.L., Kidane, D., 2017. Loss of NEIL3 DNA glycosylase markedly increases replication associated double strand breaks and enhances sensitivity to ATR inhibitor in glioblastoma cells. *Oncotarget* 8, 112942–112958. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.22896>

- Limpose, K.L., Trego, K.S., Li, Z., Leung, S.W., Sarker, A.H., Shah, J.A., Ramalingam, S.S., Werner, E.M., Dynan, W.S., Cooper, P.K., Corbett, A.H., Doetsch, P.W., 2018. Overexpression of the base excision repair NTHL1 glycosylase causes genomic instability and early cellular hallmarks of cancer. *Nucleic Acids Research* 46, 4515–4532. <https://doi.org/10.1093/nar/gky162>
- Lomax, M.E., Folkes, L.K., O'Neill, P., 2013. Biological Consequences of Radiation-induced DNA Damage: Relevance to Radiotherapy. *Clinical Oncology* 25, 578–585. <https://doi.org/10.1016/j.clon.2013.06.007>
- Luna, L., Bjørås, M., Hoff, E., Rognes, T., Seeberg, E., 2000. Cell-cycle regulation, intracellular sorting and induced overexpression of the human NTH1 DNA glycosylase involved in removal of formamidopyrimidine residues from DNA. *Mutation Research/DNA Repair* 460, 95–104. [https://doi.org/10.1016/S0921-8777\(00\)00015-X](https://doi.org/10.1016/S0921-8777(00)00015-X)
- Mijic, S., Zellweger, R., Chappidi, N., Berti, M., Jacobs, K., Mutreja, K., Ursich, S., Ray Chaudhuri, A., Nussenzweig, A., Janscak, P., Lopes, M., 2017. Replication fork reversal triggers fork degradation in BRCA2-defective cells. *Nature Communications* 8. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-01164-5>
- Neurauter, C.G., Luna, L., Bjørås, M., 2012. Release from quiescence stimulates the expression of human NEIL3 under the control of the Ras dependent ERK–MAP kinase pathway. *DNA Repair* 11, 401–409. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2012.01.007>
- Orth, M., Lauber, K., Niyazi, M., Friedl, A.A., Li, M., Maihöfer, C., Schüttrumpf, L., Ernst, A., Niemöller, O.M., Belka, C., 2014. Current concepts in clinical radiation oncology. *Radiat Environ Biophys* 53, 1–29. <https://doi.org/10.1007/s00411-013-0497-2>
- Parkes, E.E., Walker, S.M., Taggart, L.E., McCabe, N., Knight, L.A., Wilkinson, R., McCloskey, K.D., Buckley, N.E., Savage, K.I., Salto-Tellez, M., McQuaid, S., Harte, M.T., Mullan, P.B., Harkin, D.P., Kennedy, R.D., 2017. Activation of STING-Dependent Innate Immune Signaling By S-Phase-Specific DNA Damage in Breast Cancer. *Journal of the National Cancer Institute* 109, djw199. <https://doi.org/10.1093/jnci/djw199>
- Pasero, P., Vindigni, A., 2017. Nucleases Acting at Stalled Forks: How to Reboot the Replication Program with a Few Shortcuts. *Annual review of genetics* 51, 477–499.
- Popuri, V., Croteau, D.L., Bohr, V.A., 2010. Substrate specific stimulation of NEIL1 by WRN but not the other human RecQ helicases. *DNA Repair* 9, 636–642. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2010.02.012>
- Rangaswamy, S., Pandey, A., Mitra, S., Hegde, M., 2017. Pre-Replicative Repair of Oxidized Bases Maintains Fidelity in Mammalian Genomes: The Cowcatcher Role of NEIL1 DNA Glycosylase. *Genes* 8, 175. <https://doi.org/10.3390/genes8070175>
- Sage, E., Shikazono, N., 2017. Radiation-induced clustered DNA lesions: Repair and mutagenesis. *Free Radical Biology and Medicine* 107, 125–135. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2016.12.008>
- Sies, H., Berndt, C., Jones, D.P., 2017. Oxidative Stress 37.
- Takedachi, A., Despras, E., Scaglione, S., Guérois, R., Guervilly, J.H., Blin, M., Audebert, S., Camoin, L., Hasanova, Z., Schertzer, M., Guille, A., Churikov, D., Callebaut, I., Naim, V., Chaffanet, M., Borg, J.P., Bertucci, F., Revy, P., Birnbaum, D., Londoño-Vallejo, A., Kannouche, P.L., Gaillard, P.H.L., 2020. SLX4 interacts with RTEL1 to prevent transcription-mediated DNA replication perturbations. *Nat Struct Mol Biol* 27, 438–449. <https://doi.org/10.1038/s41594-020-0419-3>
- Turkmen, R., Birdane, Y.O., Demirel, H.H., Yavuz, H., Kabu, M., Ince, S., 2019. Antioxidant and cytoprotective effects of N-acetylcysteine against subchronic oral glyphosate-based

- herbicide-induced oxidative stress in rats. *Environ Sci Pollut Res* 26, 11427–11437. <https://doi.org/10.1007/s11356-019-04585-5>
- Vanpouille-Box, C., Alard, A., Aryankalayil, M.J., Sarfraz, Y., Diamond, J.M., Schneider, R.J., Inghirami, G., Coleman, C.N., Formenti, S.C., Demaria, S., 2017. DNA exonuclease Trex1 regulates radiotherapy-induced tumour immunogenicity. *Nature Communications* 8, 15618. <https://doi.org/10.1038/ncomms15618>
- Wilhelm, T., Ragu, S., Magdalou, I., Machon, C., Dardillac, E., Técher, H., Guitton, J., Debatisse, M., Lopez, B.S., 2016. Slow Replication Fork Velocity of Homologous Recombination-Defective Cells Results from Endogenous Oxidative Stress. *PLoS Genet* 12, e1006007. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1006007>
- Willaume, S., Rass, E., Fontanilla-Ramirez, P., Moussa, A., Wanschoor, P., Bertrand, P., 2021. A Link between Replicative Stress, Lamin Proteins, and Inflammation. *Genes* 12, 552. <https://doi.org/10.3390/genes12040552>
- Wolf, C., Rapp, A., Berndt, N., Staroske, W., Schuster, M., Dobrick-Mattheuer, M., Kretschmer, S., König, N., Kurth, T., Wiczorek, D., Kast, K., Cardoso, M.C., Günther, C., Lee-Kirsch, M.A., 2016. RPA and Rad51 constitute a cell intrinsic mechanism to protect the cytosol from self DNA. *Nature Communications* 7, 11752. <https://doi.org/10.1038/ncomms11752>
- Zellweger, R., Dalcher, D., Mutreja, K., Berti, M., Schmid, J.A., Herrador, R., Vindigni, A., Lopes, M., 2015. Rad51-mediated replication fork reversal is a global response to genotoxic treatments in human cells. *The Journal of Cell Biology* 208, 563–579. <https://doi.org/10.1083/jcb.201406099>
- Zevini, A., Olganier, D., Hiscott, J., 2017. Crosstalk between Cytoplasmic RIG-I and STING Sensing Pathways. *Trends in Immunology* 38, 194–205. <https://doi.org/10.1016/j.it.2016.12.004>

Figures

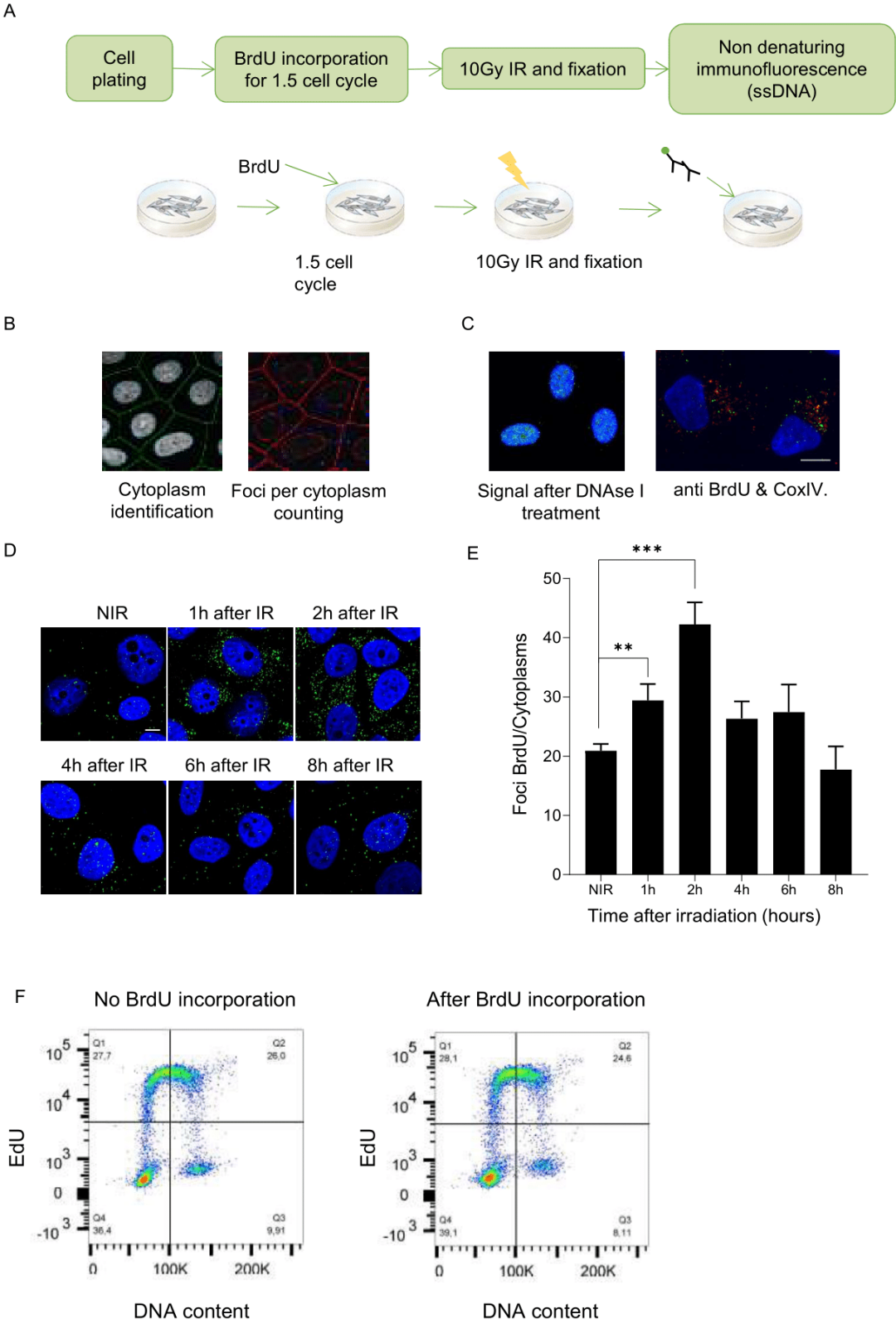


Figure 1

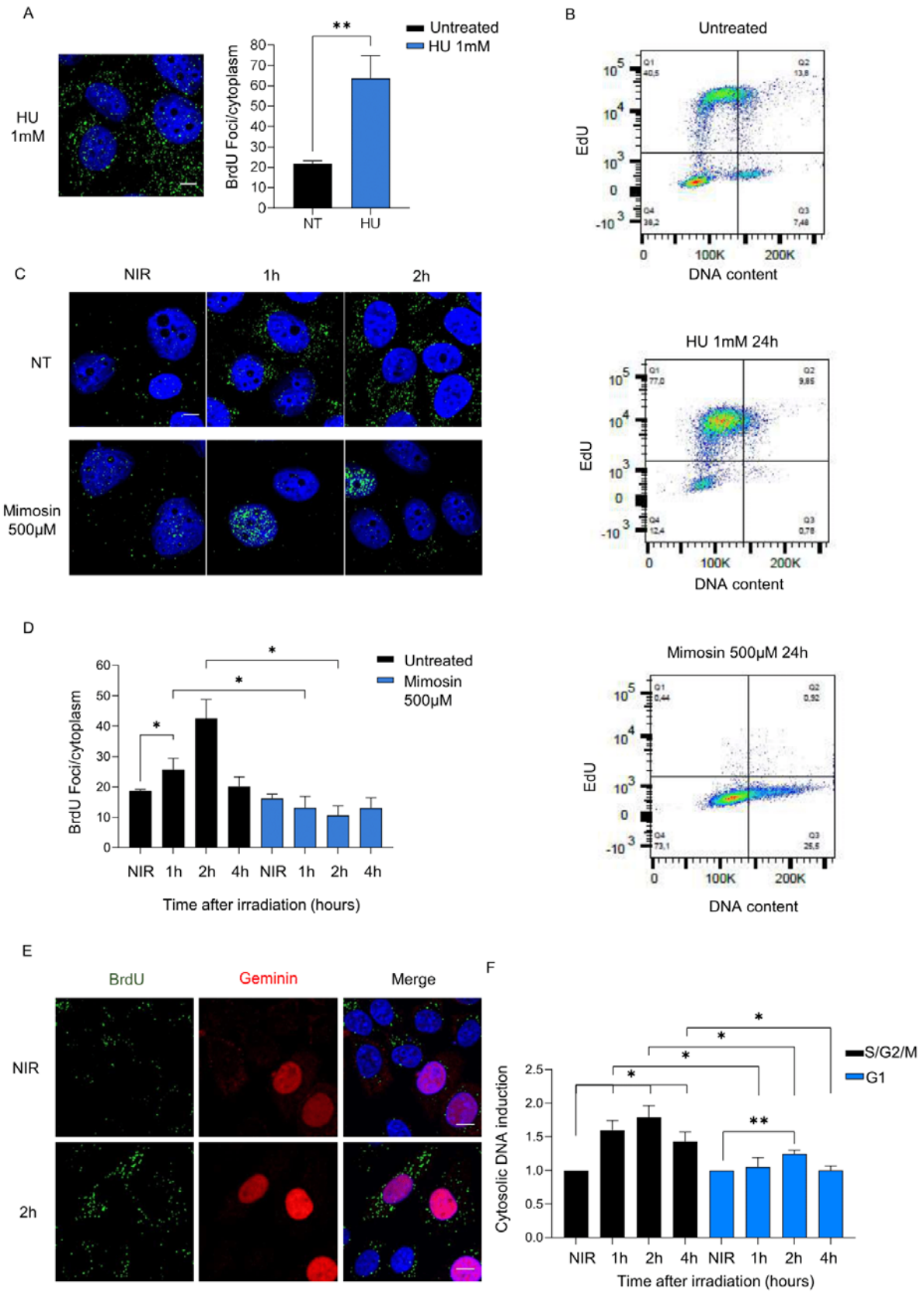


Figure 2

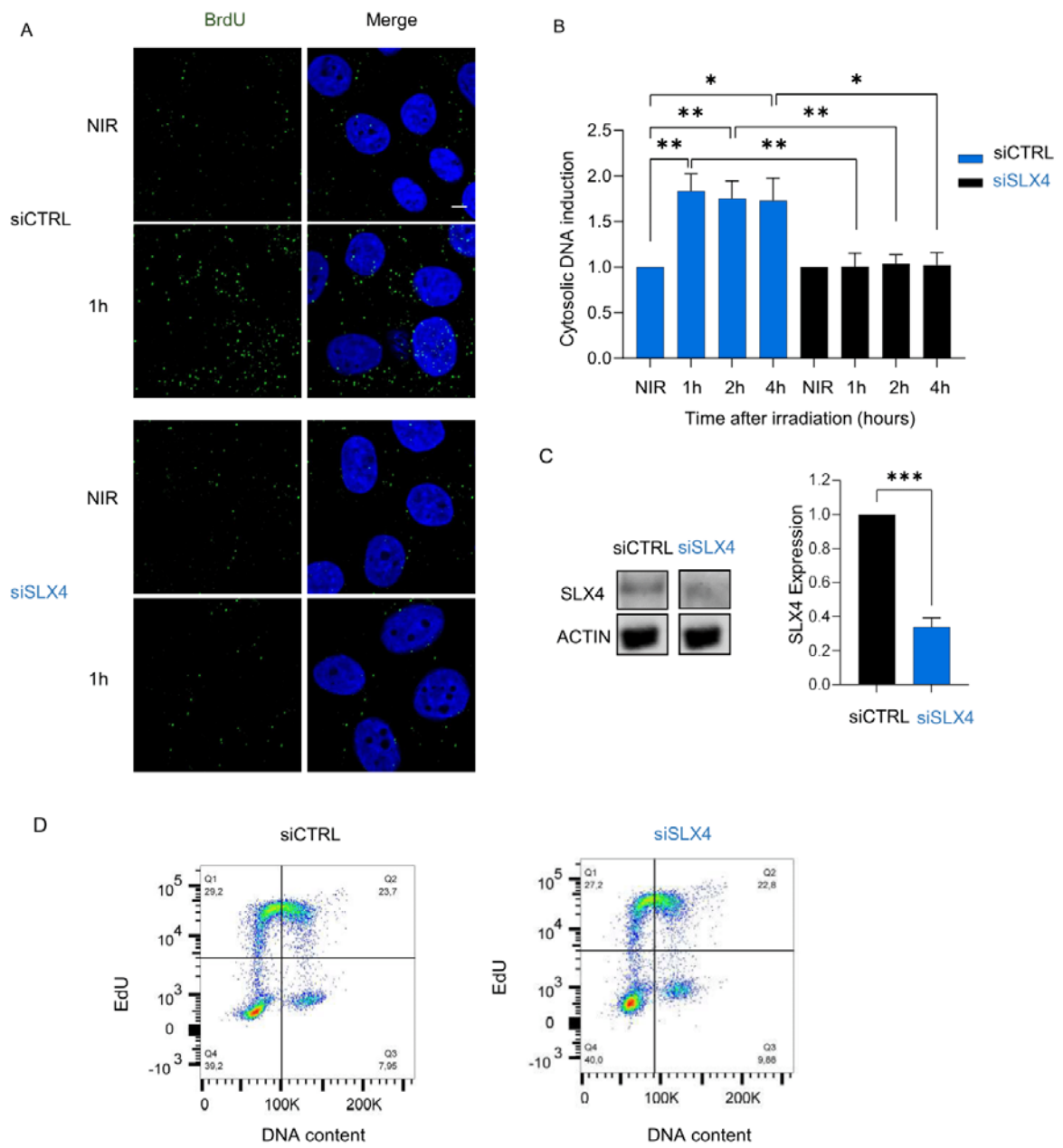


Figure 3

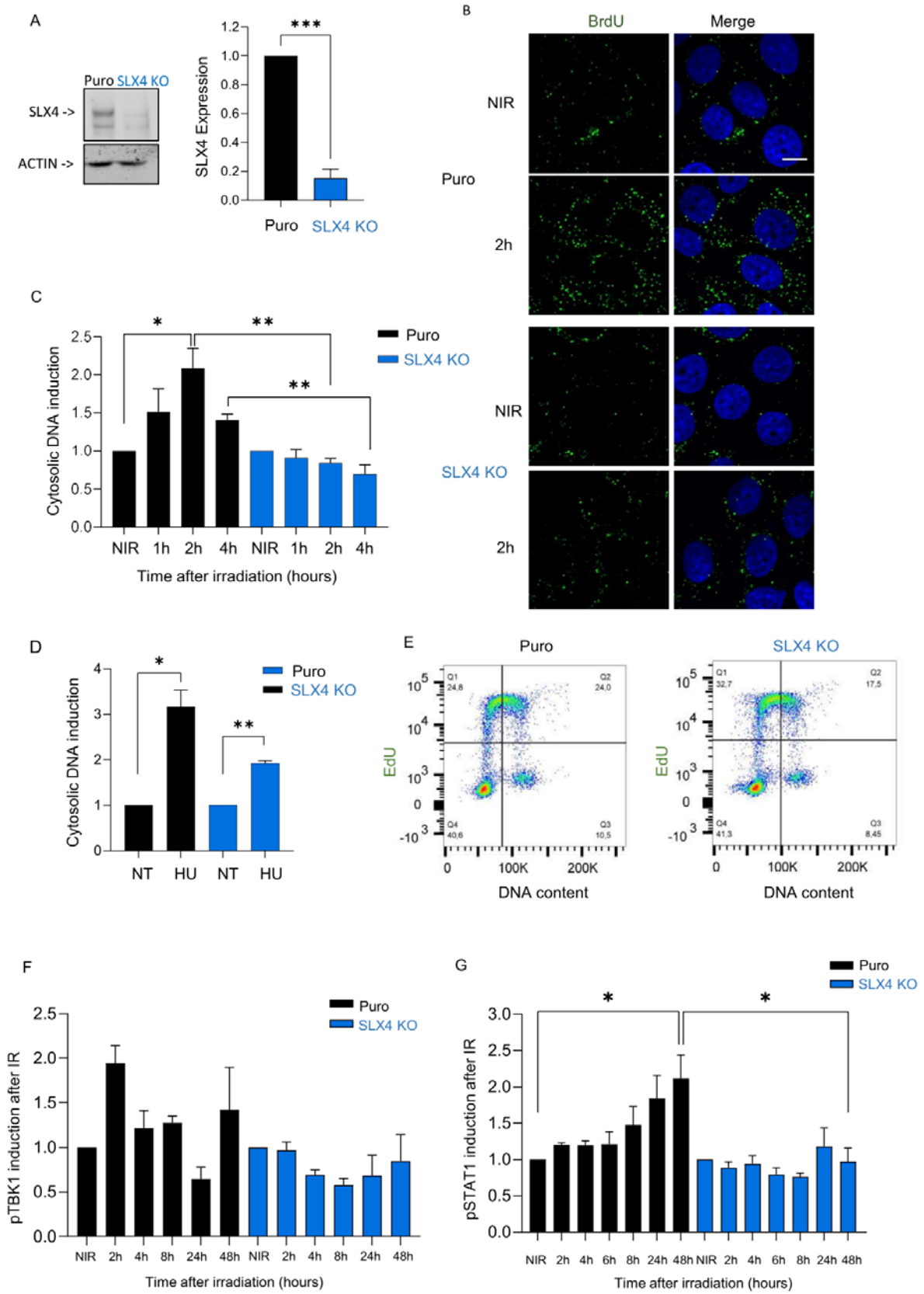


Figure 4

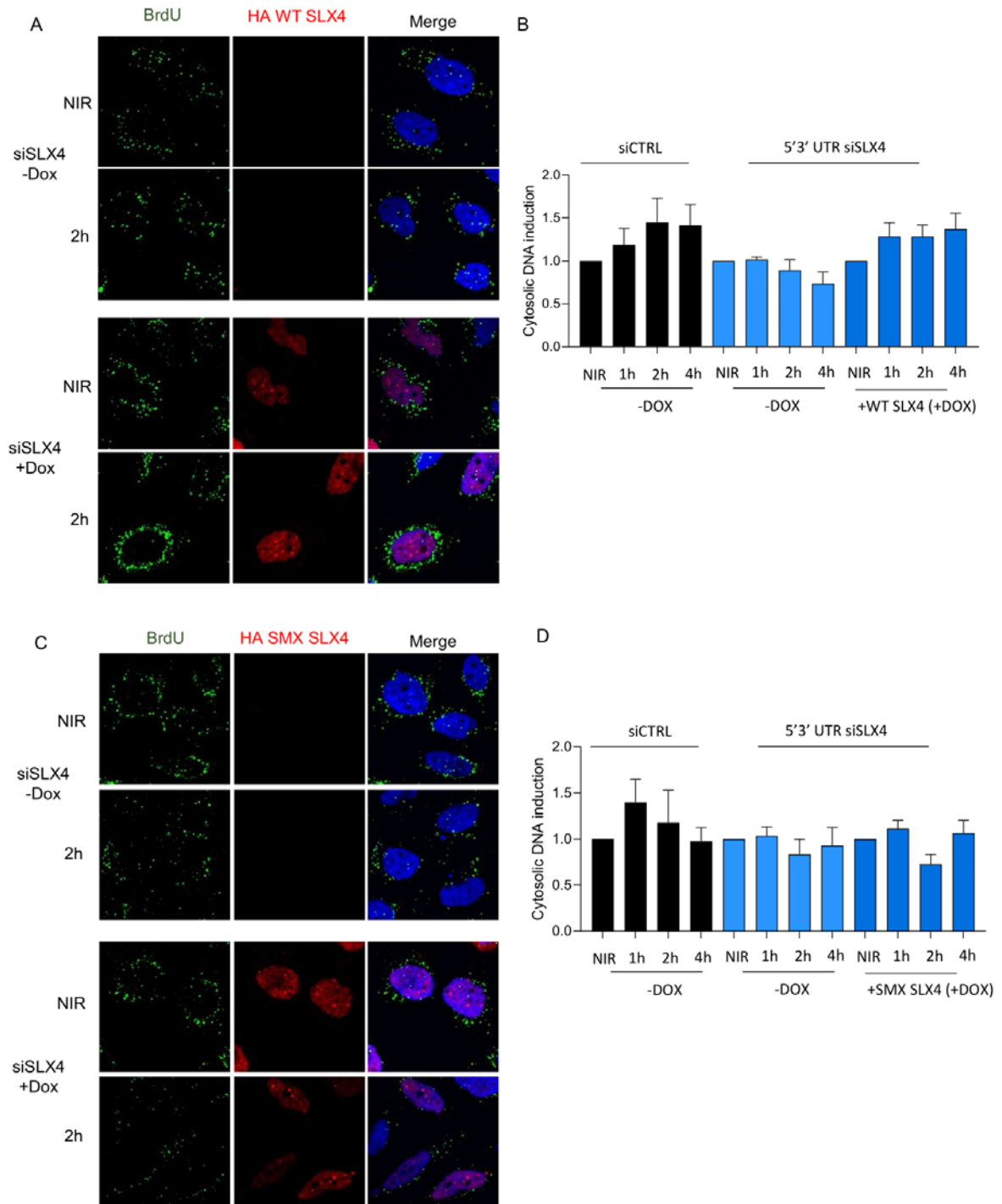


Figure 5

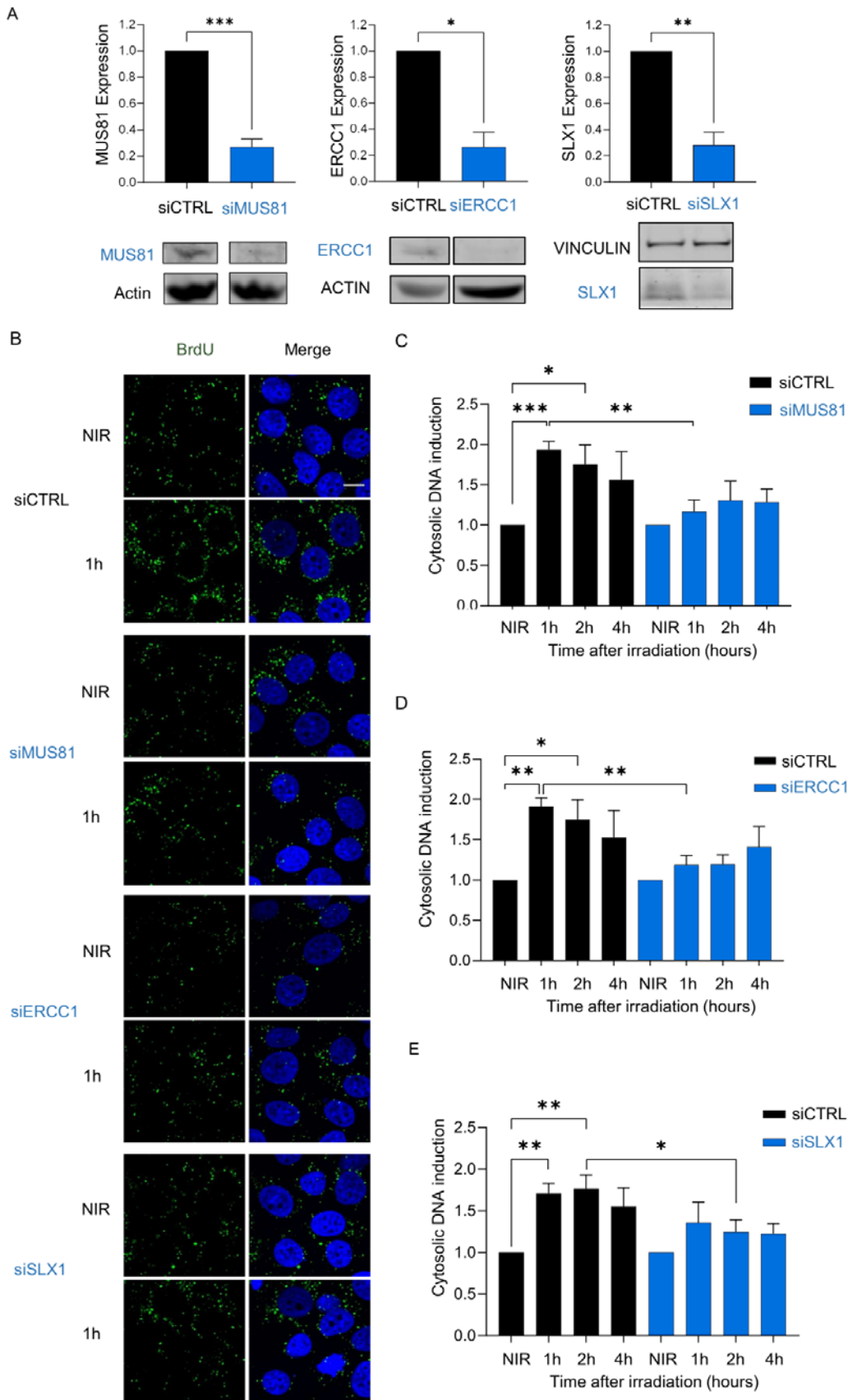


Figure 6

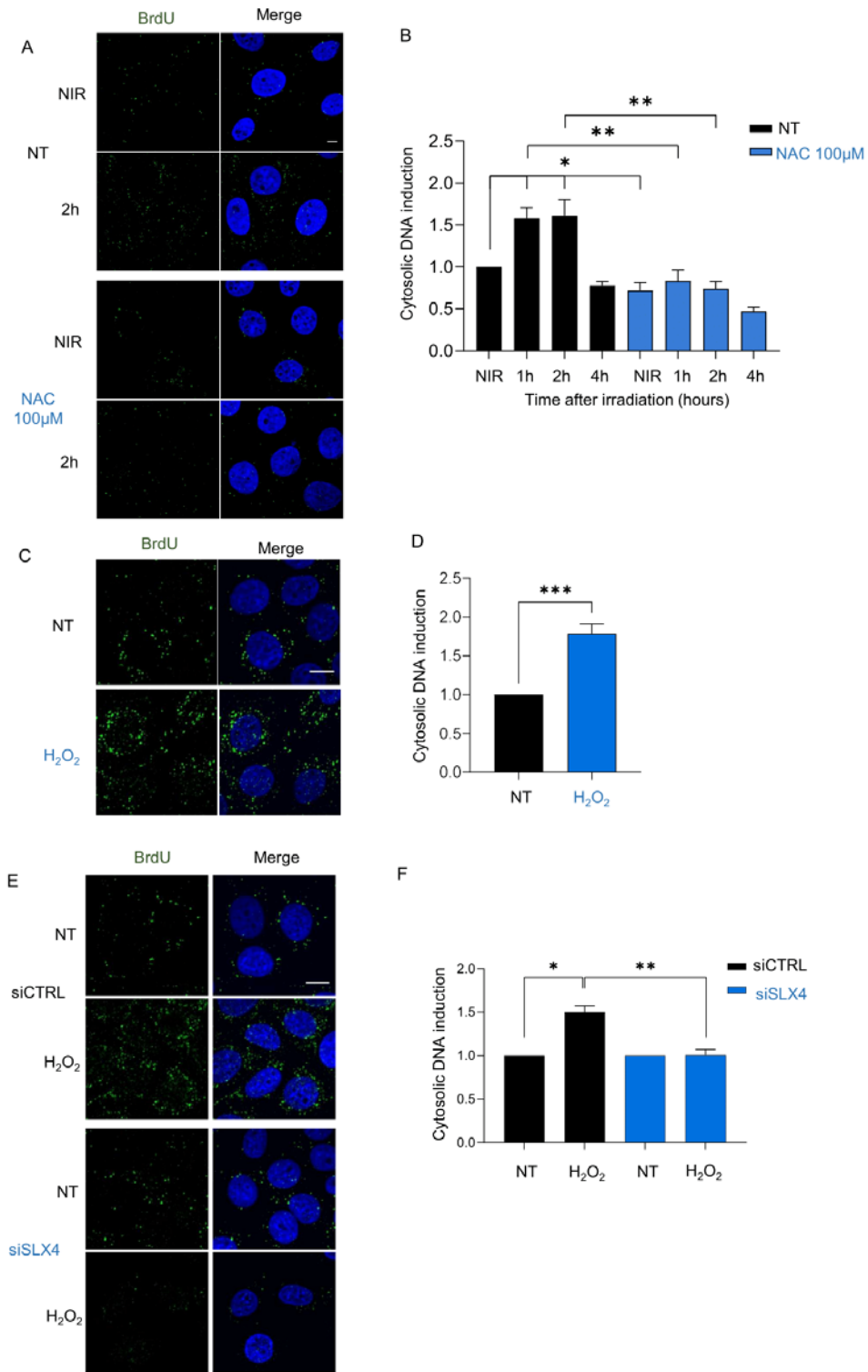


Figure 7

Figure 8

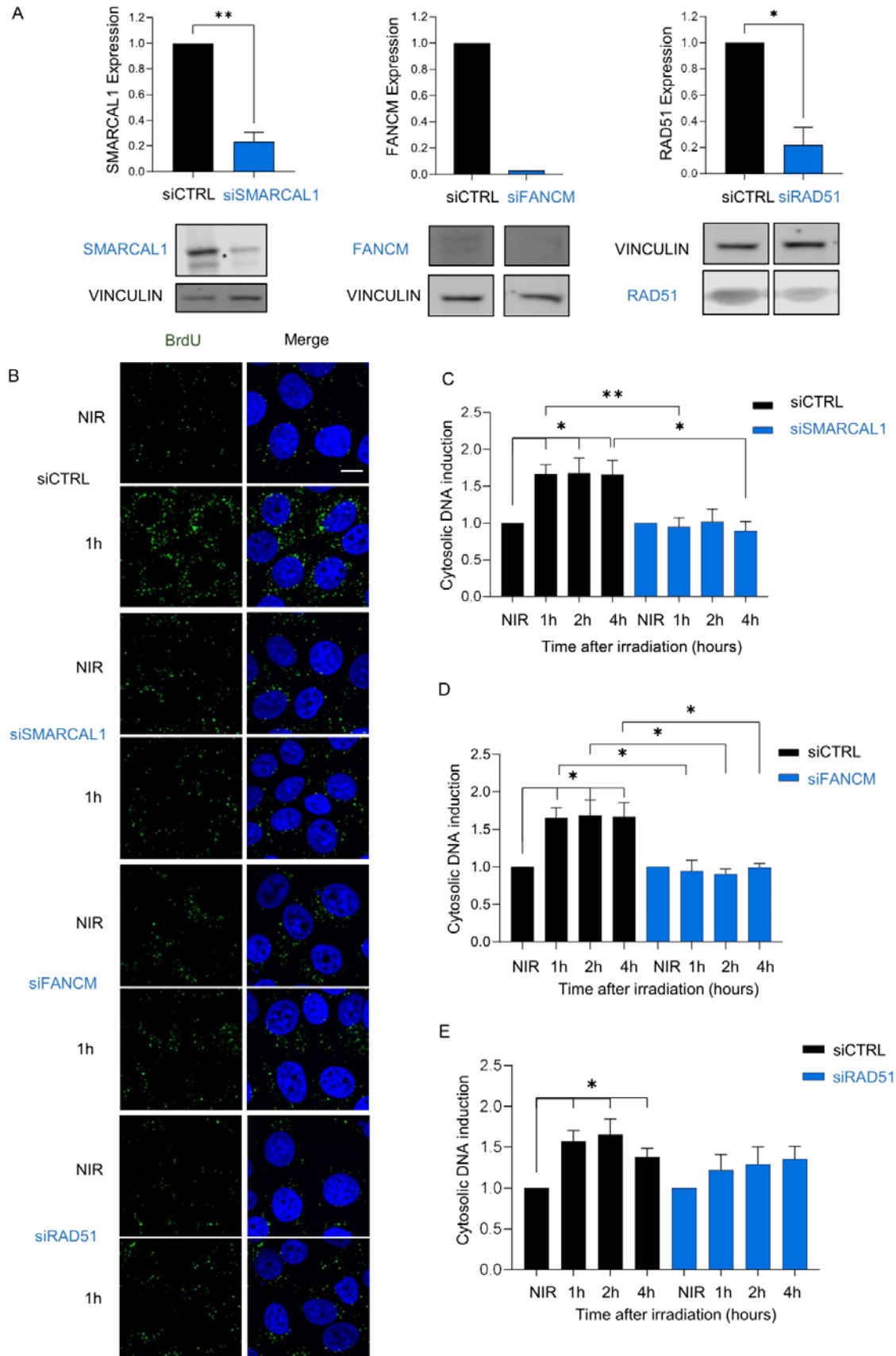
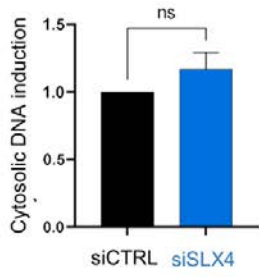


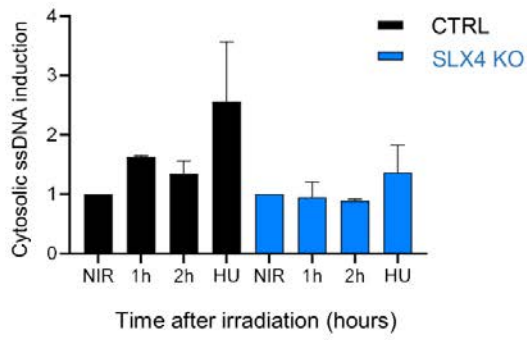
Figure 9

Figure 10

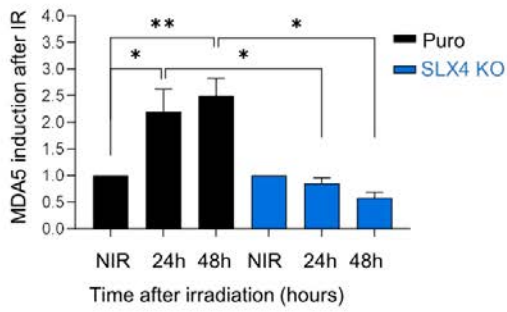
A



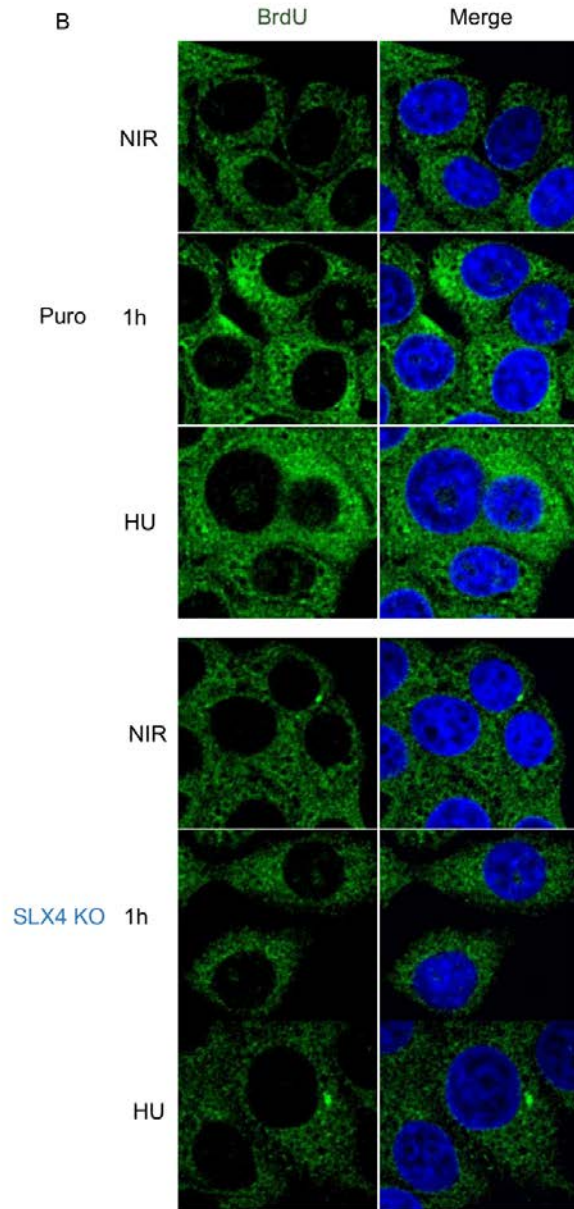
C



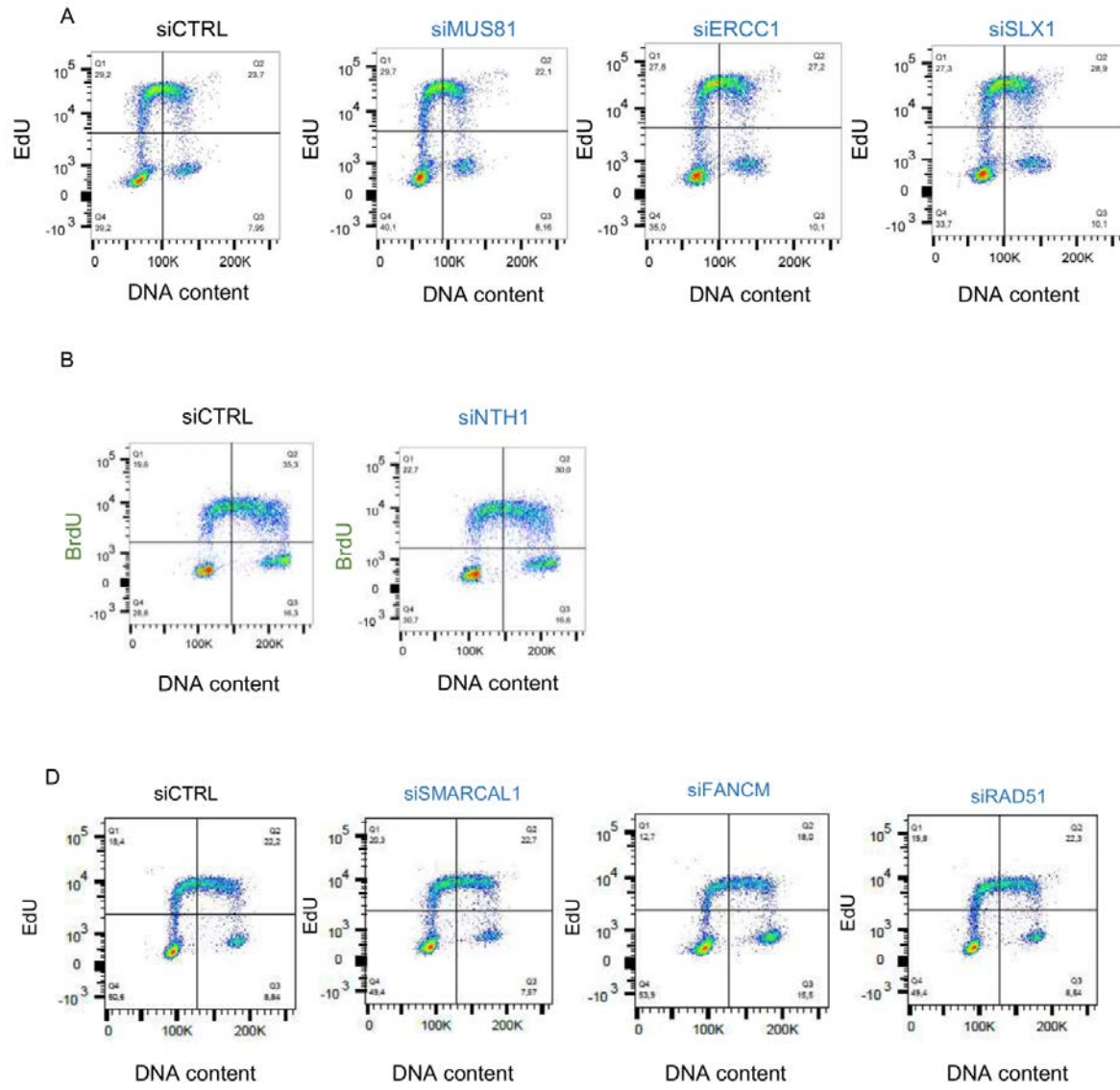
D



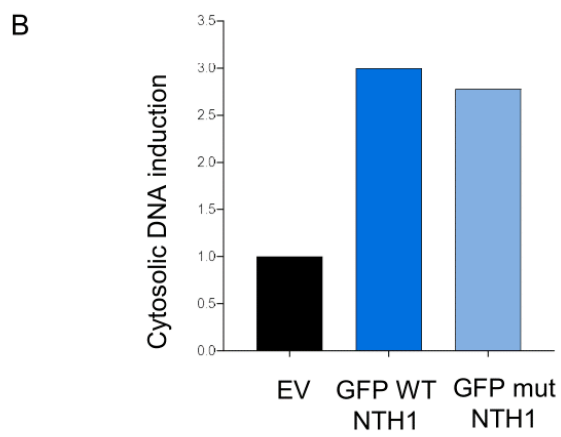
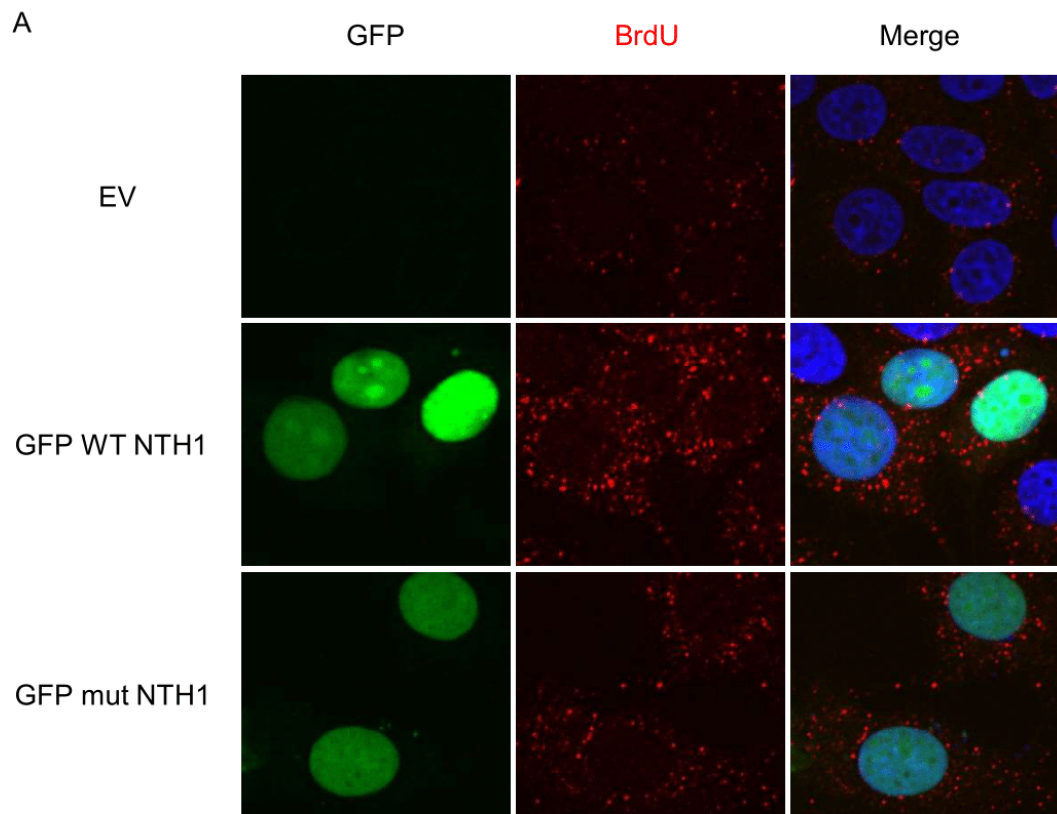
B



Supplemental Figure 1



Supplemental Figure 2



Supplemental Figure 3

1 Résumé des résultats de l'article

1.1 La production d'ADN cytosoliques à lieu majoritairement en phase S/G2/M

Mes résultats montrent que la production d'ADN cytosoliques après IR se fait majoritairement pendant la phase S/G2/M de la cellule. En effet, un blocage en G1 par la mimosine (un chélateur des ions fer bloquant les cellules en G1/début de S) inhibe la production d'ADN cytosoliques après IR. De plus, un co-marquage avec la géminine (marquant les cellules en phase S/G2/M) montre une production d'ADN cytosoliques accrue dans les cellules marquées par la géminine. Nous avons donc supposé l'implication d'un stress répliatif radio-induit et étudié le rôle d'acteurs participant à la gestion des fourches de répliations bloquées.

1.2 SLX4, un nouvel acteur de la production d'ADN cytosoliques radio-induits.

Comme SLX4 participe à la gestion du stress répliatif et au clivage des fourches de répliation bloquées, j'ai étudié son rôle dans le mécanisme de production d'ADN cytosoliques radio-induits. En effet, un clivage des fourches de répliation bloquées pourrait être à l'origine de la production d'ADN cytosoliques. Mes résultats montrent qu'un siSLX4 inhibe la production d'ADN cytosoliques radio-induite. Nous avons également utilisé des lignées KO pour SLX4 obtenue par Crispr Cas9 (en collaboration avec Sophie Barrillé-Nion, CRCINA) et obtenu des résultats similaires. De plus, mes résultats montrent une inhibition de l'activation des voies immunitaires innées dans les cellules KO pour SLX4. Etant donné que SLX4 interagit et coordonne l'action des SSE SLX1, MUS81-EME1 et XPF-ERCC1 (SMX) lors des mécanismes de la réparation et de gestion des fourches bloquées, j'ai étudié le rôle de ces protéines. Pour cela, j'ai utilisé des lignées HeLa inductibles à la doxycycline permettant d'exprimer SLX4 WT ou une forme de SLX4 mutée pour l'interaction avec chacune de ses SSE (SLX4 SMX). J'ai ainsi pu déterminer un rôle important d'au moins une des SSE partenaires de SLX4. Cependant, par une approche de siRNA dirigés contre les différentes SSE individuelles, je n'ai pas pu déterminer si l'une d'entre elle avait un rôle prépondérant dans la production d'ADN cytosoliques. Cela est probablement dû à des redondances de fonctions entre les différentes SSE.

1.3 Les ROS et le mécanisme du BER sont impliqués dans la production d'ADN cytosoliques

Lors de l'irradiation, la majorité des dommages sont dus aux ROS. De plus, les ROS sont connus pour générer un stress répliatif. Celui-ci pourrait participer à des blocages des fourches de réplication, prises en charge par SLX4 et ses partenaires, menant à la production d'ADN cytosoliques. Mes résultats montrent qu'un prétraitement au NAC, un antioxydant, inhibe la production d'ADN cytosoliques radio-induite. A l'inverse, un traitement oxydant avec du H₂O₂, induit une production d'ADN cytosoliques. Etant donné que les ROS participent au mécanisme de production d'ADN cytosoliques, j'ai étudié l'impact de la déplétion des ADN glycosylases NTH1 et NEIL1, acteurs du BER participant à l'élimination des bases oxydées, sur la production d'ADN cytosoliques. Ainsi, un siNTH1 inhibe la production d'ADN cytosoliques radio-induits. A l'inverse, la surexpression de NTH1, connue pour induire des dommages à l'ADN médié par un stress répliatif, induirait une production d'ADN cytosoliques. Les ROS et les protéines impliquées dans leur réparation participent donc à la production d'ADN cytosoliques après IR.

1.4 La réversion de fourche, mécanisme essentiel de la production d'ADN cytosoliques

Les ROS et autres agents produisant des dommages à l'ADN sont connus pour induire des blocages et des réversions des fourches de réplication. Les fourches reversées sont aussi des substrats pour SLX4 et ses partenaires, et pourraient être à l'origine de la production d'ADN cytosoliques. Mes résultats montrent qu'un siSLX4 inhibe la production d'ADN cytosoliques après traitement H₂O₂. J'ai étudié le rôle de SMARCAL1, FANCM et RAD51 protéines participant entre autres, au mécanisme de réversion des fourches de réplication. Des siRNA dirigés contre SMARCAL1 et FANCM inhibent la production d'ADN cytosoliques radio-induits. C'est aussi le cas après déplétion de RAD51. La réversion de fourche, qui est aussi un substrat (ou structure reconnue par SLX4) pour SLX4, serait donc une étape nécessaire à la production d'ADN cytosolique.

1.5 Conclusions

Dans leur ensemble, mes résultats montrent un rôle nouveau de SLX4 dans la production d'ADN cytosoliques radio-induite ainsi que dans l'activation des voies du système immunitaire qui en découle. De plus, mon travail montre un rôle des ROS et de protéines participant à la

réparation des bases oxydées dans la production d'ADN cytosoliques après IR. Le mécanisme de réversion de fourche, qui est une étape nécessaire à la production d'ADN cytosolique, nous permet de montrer un lien potentiel entre ROS, SLX4 et production d'ADN cytosolique. Finalement, mes résultats permettent de proposer un modèle de production d'ADN cytosoliques après IR. Les IR produisent des dommages directs et des ROS menant entre autres, à la production de bases oxydées. NEIL1 (ou les autres ADN glycosylases de la famille NEIL), en signalant le dommage oxydatif, bloquerait la progression de la fourche de réplication et favoriserait la réversion de celle-ci par FANCM et SMARCAL1. La fourche reversée serait ainsi une étape intermédiaire importante pour permettre la réparation pré-réplivative par NTH1 (ou autre glycosylase) de la base oxydée sur un duplex d'ADN à nouveau reformé. Un clivage par SLX4 avec au moins un de ces partenaires, permet de promouvoir le redémarrage de la fourche de réplication et la libération d'un fragment d'ADN.

2 Résultats supplémentaires et préliminaires

2.1 Rôle de RTEL1 dans la production d'ADN cytosoliques après IR

Etant donné que mes résultats montrent un rôle essentiel de SLX4 dans la production d'ADN cytosoliques, je me suis intéressé aux différents partenaires de SLX4. Récemment, il a été mis en évidence l'existence d'un nouveau partenaire « direct » de SLX4 : RTEL1 (Cf chapitre 2.4.6) (Takedachi et al., 2020a). Il a été montré que l'interaction SLX4-RTEL1 est nécessaire pour prévenir les conflits transcription-réplication qui, comme vu précédemment, sont sources de stress répliatif. De plus, RTEL1 joue un rôle dans la gestion des hybrides RNA:DNA et ces derniers peuvent se retrouver dans le cytoplasme et activer la voie cGAS-STING (Koo et al., 2015). Mes résultats montrent qu'un siRNA RTEL1 diminue significativement la production d'ADN cytosoliques après IR, comparé à un siCTRL (figure 27A, 26B). Les niveaux d'extinction étaient d'environ 75% et le profil du cycle cellulaire ne change pas après siRTEL1 (figure 27C, 26D). Par la suite, j'ai utilisé des cellules HeLa contenant un système inductible à la doxycycline permettant d'exprimer une forme de SLX4 mutante pour son interaction avec RTEL1 (SLX4-LP). Mes résultats préliminaires semblent montrer que la complémentation par cette forme de SLX4 ne restaure pas l'effet du siRNA SLX4 5'3' UTR (figure 27E). RTEL1 jouerait donc un rôle significatif dans la production d'ADN cytosoliques après irradiation. Cependant, ces derniers résultats restent à être confirmés.

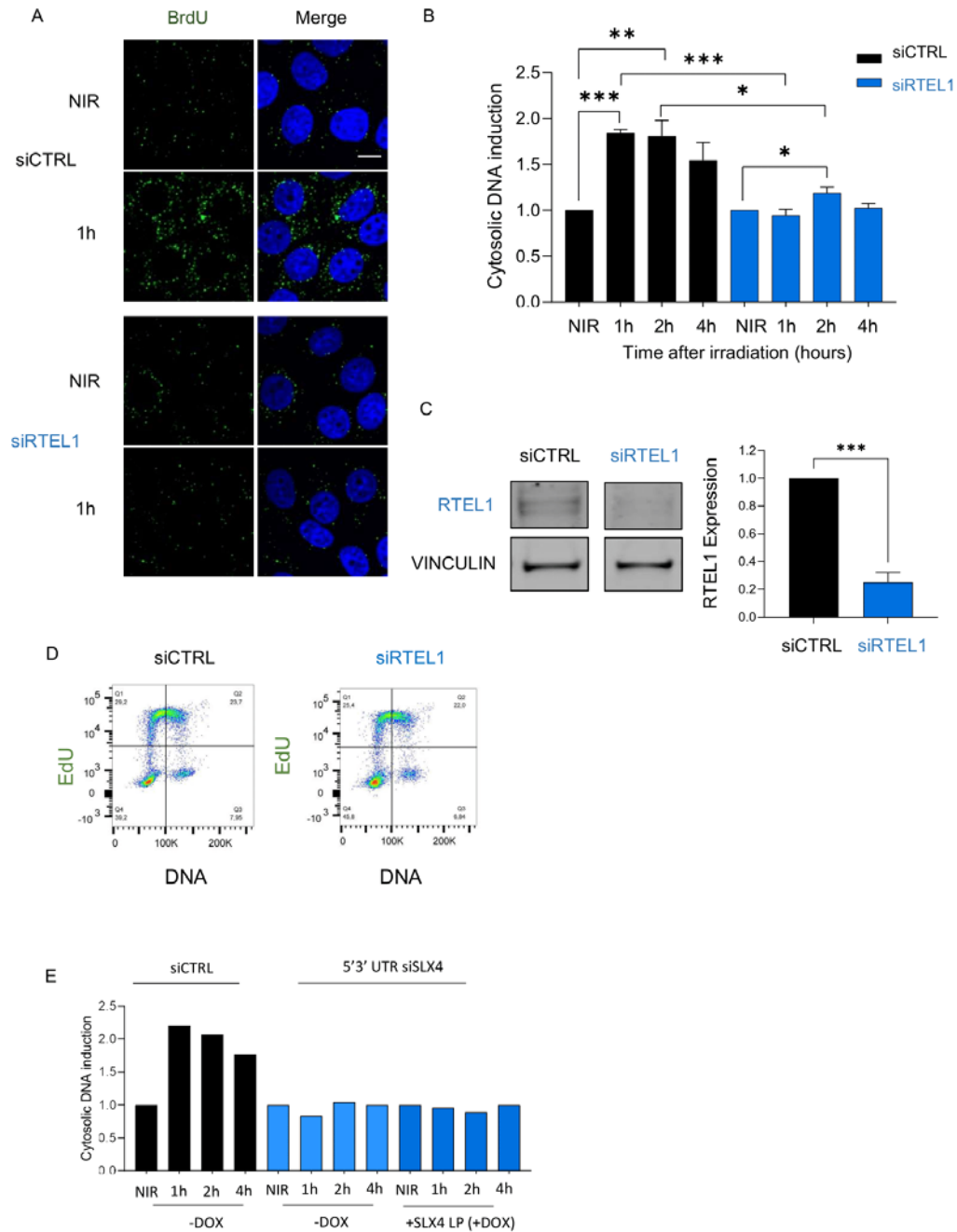


Figure 27: Rôle de RTEL1 dans la production d'ADN cytosoliques radio-induite. **A.** Image de cellules MCF7 irradiées à 10Gy ou non, avec siRNA RTEL1 (siRTEL1) ou contrôle (siCTRL), en microscopie confocale avec en vert, le marquage d'ADN cytosoliques en BrdU et en bleu, le contre-marquage nucléaire en DAPI. **B.** Quantification de la cinétique d'induction d'ADN cytosoliques après irradiation avec siRTEL1 ou siCTRL (n=6). **C.** Analyse du niveau d'extinction de siRTEL1 par Western blot n=5. **D.** Analyse de cycle par FACS. **E.** Quantification de la cinétique d'induction d'ADN cytosoliques dans des cellules HeLa, avec induction à la doxycycline (+ DOX) d'une forme de SLX4 mutante pour son interaction avec RTEL1 (SLX4 LP) ou non (-DOX), avec siRNA SLX4 5'3'UTR ou non (n=1). Welch's T test, *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001

2.2 Libération de Thymine Glycol dans le cytoplasme après irradiation.

Etant donné que mes résultats montrent un rôle essentiel des ROS dans les mécanismes de production d'ADN cytosoliques, nous avons voulu déterminer si certaines bases modifiées se

retrouvaient sur les fragments d'ADN cytosoliques. J'ai donc réalisé des marquages en immunofluorescence avec un anticorps spécifique des TG. Les TG sont des bases oxydées bloquantes pour la réplication induisant un stress réplicatif. De plus, elles sont principalement éliminées par les ADN glycosylases NTH1 et NEIL1, qui participent à la production d'ADN cytosoliques (Lomax et al., 2013). Mes résultats préliminaires montrent une production de TG cytosoliques après IR (figure 28). La cinétique de production des TG cytosoliques est comparable à celle des ADN cytosoliques marqués au BrdU. Cela suggère qu'un mécanisme permet la libération dans le cytosol des TG produits après IR.

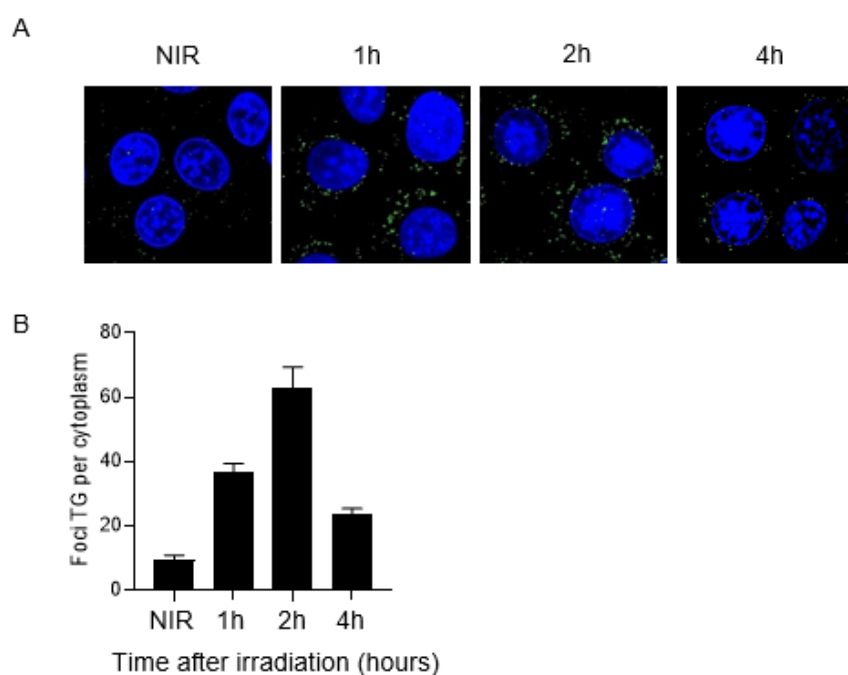


Figure 28 : Production de thymine glycol (TG) cytosoliques après IR. A. Image de cellules MCF7 irradiées à 10Gy ou non, en microscopie confocale avec en vert, le marquage de TG et en bleu, le contre-marquage nucléaire en DAPI. B. Quantification de la cinétique d'induction de TG cytosoliques après irradiation (n=1).

2.3 Participation à un projet de crible à haut débit de la production d'ADN cytosoliques après IR

J'ai participé au cours de ma thèse, en partenariat avec la plateforme PARI de Guillaume Pinna, à la mise en place d'un crible haut débit (figure 29). Ce crible sera réalisé avec une librairie de petites molécules « FDA approved » de Preswick (1280 molécules) et permettra de découvrir des modulateurs positifs ou négatifs de la production d'ADN cytosoliques après IR et de

l'activation de la voie cGAS-STING. Ces molécules pourraient présenter des intérêts thérapeutiques en association avec la radiothérapie.

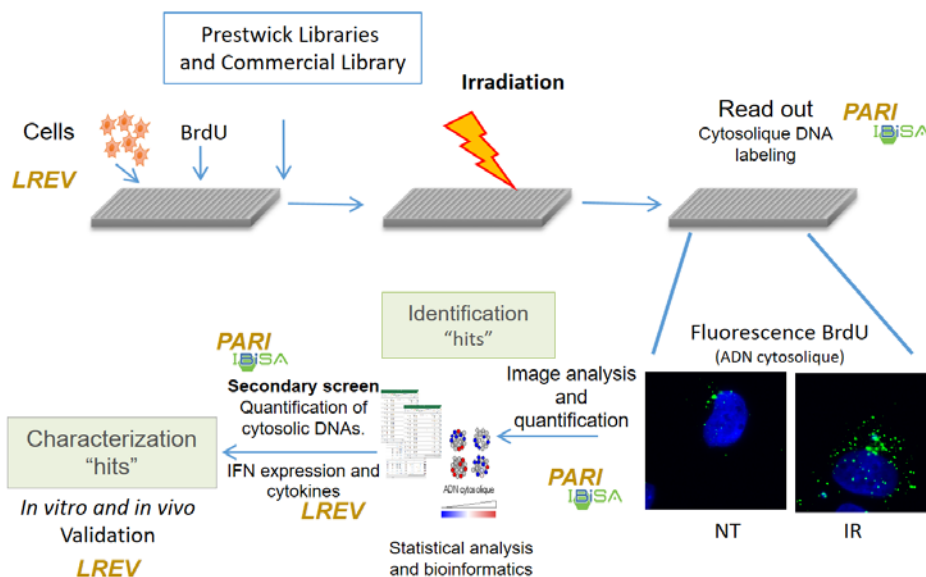


Figure 29: **Projet de crible à haut débit de la production d'ADN cytosoliques après IR.** Après incorporation de BrdU pour marquer l'ADN cytosoliques, les cellules seront prétraitées avant irradiation avec différentes banques de molécules. L'ADN cytosolique sera quantifié avant et après IR afin d'identifier des modulateurs positif ou négatifs de la production d'ADN cytosoliques. Lors d'un crible secondaire, les « hits » seront vérifié puis les meilleurs seront caractérisés et validés in vitro et in vivo.

J'ai initié la mise en place du crible et commencé à miniaturiser le marquage d'ADN cytosoliques en plaque 96 puits. Par la suite avec Paul WANSCHOOR, un étudiant en thèse du laboratoire, nous avons finalisé la miniaturisation en plaque 96 et l'automatisation de l'analyse d'image grâce au logiciel Cellprofiler. Paul a par la suite amélioré la prise de photo et l'a automatisée grâce au software JOBS de NIKON. La miniaturisation du crible en plaque 384 puits est en cours de réalisation par Paul et Pauline CHAUMERLIAT, une étudiante en thèse du laboratoire. En parallèle, Paul et Pauline réalisent des gammes dose d'irradiations pour améliorer la sensibilité du crible. Des gammes dose de DMSO sont aussi réalisées pour déterminer la concentration maximale pouvant être utilisée pour reprendre les drogues des

banques de molécules sans impacter la production d'ADN cytosoliques. La mise au point du crible touche à sa fin et devrait être lancé dans les semaines qui suivent.

2.4 Participation à l'étude de l'impact de la surexpression de la Lamine B1 sur la stabilité du génome.

Au cours de ma thèse, j'ai participé aux expérimentations pour la soumission et les révisions de l'article suivant : « Lamin B1 sequesters 53BP1 to control its recruitment to DNA damage », publié dans Science Advances (Etourneau et al, 2021), en annexe de ma thèse.

53BP1 est une protéine clef de la réparation qui favorise le C-NHEJ au détriment de la RH. Le C-NHEJ est l'une des voies de réparation des CDB. Un défaut de C-NHEJ entraîne des réarrangements génétiques ainsi qu'une sensibilité accrue à des agents génotoxiques. Cependant, s'il n'est pas régulé, le C-NHEJ peut générer des translocations et de l'instabilité génétique.

Cette étude montre que la lamine B1, une protéine de l'enveloppe nucléaire, interagit directement avec 53BP1. Après dommages à l'ADN, 53BP1 se dissocie de la lamine B1 et est recrutée au niveau des CDB. En cas de surexpression de la lamine B1, 53BP1 est séquestrée par la lamine B1, induisant un défaut de recrutement de 53BP1 aux dommages. Ceci est associé à une persistance de cassures-double-brin, un défaut de réparation par le NHEJ et une sensibilité accrue à des stress génotoxiques. L'interaction 53BP1-Lamine B1 se fait sur le domaine IRIF de 53BP1, incluant les domaines TUDOR et UDR, nécessaires à 53BP1 pour interagir avec la chromatine endommagée et contrôler de son recrutement. Le recrutement de 53BP1 aux dommages, en plus d'être régulé de manière stricte, est contrôlé à distance par son interaction avec la Lamine B1.

Au final, l'ensemble de ces résultats suggèrent que dans les cellules normales en absence de dommages, la Lamine B1 interagit avec 53BP1 et joue le rôle de « réservoir » de 53BP1. Cette réserve de 53BP1 est située à distance mais est rapidement disponible en cas de stress génotoxique. Après dommages à l'ADN, 53BP1 se dissocie de la Lamine B1 permettant ainsi son recrutement rapide à la chromatine endommagée. En cas de surexpression, la Lamine B1 séquestre 53BP1, empêchant son recrutement, et contribuant ainsi à une instabilité génétique. De plus, la Lamine B1 est retrouvée surexprimée dans certains types de cancer et pourrait donc impacter la tumorigenèse.

III : Discussion

Dans leur ensemble, mes résultats montrent que la production d'ADN cytosoliques a lieu majoritairement en phase S/G2/M du cycle cellulaire, potentiellement suite à un stress réplcatif radio-induit. J'ai pu montrer le rôle essentiel de SLX4 dans la production d'ADN cytosoliques radio-induite. En effet, la déplétion de SLX4 inhibe la production d'ADN cytosoliques après IR, ainsi que l'activation des voies de l'immunité innée. J'ai pu montrer l'implication des SSE partenaires de SLX4 dans la production d'ADN cytosoliques. Mes résultats supplémentaires suggèrent aussi l'implication de RTEL1, le nouveau partenaire de SLX4. Mes données montrent aussi que les ROS radio-induits ont un rôle important dans le mécanisme de production d'ADN cytosoliques après IR et j'ai pu mettre en avant une implication de protéines du BER dans ce mécanisme. Finalement, le mécanisme de réversion de fourche, qui semble être une étape nécessaire à la production d'ADN cytosoliques, nous permet de montrer un lien potentiel entre ROS, SLX4 et production d'ADN cytosoliques.

Figure 30 : modèle de production d'ADN cytosolique après IR. Voir texte. Figure originale

Ainsi, nous proposons un nouveau modèle de production d'ADN cytosolique après IR (Figure 30). Dans celui-ci, les IR, en plus des dommages directs, produisent des ROS. Ces derniers sont essentiels à la production d'ADN cytosoliques. La glycosylase NEIL1 (ou autre protéine de la famille NEIL) participe à la reconnaissance des base oxydées et médie le blocage, voire la réversion des fourches de réplication. Les fourches sont reversées grâce aux différents

acteurs, SMARCAL1 et FANCM, et permettent la formation d'une structure prise en charge par SLX4 et ses partenaires, menant à la production d'ADN cytosoliques.

1 SLX4 est nécessaire à la production d'ADN cytosoliques après irradiation

Mes données montrent que SLX4 joue un rôle important dans le mécanisme de production d'ADN cytosoliques radio-induite. SLX4 a déjà par le passé été mise en lien avec la production d'ADN cytosoliques. En effet, à l'inverse de nous, il a été montré qu'une déficience de SLX4 (dans des cellules de patients FA RA3331) était responsable d'une accumulation d'ADNsb cytosoliques et d'une production de facteurs inflammatoires (Brégnard et al., 2016a). Il a été montré dans cette étude que la complémentation avec SLX4 WT inhibait la production d'ADN cytosoliques. A l'inverse, la complémentation avec une forme de SLX4 mutante pour son interaction avec MUS81 n'inhibait pas la production d'ADN cytosoliques. Par la suite, il a été montré que le rétrotransposon LINE1, était à l'origine de l'ADN cytosolique observé dans les cellules de patients FA. Les auteurs ont donc proposé que MUS81, coordonnée par SLX4, clive les rétrotransposons et permet leur dégradation (Brégnard et al., 2016a). Une autre étude montre à l'inverse que MUS81 est nécessaire à la production d'ADNdb cytosoliques dans des cellules de cancers colorectaux (Ho et al., 2016). Nos résultats montrent que la production d'ADN cytosoliques radio-induite est dépendante de SLX4 et que le niveau basal d'ADN cytosoliques ne change pas. Néanmoins la technique de détection des ADN cytosoliques et le type cellulaire varient entre nos études. Ils n'ont pas comparé les niveaux d'ADN cytosoliques des cellules de patients FA à celles de patients sains afin d'étudier l'impact de la déficience en SLX4 sur la production d'ADN cytosoliques. De plus, aucune analyse de cycle cellulaire n'a été réalisée dans Brégnard et al après surexpression de SLX4 WT ou muté pour l'interaction avec MUS81. Dans leur étude, un potentiel blocage en G1 après surexpression de SLX4 pourrait diminuer les niveaux d'ADN cytosoliques.

Mes résultats ne permettent pas encore de déterminer lequel ou lesquels des partenaires de SLX4 est responsable de la production d'ADN cytosoliques. Il est possible que la coordination par SLX4 des différentes SSE soit nécessaire à la production d'ADN cytosoliques. Par ailleurs, il existe des redondances de fonction entre les différentes SSE. Par exemple, une étude montre que la formation de CDB médiée par SLX4 au niveau des fourches inversées par SMARCAL1, n'est pas dépendante du rôle individuel de ses partenaires. Des siRNA individuels contre

MUS81, SLX1, et XPF ne reproduisent pas le résultat obtenu après siSLX4 (Couch et al., 2013a). Néanmoins, il serait intéressant de préciser mes résultats quant au rôle des différents partenaires. Pour cela plusieurs approches sont en train d'être mise en place au laboratoire. Nous avons obtenu de l'équipe de Pierre-Henri Gaillard (CRCM de Marseille), en plus des lignées HeLa permettant d'exprimer SLX4 WT/SMX ou mutée de l'interaction avec RTEL1, des lignées permettant l'expression inductible de mutants d'interaction de SLX4 pour chacune de ses SSE individuellement. Le laboratoire est en train de caractériser ces lignées par Co-IPs (Emilie Rass). De plus, en collaboration avec la plateforme de protéomique du Cigex (CEA de Fontenay-aux-Roses), la mise en place de lignées de KO individuels pour SLX1/MUS81/ERCC1/RTEL1 par CRISPR-Cas9 est en cours de réalisation. En association avec des siRNA pour dépléter au besoin 2 des partenaires de SLX4 à la fois, ces outils nous permettront de préciser le rôle des différents partenaires de SLX4 dans la production d'ADN cytosoliques radio-induite.

2 La production d'ADN cytosoliques est réalisée au niveau des fourches bloquées

L'une des questions restant en suspens est l'origine exacte de l'ADN cytosolique. Mes résultats montrent que la production d'ADN cytosoliques a lieu préférentiellement en phase S/G2 du cycle cellulaire. Nous avons donc supposé l'implication d'un stress répliatif radio-induit et les acteurs que nous avons étudiés participent à la gestion des fourches de réplication clivées. Néanmoins, si SLX4 et ses partenaires jouent un rôle important au niveau des fourches, ils participent à d'autres mécanismes tels que la RH ou la réparation d'ICL, qui pourraient être source d'ADN cytosoliques. De la même manière, FANCM, en plus de participer au mécanisme de réversion, participe à l'arrivée du complexe FANCD1/2 (et donc de SLX4 à posteriori), lors de la réparation des ICL. En effet, FANCM initie la voie FA en permettant de reconnaître la lésion et recruter le complexe FA « core ». Par la suite, la mono-ubiquitination de FANCD1 et FANCD2 par le FA « core » constitue une étape essentielle à la réparation des ICL, dont le recrutement de SLX4 (Kim and D'Andrea, 2012). SMARCAL1 possède aussi des rôles en dehors du mécanisme de réversion de fourches (Lugli et al., 2017). Au niveau des télomères, SMARCAL1 est fortement enrichie dans les cellules ALT et favorise probablement la maintenance des télomères. La perte de SMARCAL1 induit des dommages au niveau des télomères (Poole et al., 2015). De plus, les translocases ont souvent été montrées comme pouvant *in vitro* se lier

aux jonctions de Holliday et favoriser la migration de brins. C'est par exemple le cas de SMARCAL1 (Betous et al., 2012) et de FANCM (Kerstin Gari et al., 2008).

Les ADN cytosoliques radio-induit pourraient donc être générés par la réparation de CDB par de la RH ou lors de la réparation des ICL, même si ces derniers sont majoritairement réparés au niveau des fourches bloquées. Par exemple, il serait possible de compléter un KO pour FANCM avec une forme de FANCM mutée pour son activité translocase (FANCM K117R, (K. Gari et al., 2008)), toujours capable de recruter le FA « core » et FANCD2, et déterminer si cette fonction est nécessaire pour la production d'ADN cytosoliques. Ainsi il serait potentiellement possible de dissocier le rôle de FANCM entre le recrutement du FA « core » et entre sa capacité à reverser les fourches. La même approche est possible avec un mutant de SMARCAL1 R764Q qui peut se fixer à l'ADN mais est incapable de médier la réversion (Betous et al., 2012).

Le protocole technique de marquage des ADN cytosoliques au BrdU que j'utilise a été réalisé après incorporation durant 1.5 cycle cellulaire afin de marquer la majorité de l'ADN des cellules. Le BrdU étant retiré du milieu de culture un cycle avant IR, il est donc peu probable que l'ADN cytosoliques observé provienne du brin naissant mais plutôt du brin parental ou d'une structure double brins contenant les 2 types de brins. Néanmoins, il serait tout de même intéressant de déterminer si le brin naissant seul peut-être source d'ADN cytosoliques. Pour cela, il est possible d'associer notre marquage BrdU à une incorporation plus courte d'un autre analogue de l'ADN tel que l'EdU (pulse avant irradiation). Ainsi nous pourrions déterminer si après IR/H₂O₂, la production d'ADN cytosoliques peut se faire au niveau du brin naissant.

Finalement, les IR produisent un large éventail de type de dommages, il est donc plus difficile de déterminer quelle classe de dommages et donc quel mécanisme de réparation est à l'origine de la production d'ADN cytosoliques. Il serait intéressant de tester le rôle de SLX4 dans la production d'ADN cytosoliques avec des drogues produisant des types de dommages plus sélectifs, par exemple, des dommages produisant des ICL comme la Mitomycine C. Etant donné que SLX4 participe à la réparation des ICL et que celle-ci se fait majoritairement au niveau des fourches, il est possible que les ICL radio-induits puissent être à l'origine de la production d'ADN cytosoliques.

3 La réversion des fourches de réplication : l'origine de la production d'ADN cytosoliques ou juste une étape ?

Une autre manière de déterminer si la production d'ADN cytosoliques après IR a lieu au niveau des fourches de réplication est de compléter mes données obtenues après siRNA FANCM, SMARCAL1 ou RAD51. En effet, mes données suggèrent que le mécanisme de réversion des fourches de réplication est une étape nécessaire à la production d'ADN cytosoliques après irradiation. Nous sommes aussi en train de réaliser des KO pour FANCM et des KO pour SMARCAL1 par CRISPR-Cas9 afin de confirmer le rôle de ces acteurs. Néanmoins, si les ROS et autres types de dommages à l'ADN sont connus pour induire des réversions de fourches, l'impact des radiations sur la réversion reste inconnu. Il serait intéressant de vérifier par microscopie électronique la présence de fourches reversées ainsi que leur cinétique de formation après IR. Dans la littérature, il a été montré que l'inhibition d'ATR est capable d'augmenter la production d'IFN de type I après radiations ionisantes (Feng et al., 2020). Par ailleurs, une inhibition d'ATR entraîne un excès de réversion par SMARCAL1 provoquant une formation de CDB médiée par clivage dépendant de SLX4 (Couch et al., 2013a). Ces études suggèrent que la réversion de fourche pourrait être une étape nécessaire à l'activation des voies STING et MAVS après IR, probablement dû à la production d'ADN (ou ARNdb) cytosoliques. Il serait intéressant de dépléter SLX4 ou SMARCAL1 après inhibition d'ATR afin de déterminer si l'activation des voies de l'inflammation est dépendante de la réversion et de SLX4 dans cette étude (Feng et al., 2020a).

Mes résultats montrent aussi une implication potentielle de RAD51 dans la production d'ADN cytosoliques. RAD51, en plus de son rôle dans la RH, est nécessaire à la réversion des fourches de réplication notamment par son action de protection du brin naissant d'ADN (Zellweger et al., 2015a). Dans mes expériences, un siRAD51 inhibe la production d'ADN cytosoliques radio-induite, ce qui conforte les résultats obtenus après siRNA FANCM ou SMARCAL1 et notre hypothèse sur la nécessité de réversion de fourche. De manière intéressante, il a été proposé que RAD51 et RPA peuvent se lier à des fragments d'ADN simple brin, micro injecté dans la cellule et empêcher ainsi leur libération dans le cytosol (Wolf et al., 2016a). Par ailleurs, une étude montre qu'une déficience de RAD51 induit une augmentation de la production d'ADN cytosoliques dépendante de MRE11, dans les cellules en phase S/G2, après IR par des ions fer à haut LET. Il est possible que cela soit dû à la perte de protection des fourches de réplication

bloquées en cas de défaut de RAD51 (Bhattacharya et al., 2017a). Les dommages générés par les IR à au LET sont plus complexes que ceux à faible LET (Georgakilas et al., 2013a) comme ceux que j'ai utilisé (rayon γ). Les mécanismes de réparation utilisés par la cellule pour réparer les dommages complexes pourraient être différents que ceux utilisés après faible LET et pourrait expliquer notre différence de résultat. Comme RAD51 participe à la RH, en plus de participer à la réversion, il est possible que la diminution d'ADN cytosoliques radio-induite observées après siRAD51 soit due à une inhibition de la RH. L'implication de RAD51 au niveau de la réversion repose sur son rôle protecteur et non sur sa capacité à former une jonction de Holliday. Il serait donc intéressant d'étudier le rôle de formes mutées de RAD51 ne pouvant former un filament stable, mais toujours capable de se fixer et de protéger l'ADN. Nous pourrions alors dissocier le rôle de RAD51 entre la RH et la réversion, sur la production d'ADN cytosoliques.

Etant donné que FANCM, SMARCAL1 et RAD51 ont des rôles dans des mécanismes autres que la régression, il est nécessaire d'étudier l'implication d'autres facteurs de la réversion. ZRANB3 et HLTf par exemple, participent au mécanisme de réversion et n'ont à ce jour, que des activités connues au niveau des fourches de réplication bloquées. A l'inverse, il est possible d'inhiber le mécanisme de réversion. Par exemple la surexpression de PRIMPOL a été montrée comme inhibant la réversion de fourche (Quinet et al., 2020). Etudier l'impact de ces facteurs nous permettrait d'affirmer que la réversion est un mécanisme nécessaire à la production d'ADN cytosoliques.

La réversion pourrait donc être un mécanisme essentiel à la production d'ADN cytosoliques radio-induite. De plus, SLX4 et ses partenaires sont capables de cliver les fourches reversées. Il serait possible d'étudier le recrutement de SLX4 au niveau des fourches par SIF. Cette technique permet de visualiser en microscopie si des protéines sont recrutées à proximité des fourches en cours de réplication (Roy et al., 2018). Ainsi nous pourrions vérifier le recrutement de SLX4 au niveau des fourches de réplication après IR, et sa dépendance vis-à-vis de protéines impliquées dans la régression des fourches (SMARCAL1, FANCM...). Cela nous permettra de mettre en lien, SLX4, réversion de la fourche et ADN cytosolique.

Pour l'instant, mes résultats ne permettent pas de préciser si le clivage de la fourche reversée elle-même est à l'origine de la production d'ADN cytosoliques, ou si elle est juste un intermédiaire. Il a été proposé que le retournement de la fourche reversée par RECQ1,

associée à RECQ5, facilite les clivages SLX4-MUS81 dépendants, et le redémarrage de la réplication (Chappidi et al., 2020). Ainsi la réversion de la fourche ne serait qu'une étape intermédiaire afin de ramener la lésion sur une partie d'ADNdb et l'éliminer par l'action de NEIL1 (Hegde et al., 2013a) ou d'une glycosylase telle que NTH1 avant sa restauration. La fourche serait alors clivée par SLX4 et ses partenaires, menant à la production d'ADN cytosoliques. Afin de déterminer si la fourche reversée est la structure clivée par SLX4 à l'origine de l'ADN cytosolique, il est possible de la déprotéger en déplétant WRNIP. En effet, il a été montré que WRNIP empêche les clivages par SLX4 des fourches reversées (Porebski et al., 2019). En inhibant le retournement de la fourche reversée par une co-déplétion de RECQ1, nous pourrions préciser le substrat de SLX4 nécessaire à la production d'ADN cytosoliques.

4 Nécessité d'une étape de résection pour la production d'ADN cytosoliques ?

Finalement, un clivage par SLX4 et ses partenaires mène à la formation d'une CDB pouvant être prise en charge par la RH, qui nécessite une étape de résection. En effet, MRE11 amorce la résection par un clivage avec son activité endonucléase à quelque dizaines de nucléotides de l'extrémité de la CDB, suivie d'une résection 3'5' via son activité exonucléase (Cejka, 2015). Celle-ci est alors poursuivie de manière plus importante par EXO1 et BLM/DNA2 (Nimonkar et al., 2011). De plus, MRE11 peut agir au niveau des fourches bloquées et permet l'agrandissement des portions d'ADNsb, favorisant ainsi la fixation de RAD51 et la réparation (Costanzo, 2011). Par ailleurs, MRE11 a été montrée comme pouvant dégrader les fourches reversées en cas de déprotection de ces dernières comme lors d'une déficience de BRCA1/2 (Lemaçon et al., 2017; Mijic et al., 2017b). En cas de déficience de SAMHD1, MRE11 ou d'autres endonucléases, sont impliquées dans la production d'ADN cytosoliques (Coquel et al., 2019). Après irradiation, MRE11 a été montrée comme impliquée dans la production d'ADN cytosoliques en cas de déficience en RAD51 (Bhattacharya et al., 2017a). Une autre étude montre qu'un siMRE11 (cette fois sans déficience de RAD51) n'impacte pas la production d'ADN cytosoliques après IR, elle serait plutôt dépendante d'EXO1 et de BLM (Erdal et al., 2017a). Cependant dans cette étude, la quantité générale (en condition non traitées aussi) d'ADN cytosoliques diminue en cas de siEXO1 et/ou BLM. Après IR, il y a toujours une production d'ADN cytosoliques radio-induite.

Le rôle de la résection après IR dans le mécanisme de production d'ADN cytosoliques reste donc à préciser. Il est possible que dans mon étude, une partie de l'ADN cytosolique radio-induit ait pour origine une étape de résection suite à la formation d'une CDB médiée par SLX4. Il serait donc intéressant de vérifier l'impact d'une inhibition de MRE11 dans le mécanisme de production d'ADN cytosoliques après IR. Nous pouvons notamment utiliser des inhibiteurs spécifiques des fonctions endonucléases ou exo nucléases de MRE11 afin de déterminer leur importance dans la production d'ADN cytosoliques. Outre la visualisation de la production d'ADN cytosoliques, il serait important de vérifier la présence d'une résection par fibre ou peignage d'ADN. Ces techniques sont basées sur l'incorporation séquentielle de 2 analogues de la thymidine : l'IdU et le CldU. La visualisation en microscopie des 2 brins marqués permet d'étudier plusieurs paramètres de la fourche de réplication comme sa progression, sa symétrie, ainsi que la dégradation nucléotidique (Bianco et al., 2012; Quinet et al., 2017). J'ai d'ailleurs participé à la mise en place de la technique de fibre d'ADN au laboratoire lors de mon stage de Master 2. Ces techniques nous permettraient tout d'abord de caractériser le stress répliatif après IR dans nos conditions. Il n'existe que peu de données dans la littérature mis à part une étude après 1Gy d'IR à haut LET (Bhattacharya et al., 2017a). Par la suite nous pourrions observer si une étape de résection a lieu après IR. Nous vérifierons la dépendance pour cette résection, de MRE11, de SLX4, d'acteurs de la réversion de fourche ainsi que des ADN glycosylases étudiées.

5 Nouveau rôle des ROS dans la production d'ADN cytosoliques

Mes résultats montrent un rôle nouveau des ROS dans le mécanisme de production d'ADN cytosoliques après IR. A l'inverse d'un traitement H₂O₂ seul, un prétraitement antioxydant avant IR avec du NAC inhibe la production d'ADN cytosoliques. De plus NTH1 participe à la production d'ADN cytosoliques radio-induits. Les ROS ont été montrés comme pouvant induire des réversions de fourche (Zellweger et al., 2015a). De plus, il a été proposé que NEIL1 participe à la réversion des fourches de réplication (Cf chapitre 2.2.5 Stress oxydant et BER) (Hegde et al., 2013a). Nous avons donc émis l'hypothèse que les ROS radio-induits génèrent un stress répliatif. En effet, certaines lésions oxydatives sont bloquantes pour la réplication générant un stress répliatif comme les TG (Aller et al., 2007). Il a été montré qu'un traitement H₂O₂ pouvait réduire la vitesse de la réplication (Wilhelm et al., 2016a) et augmenter le

nombre de fourches inversées (Zellweger et al., 2015b), de fourche bloquées ainsi que leur résection (Klattenhoff et al., 2017a). La réversion des fourches après ROS radio-induits serait médiée par SMARCAL1 et FANCM. Cette réversion serait déclenchée par une glycosylase, ici NEIL1 comme proposé dans le modèle de réparation pré-répllicative par Hegde et al (Figure 31).

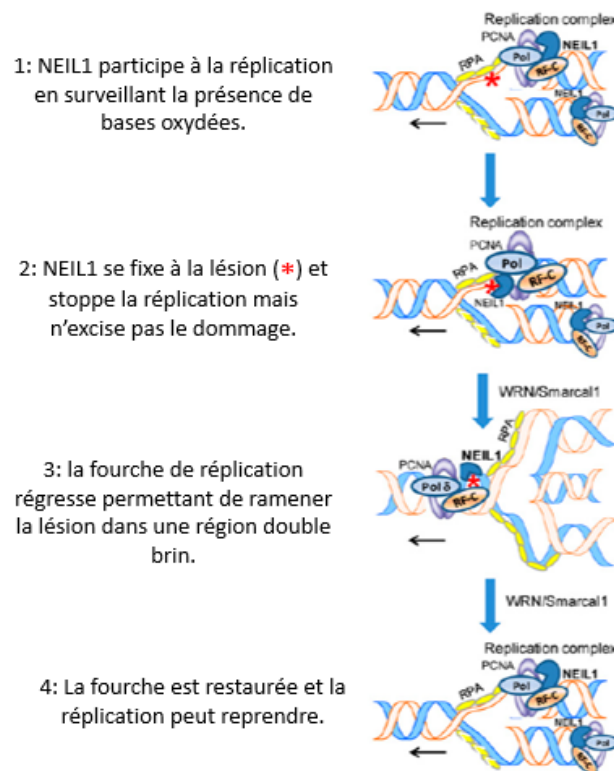


Figure 31 : Modèle de NEIL1 agissant comme un « cow catcher ». Voir texte. Issus de (Hegde et al., 2013a)

Une fois la fourche inversée, celle-ci pourrait être clivée par SLX4, menant à la production d'ADN cytosoliques. D'ailleurs, mes résultats montrent qu'un siSLX4 inhibe la production d'ADN cytosoliques provoquée par un traitement H₂O₂. Mes données montrent un rôle significatif de NTH1, néanmoins celle-ci n'est pas incluse dans le modèle de Hegde et al. En effet, il a été montré *in vitro* que NTH1 ne peut pas se fixer à de l'ADN simple brin, contrairement à NEIL1. Par ailleurs, l'expression de NEIL1 (Hazra et al., 2002) et de NEIL3 (Neurauter et al., 2012a) est augmentée en phase S. C'est pourquoi les auteurs de cette étude n'ont pas étudié le rôle de NTH1 dans la réplication. Cependant, NTH1 ainsi que d'autres ADN glycosylases, ont été retrouvées en IPOND au niveau des fourches de réplication (Bjørås et al., 2017a). L'expression de NTH1 se retrouve aussi augmentée en phase S (Luna et al., 2000). D'ailleurs, la surexpression de NTH1 a été montrée comme générant des dommages à l'ADN

et un stress répliatif, et cela indépendamment de son activité catalytique. La surexpression de NTH1 mène aussi à une augmentation de micro-noyaux (Limpose et al., 2018a). Mes résultats préliminaires montrent que la surexpression de NTH1 induit une production d'ADN cytosoliques plus importante, probablement médiée par un stress répliatif. NTH1 semble donc avoir un rôle au niveau des fourches de répliation, mais celui-ci reste indéterminé. Plusieurs expériences sont à réaliser afin de compléter nos données sur un potentiel lien entre ROS, ADN glycosylases, réversion de fourches et production d'ADN cytosoliques par SLX4.

Tout d'abord, il nous faudra confirmer le rôle de la surexpression de NTH1, et compléter les résultats obtenus avec NEIL1. Par ailleurs, il est important de connaître si la production d'ADN cytosoliques après surexpression de NTH1 est dépendante dans un premier temps de SLX4, puis dans un second temps, de protéines participant à la réversion de fourches telles que SMARCAL1 et FANCM. Nous avons à notre disposition, des plasmides nous permettant d'exprimer des mutants catalytiques de NTH1 et de NEIL1, toujours capables de se fixer à l'ADN mais pas d'exciser la base oxydée. Cela nous permettra de déterminer si l'incision de la base endommagée par la glycosylase participe à la production d'ADN cytosoliques ou si le rôle des ADN glycosylases passe seulement par la réversion de fourches. Si les ADN glycosylases participent à la réversion des fourches en signalant des dommages oxydatifs, il serait intéressant d'étudier si le recrutement de SLX4 aux fourches est dépendant de NTH1/NEIL1 par SIRF. Par la suite, le rôle de NTH1 au niveau de la répliation n'ayant pas été étudié, il sera important de nous y intéresser si nous voulons préciser l'importance de NTH1 dans notre modèle de production d'ADN cytosoliques. Il nous faut donc étudier l'impact de la déplétion ou de la surexpression de NTH1, et/ou NEIL1, sur la répliation par fibre d'ADN. Finalement, le rôle d'autres ADN glycosylases, notamment NEIL3 dont l'expression est accrue en phase S, pourra aussi être précisé.

6 Rôle potentiel des conflits transcription-répliation

Mes résultats montrent que la déplétion de RTEL1 diminue significativement la production d'ADN cytosoliques radio-induite. RTEL1 a été montrée comme étant un nouveau partenaire « direct » de SLX4. Cette interaction est nécessaire pour prévenir les conflits transcription-répliation (conflits T-R). De plus, le rôle de SLX4 dans la gestion des conflits T-R serait indépendant de ses SSE partenaires (SMX) (Takedachi et al., 2020). D'autres résultats

montrent que RTEL1 prévient l'accumulation de R-Loops, facilitant ainsi la réplication. Une perte de SLX4 diminue le recrutement de RTEL1 au niveau des R-Loops. Il a été proposé que l'élimination des R-Loops est nécessaire afin que SLX4 et ses SSE puissent accéder aux fourches de réplifications bloquées (Wu et al., 2020, p. 1). Etant donné que mes résultats montrent un rôle de RTEL1, il est possible que la génération de conflits T-R et la présence de R-Loops participent au stress réplcatif et à la production d'ADN cytosoliques. De plus, il a été montré que les ROS pouvaient induire la formation de R-Loops (Tan et al., 2020; Teng et al., 2018). C'est d'autant plus important que les R-Loops ont été montrées comme pouvant induire des réversions de fourches (Chappidi et al., 2020). Les R-Loops peuvent médier la production d'ADN cytosoliques (Shen et al., 2015), voire, se retrouver dans le cytoplasme des cellules (Koo et al., 2015). Les hybrides ARN : ADN cytoplasmiques sont aussi reconnus par cGAS et peuvent déclencher la voie STING (Mankan et al., 2014).

Il nous faudra donc déterminer dans un premier temps, si les conflits T-R participent à la production d'ADN cytosoliques. Pour les conflits T-R, il est possible de vérifier leur présence par des PLA PCNA et RNAPol II après IR. Afin de déterminer s'ils participent à la production d'ADN cytosoliques, nous pourrions inhiber la transcription avant IR avec de la cordycépine. Dans un second temps, nous pourrions étudier l'importance des R-Loops dans les mécanismes de production d'ADN cytosoliques après IR. Si les R-Loops participent à la production d'ADN cytosoliques, la surexpression de la RNase H1 ou H2 qui les dégradent, devrait diminuer la production d'ADN cytosoliques comme dans l'étude de l'équipe de Stephan Gasser (Shen et al., 2015). Ces résultats nous permettraient de proposer un autre modèle de production d'ADN cytosoliques : après IR, les dommages directs ou les ROS génèrent des conflits T-R. Ces derniers produisent ou stabilisent des R-Loops, menant à des réversions de fourches. RTEL1, coordonnée par SLX4, pourrait permettre de résoudre les R-Loops, avant clivage de la fourche par les SSE, menant à la production d'ADN cytosoliques.

7 Impact sur l'inflammation et le cancer

Mes résultats montrent que l'activation de la voie MAV et STAT1 est inhibée en cas de déplétion de SLX4. Le rôle des différents acteurs, identifiés pour la production d'ADN cytosoliques, dans le déclenchement d'une réponse immunitaire innée pourra être examiné. Outre l'impact de leur déplétion/surexpression sur la production de facteurs inflammatoires,

des tests de recrutement de cellules immunitaires sont en train d'être mis en place au laboratoire par Paul Wanschoor. Ces expériences nous permettront de déterminer si la perte de SLX4, d'ADN glycosylases ou d'acteurs de la réversion impactent le recrutement de cellules immunitaires. De plus, nous pourrions déterminer quelle voie du système innée est impliquée dans la réponse immune innée en utilisant des antagonistes de cGAS ou de MDA5/RIG1.

En plus des lignée humaines KO pour les différents acteurs que nous sommes en train de réaliser par CRISPR-Cas9, nous allons aussi créer des lignée KO pour SLX4 et NTH1 en cellules murines. Nous pourrions utiliser des cellules de cancers mammaires murines telles que les 4T1, et les implanter dans les coussins adipeux mammaires de souris afin de conserver le microenvironnement local. Il sera alors possible de reproduire des IR médicales grâce au SARRP, un irradiateur à rayon X pour le petit animal, proche de ce qui est utilisé en radiothérapie. Nous pourrions alors étudier l'impact d'une déficience en SLX4/NTH1 ou d'autres acteurs dans la réponse à la radiothérapie. Cela pourrait permettre à long terme de prédire l'efficacité de la radiothérapie.

La réalisation du crible à haut débit nous permettra d'identifier de nouvelles molécules permettant de moduler la production d'ADN cytosolique. Ces molécules pourront être utilisées en association avec la radiothérapie et d'améliorer son efficacité ou de moduler ses effets secondaires.

De manière intéressante, l'hypoxie est une caractéristique commune des tumeurs et est associée à une résistance à la radiothérapie. Il a été suggéré que cette résistance soit due à une plus grande difficulté de générer des ROS dans les tumeurs hypoxiques (Horsman MR, 2009). En effet, les radicaux produits après IR réagissent avec l'oxygène afin de générer des dommages. Néanmoins, dans des conditions hypoxiques, cette réaction est impossible. Typiquement, afin de reproduire les dommages générés en normoxie, il faut irradier à une dose 2.5 à 3 fois plus haute (Horsman MR, 2009). Par ailleurs, les cellules cancéreuses hypoxiques possèdent une capacité de détoxification des ROS accrue (Koritzinsky and Wouters, 2013; Semenza, 2017). De plus, l'hypoxie participe significativement à la réponse inflammatoire à la radiothérapie et est associée à un rôle immunosuppresseur (Sørensen and Horsman, 2020; Wang et al., 2019). D'après mes résultats, il est possible de penser que les tumeurs hypoxiques subissent moins les effets des ROS après IR, diminuant ainsi la quantité d'ADN cytosoliques produits, ainsi que la réponse immune innée associée. Il serait

intéressant de déterminer si le niveau de O₂ impacte la production d'ADN cytosoliques après IR.

8 Les différents modèles de production d'ADN cytosoliques après radiations

Finalement, mes résultats permettent de proposer plusieurs modèles de production d'ADN cytosoliques après IR (figure 32). Les IR produisent des dommages directs et des ROS menant entre autre, à la production de bases oxydées telles que les thymines glycol. NEIL1, en amont du réplisome sur la partie d'ADNsb, signale le dommage oxydatif et favorise la réversion de fourche par FANCM et/ou SMARCAL1. Il est possible que NTH1 participe aussi à ce processus, cependant d'après les données de la littérature, NTH1 se fixe uniquement à l'ADNdb. Selon la nature du dommage, NTH1 ou une autre glycosylase pourrait être nécessaire par la suite pour exciser la base oxydée. Une fois la réversion effectuée, le dommage oxydatif est éliminé par une glycosylase laissant place à une brèche d'ADNsb. Cette étape pourrait être poursuivie par la voie du long patch de la réparation du BER, étape qui pourrait être à l'origine d'une production d'ADN cytosoliques. A la suite de cela, la fourche inversée est clivée par SLX4 et ses partenaires. Si la brèche d'ADN simple brin est toujours présente, SLX1 ou MUS81 pourraient alors cliver. Sinon l'action de MUS81 et potentiellement SLX1 coordonnées par SLX4 permettrait la formation d'une CDB. Il a été aussi proposé que SLX1 et XPF, coordonnées par SLX4, puissent cliver les fourches inversées en cas de défaut de WRNIP (Porebski et al., 2019). Alternativement, la fourche de réplication peut être restaurée par RECQ1 et être alors prise en charge par SLX4 et MUS81/SLX1. Le clivage de la fourche peut être à l'origine de la production d'ADN cytosoliques. Cependant, il est possible que l'ADN cytosolique soit produit lors d'une étape de résection pendant le redémarrage de la fourche. Parallèlement, les ROS mènent à la formation de R-Loops, pouvant mener à des réversions de fourches. SLX4 et RTEL1 participent à l'élimination de la R-Loops, permettant de rendre la fourche accessible à SLX4 et ses partenaires, ou à RECQ1 pour le retournement.

Quant à la nature de l'ADN cytosolique, cette question reste en suspens. Au cours de ma thèse, j'ai réalisé des marquages en immunofluorescence avec un anticorps spécifique des TG. Mes résultats préliminaires montraient une production de TG cytosoliques après IR. La cinétique de production des TG cytosoliques était comparable à celle des ADN cytosoliques marqués au BrdU. Cela suggérerait qu'un mécanisme clive en amont et en aval du TG, permettant sa

libération dans le cytosol. Aussi, ces TG cytosoliques pourraient être originaires de « clusters » de dommages formés après IR où des tentatives de réparations ont eu lieu. Néanmoins dans ces expériences, il n'était pas possible de déterminer si le fragment d'ADN cytosolique avait été clivé car il contenait un TG, ou si celui-ci rencontrait des ROS sur le chemin du cytosol. Les ADN cytosoliques pourraient aussi être originaire des télomères. En effet, les télomères sont sensibles aux ROS et au stress réplicatif. De plus, ils peuvent être retrouvés dans le cytoplasme dans les cellules ALT. Il serait possible de réaliser un marquage télomérique et de quantifier le signal cytoplasmique. Par ailleurs, les sites fragiles sont à l'origine de stress réplicatifs et à l'origine de formation de R-Loops. Extraire l'ADN cytosolique et le séquencer nous permettrait d'identifier la présence de site fragiles ou de télomère afin de mieux comprendre l'origine des ADN cytosoliques.

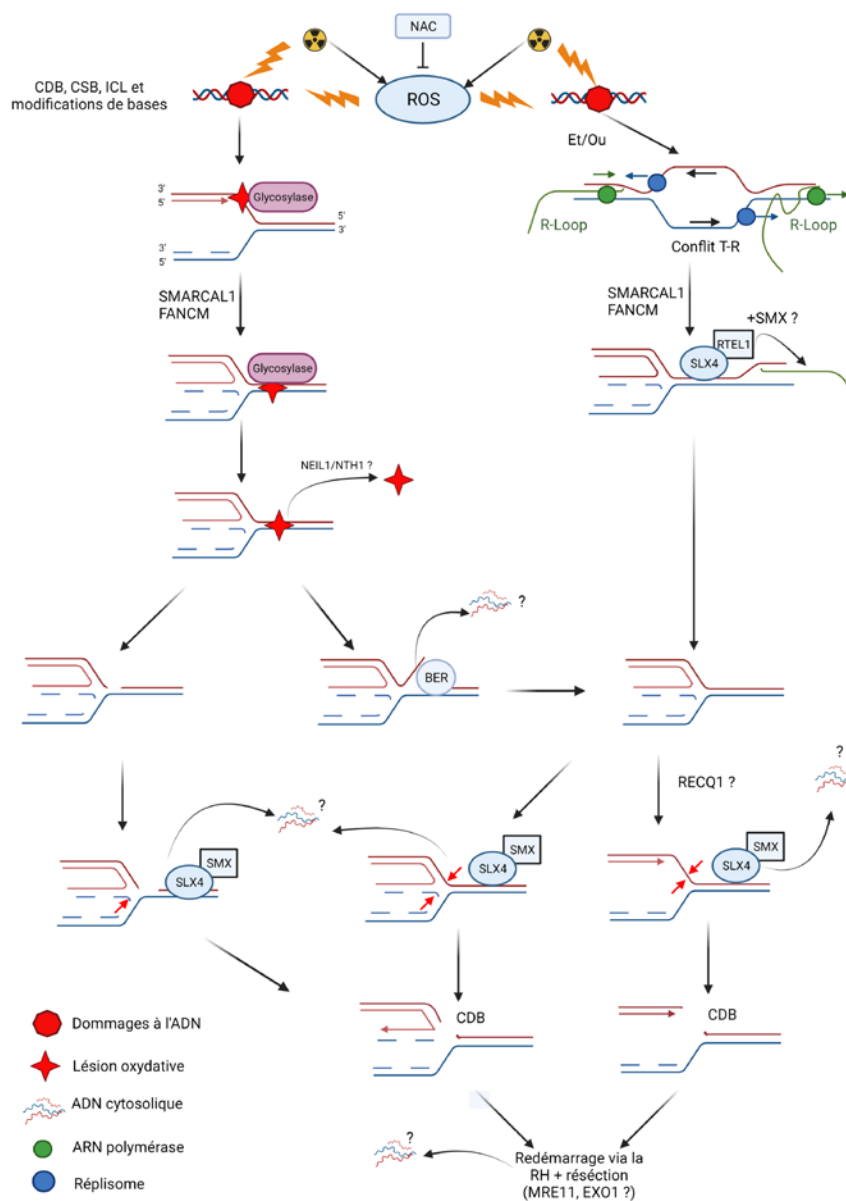


Figure 32 : Modèle de production d'ADN cytosoliques après IR. Figure originale

Conclusion

Le stress réplicatif, potentiellement médié par les ROS générés durant l'irradiation, et les structures intermédiaires formées par les fourches de réplication sont essentielles à la production d'ADN cytosoliques. Dans leur ensemble, mes résultats montrent que, en plus de son rôle dans de nombreux mécanismes de réparation, SLX4 participe à la production d'ADN cytosoliques après un stress génotoxique ainsi qu'à l'activation du système immunitaire inné qui en découle. J'ai pu montrer l'implication de protéines impliquées dans la réparation des bases oxydées dans le mécanisme de production d'ADN cytosoliques. Mon travail a permis de proposer un lien entre ROS, stress réplicatif, ADN glycosylases et SLX4 via une structure commune : la fourche inversée. Cela nous a permis de proposer un modèle de production d'ADN cytosoliques après IR.

La voie STING et la production d'ADN cytosoliques ont été montrées comme participant à l'efficacité des traitements anti tumoraux comme la RT ou l'immunothérapie. Des cellules cancéreuses déficientes pour SLX4 répondront probablement moins bien à la radiothérapie. A l'inverse, NTH1 qui est retrouvé surexprimé dans certains types de cancers, pourrait favoriser ce type de thérapies anti cancéreuses. Comprendre les mécanismes de production d'ADN cytosoliques pourraient à long terme nous permettre de prédire ou moduler l'efficacité des différents traitements anti tumoraux.

Matériels et méthodes supplémentaires

Culture cellulaire

Les cellules HeLa contenant un système inductible à la doxycycline permettant d'exprimer une forme de SLX4 mutante pour son interaction avec RTEL1 (SLX4-LP) (Takedachi et al., 2020,) sont un don généreux du Dr Pierre-Henri Gaillard. Elles sont cultivées dans du Dulbecco modified eagle medium supplémenté avec 10% de sérum de veau fetal sans tétracycline, de la pénicilline (200IU/ml) à 37°C avec 5% de CO₂. Afin de maintenir les sites FRT, le milieu des cellules HeLa est supplémenté en Blastidicine (2µg/mL) et Hygromycine B (100µg/mL). Pour l'incorporation de BrdU, les cellules sont incubées avec 10µM de BrdU pendant 36h, avant de retourner dans un milieu sans BrdU avant irradiation. L'induction à la DOX est réalisée 48h avant irradiation à Transfection

80 × 10³ (MCF7) ou 40 × 10³ (HeLa) cellules furentensemencées 48h avant IR. Les cellules furent transfectées avec 10µM de siRNA spécifiques ou issus d'un pool de siRNA sans cibles (Dharmacon). La transfection a été réalisée en suivant les instructions du constructeur avec de l'INTERFERin (Polypus transfection). Les siRNA 5'3' UTR sont un mix de 2 séquences de siRNAs :

SLX4 UTR87 (GCACCAGGUUCAUAUGUAUdTdT)

SLX4 UTR7062 (GCACAAGGGCCCAGAACAAdTdT)

De plus, les siRNA RTEL1 (L-013379-00-0005), ou le pool de siCTRL (D-001810-10-50) furent acheté chez Dharmacon.

Immunofluorescence

Les expériences d'immunofluorescences ont été réalisées comme décrits dans l'article de ma thèse. Un anticorps spécifique anti-TG (JAI-MTG-100P, Adipogen) a été utilisé pour les immunofluorescence des TG.

Annexes

A link between Replicative stress, Lamin proteins, and inflammation

Review

A Link between Replicative Stress, Lamin Proteins, and Inflammation

Simon Willaume [†], Emilie Rass [†], Paula Fontanilla-Ramirez [†], Angela Moussa, Paul Wanschoor and Pascale Bertrand ^{*}

Université de Paris and Université Paris-Saclay, INSERM, iRCM/IBFJ, CEA, UMR Stabilité, Génétique Cellules Souches et Radiations, F-92265 Fontenay-aux-Roses, France; simon.willaume@cea.fr (S.W.); emilie.rass@cea.fr (E.R.); phdfontanilla@gmail.com (P.F.-R.); angela.moussa@hotmail.com (A.M.); paul.wanschoor@cea.fr (P.W.)

^{*} Correspondence: pascale.bertrand@cea.fr

[†] These authors contributed equally to this work.

Abstract: Double-stranded breaks (DSB), the most toxic DNA lesions, are either a consequence of cellular metabolism, programmed as in during V(D)J recombination, or induced by anti-tumoral therapies or accidental genotoxic exposure. One origin of DSB sources is replicative stress, a major source of genome instability, especially when the integrity of the replication forks is not properly guaranteed. To complete stalled replication, restarting the fork requires complex molecular mechanisms, such as protection, remodeling, and processing. Recently, a link has been made between DNA damage accumulation and inflammation. Indeed, defects in DNA repair or in replication can lead to the release of DNA fragments in the cytosol. The recognition of this self-DNA by DNA sensors leads to the production of inflammatory factors. This beneficial response activating an innate immune response and destruction of cells bearing DNA damage may be considered as a novel part of DNA damage response. However, upon accumulation of DNA damage, a chronic inflammatory cellular microenvironment may lead to inflammatory pathologies, aging, and progression of tumor cells. Progress in understanding the molecular mechanisms of DNA damage repair, replication stress, and cytosolic DNA production would allow to propose new therapeutical strategies against cancer or inflammatory diseases associated with aging. In this review, we describe the mechanisms involved in DSB repair, the replicative stress management, and its consequences. We also focus on new emerging links between key components of the nuclear envelope, the lamins, and DNA repair, management of replicative stress, and inflammation.

Keywords: DNA replication stress; lamins; Hutchinson-Gilford progeria syndrome; inflammation; senescence; aging; cancer; cGAS-STING pathway; double-strand break repair; genome instability



Citation: Willaume, S.; Rass, E.; Fontanilla-Ramirez, P.; Moussa, A.; Wanschoor, P.; Bertrand, P. A Link between Replicative Stress, Lamin Proteins, and Inflammation. *Genes* **2021**, *12*, 552. <https://doi.org/10.3390/genes12040552>

Academic Editor: Anja Katrin Bielinsky

Received: 11 February 2021

Accepted: 8 April 2021

Published: 9 April 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

DNA replication progression is constantly being challenged. Indeed, as a result of DNA lesions induced by both endogenous and exogenous agents, replication forks (RFs) can be slowed down or arrested. Moreover, inherent RF obstacles such as active transcription mechanism, tightly bound protein–DNA complexes, unusual DNA structures, and oncogene activation could also obstruct the progression of RFs. Replication stress is defined as the temporary slowing or stalling of RFs due to the encountered obstacles. In response to replication stress, mechanisms allow the DNA replication machinery to overcome DNA lesions or intrinsic RF obstacles. Therefore, replication stress response is crucial to safeguard the faithful transmission of genetic information to daughter cells [1,2].

Several mechanisms implicated in the response to replication stress have been identified. RFs are submitted to controlled remodeling and processing by the action of several specialized proteins to overcome DNA lesions [2]. To ensure the integrity of RFs during

the process, forks are protected from nucleolytic degradation such as a potential (over)-resection that would have deleterious consequences on genomic stability [3]. Moreover, increasing evidence implicates DNA damage persistence and replication stress in the activation of immune responses. Indeed, the induction of replication stress and a defective DNA damage response (DDR) can lead to the presence of self-derived DNA in the cytoplasmic compartment [4,5]. Specialized cytoplasmic sensors detect the presence of DNA as a danger signal, thereby triggering the innate immune response. Although the mechanisms of DNA extrusion remain elusive, several studies point to a compromised nuclear structure as one of the main plausible reasons leading to the presence of endogenous DNA in the cytoplasm [6,7]. Of note, the rupture of the nuclear envelope (NE) has been associated with defects in the nuclear lamina (NL), a fibrous network lining the inner side of the NE. Nuclear lamins are proteins that participate in several crucial cellular processes widely beyond granting support and structure to the NE. Such a role of lamins is seen in DNA replication and DNA repair. Although the role of lamins in these processes requires further characterization, several studies propose that disruption in the integrity of nuclear lamins might hinder the recruitment of key factors of DNA replication and RF protection. Moreover, pathologies involving lamins alterations such as laminopathies are characterized by nuclear fragility and DNA damage accumulation, which in turn might contribute to strengthening the recently described DNA damage-induced inflammation [8]. Here, we review the mechanisms of the replication-stress response and their connection with the emerging crosstalk between replication stress and the immune response. Moreover, we highlight the role of nuclear integrity, namely the role of lamin proteins, which are the main components of the NL, in the maintenance of genome stability. Understanding the mechanisms that underlie genome stability and the innate immune response is crucial and may contribute to the development of therapy against cancer and aging.

2. Mechanisms of Double-Strand Break Repair

Different cellular mechanisms ensure genome stability upon DNA damage. Among the most toxic DNA lesions are double-strand breaks (DSBs). Programmed DSBs are induced during meiosis and V(D)J recombination to ensure genome variability or adaptability. Recently, genomic regions with recurrent DSBs in primary neural stem cells were identified, potentially generating neuronal diversity [9]. Moreover, induction of physiological DSB was observed in promoters of specific genes regulating their expression during neurogenesis [10]. DSBs also arise from endogenous cellular metabolism or can be induced upon exogenous genotoxic stresses such as in anti-cancer therapy or accidental exposure to genotoxic agents. Once DSBs are detected, a DDR is triggered to stop the cell cycle progression, thus providing time for the DNA repair machineries to act. If damages are too significant or if the repair systems are overwhelmed or inefficient, senescence or cell death will be triggered. Altogether, these reactions correspond to the DDR.

Two major repair systems are involved in DSB repair: non-homologous end joining (NHEJ) and homologous recombination (HR) (Figure 1).

2.1. Non-Homologous End-Joining (NHEJ)

NHEJ involves the ligation of DNA extremities without the requirement for homologous sequences. Also unlike HR, it is active in all phases of the cell cycle and the canonical NHEJ pathway (C-NHEJ) does not require resection. First, DSB ends are detected by KU70-KU80 heterodimer, a ring-shaped structure associated with DNA ends, sliding inward along the DNA. A key role of KU in C-NHEJ is the recruitment and activation of DNA-PK protein, for which a role in mediating the synapsis of DNA ends was proposed [11,12]. However, other studies have shown that synapsis could be mediated independently of DNA-PK [13,14]. The catalytically active DNA-PK holoenzyme (DNA-bound KU with the catalytic subunit of DNA-PK) phosphorylates *in vitro* many components involved in the NHEJ process, although *in vivo* the phosphorylation of many factors seems to be dispensable for NHEJ. DNA-PKs also undergo auto- or trans-phosphorylation by ATM

or ATR kinases. By modifying the synaptic complex and allowing accessibility of DNA ends, the phosphorylation of DNA-PKs is important for the potential processing of DNA extremities and their repair. Direct ligation of the DNA ends can be performed by the XRCC4-LIGASE IV complex, an activity that is enhanced by XLF and/or PAXX [15–19]. However, if necessary, enzymes such as ARTEMIS, APLF, PNKP, APRATAXIN or WERNER proteins can process DNA extremities to create ligatable ends. Of note, it has been proposed that XRCC4 and XLF by forming long protein filaments participate in the first step of NHEJ by mediating the synapsis of the two DNA extremities [13,14,20–23]. XLF and APLF bind to KU protein, and this binding has been proposed to be important for DSB repair, survival to ionizing radiation (IR) and the filament formation [24]. Mechanisms of DNA ends synapsis and processing were recently reviewed in [25].

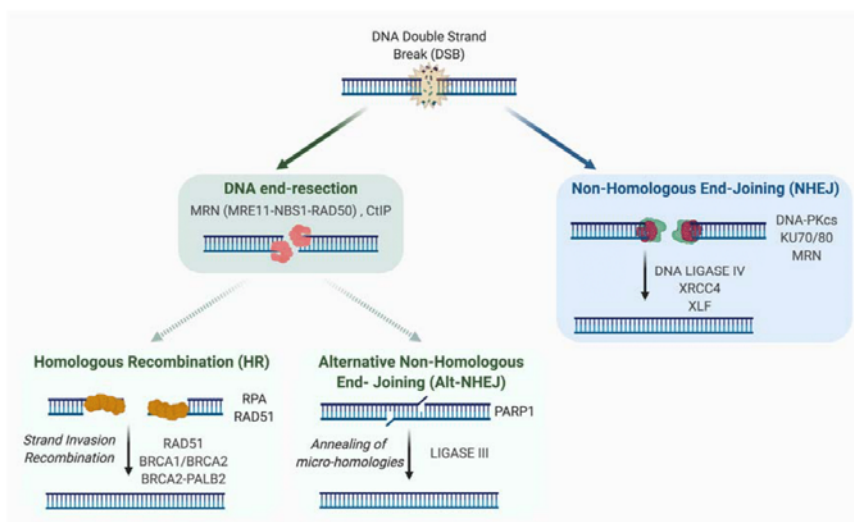


Figure 1. Double-Strand Break Repair Mechanisms. A deficient repair of DSB has detrimental consequences, including genomic instability and cell death. There are two main mechanisms to repair DSBs: HR and canonical NHEJ (C-NHEJ). A pivotal process in the choice of DNA repair pathways is the DNA end-resection. Indeed, if DNA end-resection is blocked, C-NHEJ is favored to the detriment of HR. C-NHEJ involves the ligation of DNA extremities without the requirement for homology and does not require resection. An alternative pathway of NHEJ (Alt-NHEJ) exists and unlike C-NHEJ, it is highly inaccurate and requires short DNA end-resection. Unlike Alt-NHEJ, HR requires extensive DNA end-resection and requires the presence of an intact homologous template.

In 2004, Guirouilh-Barbat et al. described an intrachromosomal substrate allowing the measurement of NHEJ frequency and fidelity in living cells. The use of this substrate allowed the demonstration in living cells that the mechanism of C-NHEJ itself is accurate (confirming previous data in yeast) [26]. In fact, it is the processing event, required when DNA extremities are unligatable, as in case of exposure to IR, which is mainly responsible for small losses or additions of nucleotides at repair junctions.

An alternative pathway of NHEJ (A-NHEJ) exists and unlike C-NHEJ, it is very inaccurate and leads to the production of deletions [26–30]. These deleterious events, described in conditions of C-NHEJ factors, deficiency could be explained by the resection of unprotected DNA ends and the subsequent hybridization of micro-homologies distal to the DNA break. Factors such as PARP1, XRCC1, and LIGASE III had been previously identified (initially by biochemical approaches) to be playing a role in this pathway [31–34]. In 2009, we and others identified the MRE11-RAD50-NBS1 (MRN) complex as a key factor

in the resection step, highlighting its importance in the initiation of A-NHEJ [28,35]. Thus, we had proposed at that time that the competition between A-NHEJ and HR takes place downstream of MRN and is based on the extent of the resection [28,36]. Indeed, unlike HR, which requires extensive resection, A-NHEJ demands only short resection. Additional factors have been shown to be involved in mediating A-NHEJ and inhibiting HR such as PARP3 [37] and POL θ [38–40].

2.2. Homologous Recombination

The HR pathway is an evolutionarily conserved mechanism that participates in the preservation of genome stability and the transmission of genetic information. HR has a key role in the repair of DNA damages, such as DSBs and single stranded DNA (ssDNA) gaps. HR mechanism requires the presence of an intact homologous template, and is therefore active in S/G2 when the sister chromatid is present. Briefly, this template-dependent pathway is initiated by the recognition and binding to the broken ends by the MRN complex, which allows ATM kinase recruitment and activation. Upon ATM activation, a 2-step resection process takes place. The initial short range nucleolytic degradation mediated by the MRN/CtIP complex, favored by BRCA1, is followed by an extensive resection by other nucleases and helicases such as EXO1, DNA2, WRN, or BLM, generating long 3' ssDNA overhangs [41,42]. These protruding ssDNA strands are preserved from degradation by binding of the RPA protein. At a later step, both BRCA2/PALB2 promote the replacement of RPA by RAD51, allowing the formation of RAD51 nucleofilament [43], which mediates homology search and strand invasion, establishing the displacement loop (D-loop). Using the homologous sequence as a template, DNA synthesis will be primed from the 3' end of the invading strand, hence promoting D-loop migration.

Depending on how the intermediates are processed, three main mechanisms have been described as part of the HR pathway [44–46]: gene conversion (GC, also termed double-strand break repair; DSBR), synthesis-dependent strand annealing (SDSA), and break-induced replication (BIR) (see Figure 2 for details).

Even if HR is likely a conservative mechanism, different reports proposed that this homology-directed repair is not fully accurate [47]. Indeed, BIR is largely mutagenic [48].

BIR pathway works when only one end of a break is able to find a homologous template for repair. This situation may ascend when a RF comes across nicked DNA that might convert into one-ended DSB, as well as when one of two broken DSB ends is unable to find a homologous partner. In a last instance, BIR might be employed at eroded telomeres [49–51]. Recent findings indicate that fragile telomeres can arise from BIR-mediated repair of telomeric DSBs [52].

Beside its crucial roles during meiosis, in concerted evolution of some sequences such as globin genes or adaptation, HR is also a vital pathway that allows cells to endure replication stress [53–55]. Indeed, the HR machinery not only participates in sealing ssDNA gaps during DNA replication, but also works as a fork-stabilizer and a restructure of the replisome at collapsed forks upon stress [56]. Moreover, DNA ends or breaks occurring at stalled/collapsed RF are taken in charge by HR players to insure repair and/or resuming of the RF (see Section 3.2.2).

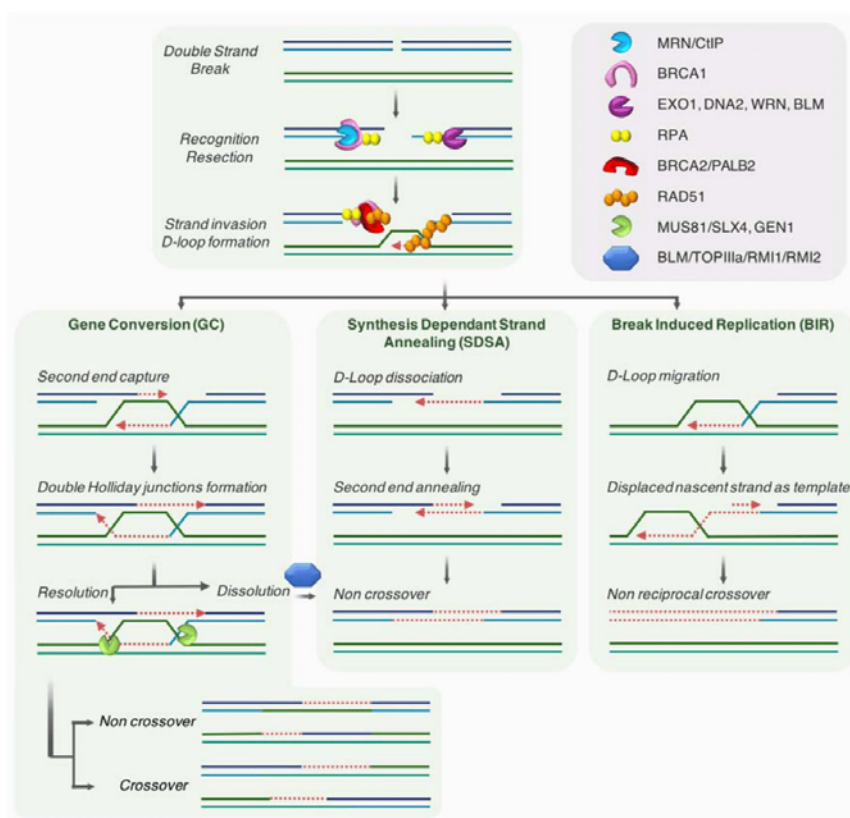


Figure 2. Homologous-directed repair. The initial resection is mediated by the MRN/CtIP complex then followed by an extensive resection by other helicases and nucleases such as EXO1, DNA2, WRN, or BLM, generating long 3' ssDNA overhangs. These protruding ssDNA strands are preserved from degradation by the binding of RPA protein. At a later step, both BRCA2/PALB2 promote the replacement of RPA by RAD51, allowing the formation of RAD51 nucleofilament. This RAD51 nucleofilament mediates the homology search, strand invasion and D-Loop formation. Depending on how the intermediates are processed, three main mechanisms have been described as part of the HR pathway: *Left panel:* In GC, the D-loop extension promotes the annealing of the second end of the break, generating two Holliday junctions (HJ). Dissolution of this two HJ by helicases such as BLM-TOPIIIa-RMI1-RMI2 will generate non-crossover products, while resolution through cleavage by DNA structure-specific nucleases such as MUS81, SLX4 or GEN1, can mediate both crossover and non-crossover products. *Middle panel:* In SDSA, the synthesis mediated from the invading 3' end proceeds until it is sufficient to allow annealing to the 3' end on the other side of the break, and synthesis of both strand goes on until their ligation with the other end of the break. The D-loop is transitory and no HJ is formed, generating non-crossover products. *Right panel:* In the BIR pathway, without a second end of the break available for the repair, the synthesis proceeds through the migration of the D-loop and covers long distance. The lagging strand uses as template, the newly synthesized strand emerging from the D-loop. This mechanism can allow the copy of the entire template, resulting in loss of heterozygosity. Blue and green DNA represent sister chromatids and the newly synthesized DNA is highlighted in red.

3. Replicative Stress

Many obstacles hamper the progress of replication machinery and lead to subsequent slowing or stalling of RFs. This defect in progression of normal replication is commonly

called replicative stress. In this paragraph, we will present the different causes of replicative stress and how this stress is managed.

3.1. Different Causes of Replicative Stress

There are different causes of replicative stress, with either endogenous or exogenous origins (Figure 3).

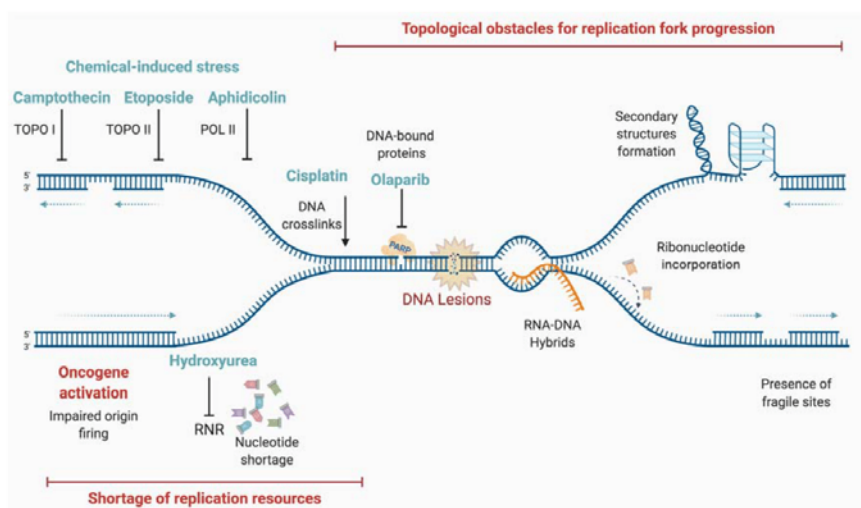


Figure 3. Main sources of replication stress. DNA replication progression is constantly challenged. Replication stress, a major source of genome instability, is defined as the temporary slowing or stalling of RFs due to the encountered obstacles or DNA lesions induced by both endogenous and exogenous agents. Among them are topological obstacles such as G-quadruplexes, the shortage of replication resources, oncogene activation, DNA protein crosslinks, and DNA-RNA hybrids (orange strand). Additionally, several chemicals can induce replication stress by the inhibition of key enzymes for replication or generation of blocking lesions (light blue).

DNA damage, such as oxidative lesions arising from cellular metabolism, is a source of replicative stress. Other endogenous sources of replication stress are difficult-to-replicate regions such as repetitive sequences that can form DNA secondary structures, RNA-DNA hybrids formed by collisions with active transcription machineries, or DNA-protein adducts [57]. In pathological conditions, the activation of some oncogenes leads to rapid cell proliferation, exhaustion of deoxynucleotide triphosphate (dNTP) pools, and replicative stress. It has been reported that this hyper-replicative/proliferative state could be associated with a burst of reactive oxygen species (ROS) that could damage the DNA templates during replication and induce the DDR [58–61]. Finally, exogenous exposure to genotoxic agents (such as cross-linking agents), whether accidental or therapeutical, leads to DNA lesions that could impede the progression of RFs.

3.1.1. Oxidative Lesions: “Natural” Causes of Replicative Stress

A large variety of barriers routinely impede RF progression. Endogenous sources of DNA damage can cause up to approximately 15,000 lesions per cell per day [62]. Among the by-products of cellular metabolism that may cause a replication stress are the ROS. These are endogenous sources of DNA damage [63] that are able to impede the progression of RFs either by directly inducing abasic sites, inter-strand-crosslinks (ICL) and oxidized bases, or by oxidizing factors of genome maintenance such as some replication components. Indeed, studies show that oxidative stress generated by H_2O_2 treatment can lead to the

slowing [64], stalling, or reversion [65] of RFs. In addition, slowed RFs induced by the inactivation of HR proteins (without additional treatment) are rescued by antioxidant treatment showing that this impairment of RF progression is likely due to endogenous ROS [64].

To avoid genome instability, a control of replication speed occurs through the sensing of ROS at forks (such as a consequence of metabolic imbalance due to ribonucleotide reductase (RNR) fluctuation) by PRDX2 and the dissociation of TIMELESS from the replisome [66]. Consequently, the depletion of PRDX2 increases the incidence of ultrafine DNA bridges during anaphase and 53BP1 nuclear bodies during G1 phase, both of which are hallmarks of replicative stress.

Oxidized DNA bases, such as thymine glycol, can block the RF [67]. Yet, other non-blocking lesions may also cause replicative stress. Indeed, it is also suggested that the repair of oxidized bases itself could lead to RF stalling and replication stress [68]. In addition to ROS sensors such as PRDX2, glycosylases such as NEIL1 or NTH1 [69], which participate in the repair of oxidized bases by base excision repair (BER), have been also detected on RFs using the iPOND technique [70]. These glycosylases could act together with replication proteins allowing a pre-replicative repair of oxidized DNA bases. However, the repair mechanism itself (or more likely incomplete repair) may lead to DSB especially if RFs encounter intermediate repair structures (abasic sites or short patch of ssDNA). Therefore, in case of deficient or overwhelmed repair in response to an important level of oxidative damage, the level of replicative stress and subsequent DSB are increased leading to cell death. Thus, it has been recently proposed that BER proteins, such as OGG1, could be potential targets for cancer treatment [71].

3.1.2. Repetitive Sequences and Particular DNA Structures

Repetitive DNA sequences, which are widely found in the human genome, challenge the replication process and act as a source of genomic instability. Among these are microsatellites, minisatellites, and satellites, which can give rise to secondary DNA structures that are different from the canonical B-DNA conformation [72]. These structures can lead to the slippage of DNA polymerases, incomplete DNA replication, or fork stalling, all of which lead to genomic instability [73]. Of note, two recent studies used genome-wide mapping to identify repetitive sequences as sites of DNA RF collapse [74,75]. Many sequences in the human genome can adopt a conformation that differs from the canonical B-DNA double helix. These particular structures, such as hairpins, cruciforms, slipped strand DNA, triplex DNA, Z-DNA, and G quadruplexes act as a barrier for RFs, leading to the stalling of replication machinery [72,76]. For instance, G-quadruplexes, four-stranded helical structures formed at GC-rich sequences, are enriched at telomeres, yet also at the proximity of numerous replication origins. These structures seem to participate in the preferential firing at those origins [77]. However, as shown upon the loss of helicases capable of unwinding these structures [78,79], G-quadruplexes represent a potential threat for the replisome and cause fork arrest [80].

3.1.3. RNA-DNA Hybrids

DNA replication and transcription are fundamental processes that use the same DNA template to operate. Replication-transcription collision can lead to the formation/stabilization of R-Loops, three-stranded nucleic acid structures composed of RNA-DNA hybrids and ssDNA sequences. It is assumed that R-loops are generated from the re-hybridization of nascent RNA transcripts with their template DNA [81]. Codirectional or head-on collision are difficult to avoid, for example, at very long genes or those which are highly transcribed in S phase and are a natural source of replicative stress [82,83]. In either type of collision, the replication fork is unable to progress past the transcription machinery, but data suggest that head-on collision is more harmful than codirectional ones [84].

R-Loops are preferentially formed at GC-rich sequences and are involved in physiological processes such as the regulation of gene expression or immunoglobulin class-switch

recombination [81]. R-loop are abundant and their levels and/or location are tightly regulated by mechanisms preventing their formations, stabilization, or allowing their removal. Dysfunction of these mechanisms leads to R-loop accumulation, which leads to replication stress [81]. Studies showed that RNA binding proteins, such as TDP-43, associate with nascent RNA at newly transcribed sites preventing annealing of RNA with DNA and the formation of RNA-DNA hybrids. Loss of such proteins leads to increased level of R-loops, thus promoting replicative stress [85].

In mammals, ATM and checkpoint kinases turn off gene transcription around DSB. However, RNA-DNA hybrids are generated at the DSB end contributing to DSB repair as long as they are transient. Nascent hybrids are involved in both C-NHEJ and HR and could act as a homologous template for DNA repair. Nonetheless, persistent hybrids have negative consequences on the repair of transcribed genes [86,87], and may lead to replicative stress.

R-loops are associated with instability at common fragile sites [88]. They impede the replication process, as observed by the slowing and stalling of the fork, and induce DNA breaks and genomic instability [89–92].

3.1.4. Oncogenes

Studies suggest that the activation of many oncogenes induce replication stress through potentially different mechanisms [93,94]. Whether by affecting origin firing, increasing replication-transcription collisions, perturbing nucleotide metabolism or inducing ROS, oncogene activation leads to replicative stress [57] and contributes to genomic instability, an important driving force of tumorigenesis [95]. For instance, shortening of the G1 phase of the cell cycle after *MYC* and *Cyclin E* oncogene activation induces an early firing of replication origins. This leads to the collapse of RFs owing to collisions with transcription complexes, therefore causing replication stress and genomic instability [96]. As described above, oxidative damages induced by ROS upon oncogene expression may also impact the progression of RF and leads to replicative stress [58–61] and could participate in genome instability. Oncogenic *RAS* expression, which results in primary human cells to oncogene induced senescence impact key DNA repair factors. Indeed, during *RAS*-induced senescence, an activation of *CTSL* and downregulation of *VDR* was observed, leading to a decrease of *53BP1* and *BRCA1* level, which could contribute to replicative stress and genomic instability [97].

3.1.5. Different Lesions

Unrepaired DNA lesions induced by endogenous (e.g., oxidative stress) or exogenous sources are important causes of replicative stress. Many exogenous genotoxic factors, including chemicals (DNA alkylating agents, topoisomerase inhibitors), or radiations (ionizing, UV, etc.), lead to DNA lesions [98]. Interestingly, nicks, gaps, and stretches of ssDNA are natural intermediates of many DNA processes and can be causes or consequences of replicative stress. For instance, if a RF passes through nicks or gaps, the latter would be converted to DSB, inducing fork collapse. If left unprotected, ssDNA stretches, which are not only intermediates of many repair processes but also of mechanisms promoting fork restart, can encounter endonucleases, and be converted to DSB [57].

DNA ICL and DNA-protein crosslinks (DPC) are other lesions, which also stall RFs. These ICL (and most probably also DPC) can be repaired by different mechanisms [99] including the Fanconi Anemia (FA) pathway [100]. FA is a chromosome instability syndrome, for which mutations in 22 different genes have been described, among them genes encoding for HR proteins, playing crucial roles in ICL and DSB repair, and management of replicative stress [101].

3.1.6. Defective Replication Process

Replication stress can arise from defects in the replication machinery itself, or in the components required for its function, thus hindering replication progression. A shortage

in dNTP pools has been described as a major source of replication stress [102,103]. For instance, a depletion of dNTP pools can be induced by chemical treatments such as hydroxyurea (HU), or by uncontrolled replication initiation such as excessive origin firing or oncogene activation [104].

3.2. How Is Replicative Stress Managed?

Replicative stress is considered an important source of genome instability and may be responsible for initiation of senescence [105] or tumorigenesis [106,107]. Suitably, several mechanisms have evolved to manage replication stress, thus preventing chromosomal alterations or aberrant segregations of the genetic material. Avoiding new origin firing, protecting and promoting fork stability, repairing breaks induced during forks stalling and resuming the RF progression are the main pathway to correctly achieve a “faithful” replication process [2,55,56].

Protection mechanisms, especially from HR proteins, can allow the stalled fork to stand still until reached by an active progressive RF to complete the genome duplication. While obstacles on the lagging strand will mostly be “skipped” as the discontinuous synthesis of this strand will stop at and restart pass this obstacle, obstacles on the leading strand have to be dealt with. Cells have therefore settled an intricate set of mechanisms to overcome obstacles for the RF progression and to resume stalled or broken RFs. The mechanisms that are known to restart replication comprise: (1) protection and/or the remodeling of the fork to promote its restart by homology-mediated recombination mechanisms such as break-induced repair (BIR), (2) the bypass of the damage by specialized polymerases, (3) the re-priming of the replication machinery downstream of the lesion [1] (Figure 4).

3.2.1. Avoiding New Origin Firing—Role of ATR

Replication stress, leading to uncoupling between the action of polymerase and helicase on the leading strand, produces long stretches of ssDNA, which is protected by RPA, forming at the same time, a signalling platform to preserve stalled fork integrity. Subsequently, it is recognized and bound by ATRIP and the ATR kinase [108,109], leading to their complex activation depending on their interacting partner as well as on DNA structure [110–118]. ATR replication checkpoint activation allows the recruitment of DNA repair proteins, prevents dormant origin firing, promotes RF stability, and process for replication restart [119]. Inappropriate firing would lower the pool of replisome components and might deprive active origin from those. Moreover, inefficient ATR activation or origin firing deregulation leads to an increase of ssDNA regions and therefore to the exhaustion of RPA. The unprotected ssDNA regions at the fork induced its collapse and are more prone to nucleolytic cleavage, leading to potential DSBs or forks cleavage [120]. The ATR replication checkpoint participates in RF stabilization and prevents their collapse. Fork collapsing leads to the formation of DSB and the inability to resume replication with the consequence of potential incomplete DNA replication [121,122].

3.2.2. Restart by Homology-Mediated Recombination

The HR mechanism and factors play essential roles in reestablishing functional RF (Figure 4). Besides their role in the homology-directed recombination process, some HR proteins protect stalled fork and nascent strand from degradation by nucleases (see Section 3.2.3). These factors also protect and participate in the remodeling of stalled fork, such as the conversion of the 3-branch structure into a 4-branch structure by reannealing of the two parental strands and backtracking and annealing of the two newly synthesized strands. This molecule resembling a Holliday junction and called reversed or regressed forks, have been visualized by EM and are increased after different genotoxic stress such as replication stress-inducing agents: DNA synthesis inhibitors, topoisomerase inhibitors, DNA interstrand cross-linking agents, alkylating agents, UV radiation, and oxidative stress [65].

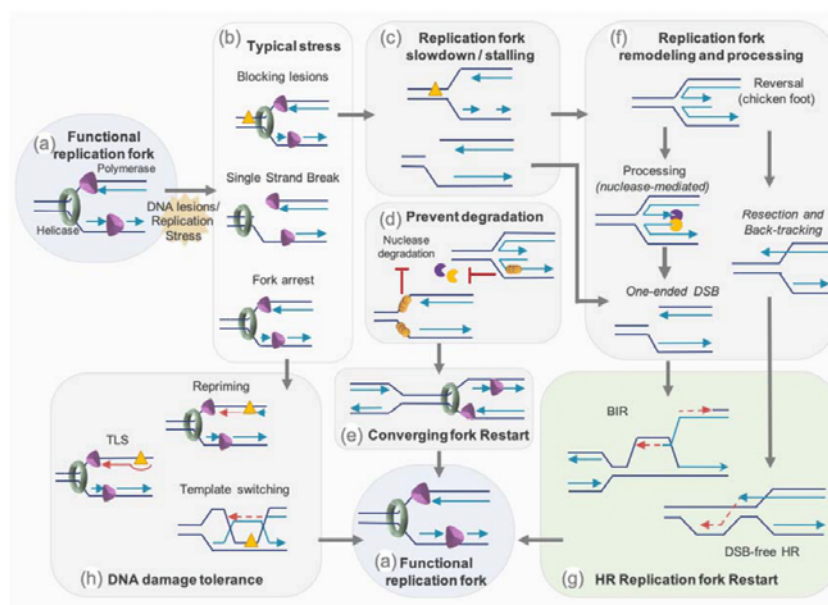


Figure 4. Mechanisms of replication forks restart. During progression, a functional RF might encounter obstacles, which will generate replication stress as a result of, for example, single strand breaks, blocking lesions, or fork arrests (a). This lesion will trigger the slowing of the RF or, in worst case scenario, its stalling and collapse (b). Protection of stalled/collapse fork from nuclease degradation (d), might allow replication to complete by merging with a converging fork (e). Persistent collapse fork will require remodeling and processing to permit the restart of the replication (c). One key step is fork reversal/regression, forming a 4-branch structure commonly called “chicken foot”, which will protect from extensive nuclease degradation (d) but also mediates both DSB-dependent or DSB-free fork restart. Controlled resection of newly synthesized DNA on a reversed fork or stalled fork, and backtracking of the fork, form a 3′-protruding end, which coated with RAD51 can mediate D-loop formation and homology search to initiate a DSB-free HR restart (f). One-ended DSB can arise from encounter of single strand break with the replication machinery, but also from nuclease cleavage of persistent stalled fork or reversed fork (d). Such one-ended DSB are then taken in charge by BIR, a specialized homology-directed repair pathway (f). Other types of lesions, such as blocking lesions, can trigger DNA damage tolerance pathways, which permit the bypass of sources of replication stalling and comprise three main mechanisms (h). Translesion DNA synthesis (TLS) involves specific DNA polymerase able to traverse a blocking lesion. Template switching is the re-annealing of the nascent strand to sequence in the newly synthesized DNA. Repriming consists of reinitializing replication downstream of the blocking lesions (h). Fork restart is schematized by red lines and arrows.

Fork reversal, which is seen as a mechanism of protection from degradation (see Section 3.2.3), might also be a way to allow the repair of the lesion on a non-fork structure, but also to reinitiate a functional D-loop without inducing DSB. As a matter of fact, the mechanistic of RF restart through homology-mediated recombination can happen independently of the induction of DSB or following such an event [54,55]. Indeed, regression and controlled resection of a reversed fork, or resection of the nascent strand of the lagging strand on a stalled fork, and backtracking of the fork might generate a 3′ protruding overhang. Evidence in yeast suggest that, as for classical HR, DSB-free fork restart through homology-mediated recombination step is mediated by short range resection by the MRN/Ctp1 (CtIP ortholog) complex followed by extensive resection through the action of Exo1 [123].

However, a RF coming across a nick will convert this lesion into a one-ended DSB. Moreover, persistent stalled RF or reversed fork might also be cleaved by nucleases or struc-

ture specific endonucleases (SSE) such as MUS81, which will generate a one-ended DSB (see Section 3.2.4). In these situations, replication is resumed by Break-Induced Replication (BIR). Although in eukaryotes, this process has been mostly described in yeast, growing evidence of the involvement of such a mechanism are reported in mammals [49,124]. In yeast, resection of the one-end DSB generates a 3' ssDNA, which will first be coated by RPA before being converted by Rad52 into a Rad51 nucleofilament. This will trigger the homology search followed by strand invasion to initiate the formation of a D-loop. The DNA synthesis then resumes and progresses through the migration of the D-loop, with the newly synthesized strand emerging from the D-loop serving as a template for the lagging strand. BIR replication is therefore asynchronous and conservative, in contrary to classical synchronous and semi-conservative replication. In the absence of Rad51, the formation of the D-loop relies on the single strand annealing activity of Rad52. Mammalian BIR is less characterized mechanistically but it involves POLD3 and RAD52 and seems less-dependent on RAD51 than yeast BIR [49,124].

3.2.3. Protection of Stalled or Reversed Forks

To prevent harmful scenarios such as the degradation of the fork, inappropriate repair or the presence of under-replicated stretches of DNA, RFs must be protected during the time required for managing their accurate restart and/or removal of stress.

The HR factors BRCA1/2 and RAD51 have a primordial role for fork protection and maintaining its stability [56]. Indeed, stalled fork degradation, as observed by the nascent strand nucleolytic processing, was reported in setting with deficiency in these HR proteins. BRCA2/PALB2, with the participation of BRCA1/BARD1, load RAD51 on ssDNA at stalled forks. Evidence from BRCA2 deficiency and BRCA2 S3291A mutations, interfering with RAD51 interaction, indicates that the nascent ssDNA degradation by MRE11 could be due to a destabilization of the filament of RAD51 on this nascent ssDNA [125]. Additionally, it was proposed that in the absence of BRCA2, resection might be initiated by CtIP and MRE11 and a subsequent extensive processing by EXO1 [126]. Recent studies also direct towards a role for BRCA1/BARD1 in the protection of stalled fork from MRE11 by improving filament stabilization by RAD51 [127,128]. Depletion of RAD51 or preventing RAD51 binding to DNA causes degradation of nascent ssDNA by MRE11 and affects the RF restart [125,129–131]. However, the strand exchange activity of RAD51, which is primordial for HR, is not required to protect the fork from MRE11 degradation [132].

Fork reversal is considered as a protective mechanism against genomic instability, avoiding excess of ssDNA. However, as for non-regressed forks, mechanisms of protection at reversed forks should be active, since this structure composed of an one-ended extremity is prone to nuclease processing (e.g., by MRE11/CtIP, EXO1 ...) and DSB formation (e.g., by MUS81 nuclease) (Figure 4).

Different proteins are proposed to participate in fork reversion [56,133]. Reversed forks are decreased in BRCA1/2 deficient backgrounds. However, upon MRE11 depletion, fork reversion can be restored [126,131]. Likewise, EXO1 depletion in BRCA2 deficient cell lines is able to rescue fork reversal [126]. The RAD51 depletion mimics BRCA2 depletion in decreasing reversed forks number, with the exemption that, in RAD51 depletion case, MRE11 inhibition has no effect in rescuing this number, confirming the crucial role of RAD51 in fork reversal [65,131,134]. Although not essential for fork reversal, a stable RAD51 filament is required for the reversed fork protection from degradation [131]. Interestingly, contrary to the role of CtIP in initiating nascent strand processing at stalled fork, the nuclease activity of CtIP seems to counteract at reversed fork the excessive degradation mediated by DNA2 [135]. Studies reported that fork remodelers, such as ZRAN3B and SMARCAL1, promote the MRE11 dependent degradation of reversed fork structure in the absence fork protector such as BRCA1/2, RAD51 or FANCD2 [136]. It has been proposed that RAD51-BRCA2 and others proteins such as BOD1L, FANCD2 could form a complex, a "protectosome", which would protect the RFs [137].

NHEJ was also proposed to play a role in managing DSB during S phase or replicative stress [138–140]. Recent evidence also implicates NHEJ factors in the protection of the RF. Indeed, in yeast, the NHEJ component KU, acts as a protector of the reversed RF [123]. In mammalian cells, the NHEJ factor RIF1 protects reversed fork from DNA2 degradation [141]. Moreover, XLF and H2AX seems to play a successive role in preventing reversed fork formation and in protecting from MRE11 degradation, the nascent strand of regressed arms [142].

Once the forks are protected and stabilized, the action of nucleases and/or helicases is necessary for resuming the replication.

3.2.4. Nucleases and Helicases Mediating HR Restart of the Fork

Nucleases play key roles in DNA repair mechanism but also in the processing of stalled RF and their efficient restart. While limited resection and/or DNA cleavage are required for efficient fork restart, extensive degradation of stalled replication intermediate has to be prevented, as it is a source of genomic instability. Upon replicative stress, MRE11 could also play a role in fork restart and prevent DSB formation [143]. Indeed, it has been suggested that MRE11 allows the enlargement of gaps of ssDNA, which increase the amount of ssDNA template for RAD51 loading and efficient repair [144]. At the same time loading of RAD51 on ssDNA would prevent uncontrolled resection by MRE11, which leads to the formation of large ssDNA gaps and genetic instability [129]. Aside for MRE11, FAN1 [145] and CHP [146] have also been implicated in the restart of the replication, when under appropriate control by FANCD2, as in its absence, excessive processing by FAN1 is observed [145]. The gap-endonuclease activity of FEN1 also seems to mediate restart of stalled RF [147].

If the fork stalling is prolonged and/or failed to restart, it might become a substrate for structure specific endonuclease (SSE). These SSE process DNA secondary structures that can be produced during DNA repair or DNA replication, such as stalled RF or reversed fork [148]. Among them, the SLX4-MUS81-SLX1 complex participates in RF cleavage and in the generation of single-ended DSB. Indeed, SLX4 has been associated with DSB formation at prolonged stalled fork under certain circumstances [149–151], but many studies point more toward MUS81 as a key player in the restart of stalled RFs mediated by their cleavage into DSB [152–156]. Whether this function of MUS81 relies on its SLX4-dependent recruitment is not clear and might depend on the type of replication stress induced [151,157]. Nonetheless, after extensive replication stress, SLX4 itself is sufficient to avoid GEN1 mediated fork cleavage and prevent genome instability [151]. Of note, SLX4- or MUS81- DSBs induction have been reported to have a detrimental effect for cell survival upon HU treatment [149,158]. It has also been proposed that the cleavage by MUS81 of reversed fork with limited MRE11-resection allows replication restart and survival in BRCA2-deficient cells [126]. Other data suggest that following ATR inhibition, excessive SMARCAL1 activity results in increased fork reversion, whose cleavage in a SLX4-dependent manner would affect cell viability and fork progression [157].

While helicases from the RECQ family can resolve secondary structure such as stalled RF, they can co-operate with nucleases to promote the RF restart. Indeed studies suggest that WRN might acts with FEN1 at stalled RF [147,159,160]. In addition, it has been reported that BLM contributes with MUS81 to convert stalled RF into DSB, to promote the repair and resumption of the RF [153,161]. Under conditions of prolonged RF stalling, DNA2 and WRN are important for RF restart. Indeed, DNA2 and WRN are essential to mediate reversed fork restart by limited degradation, kept in control by RECQ1 [162]. RAD51 depletion antagonizes this mechanism [162], probably due to the fact that RAD51 plays an important role in the fork reversion [65].

Nonetheless, if these SSE and helicases are a source of DSB and genetic stability during replicative stress, they are more certainly tightly controlled, as suggested by the chromosome shattering and cell death observed following uncontrolled MUS81-SLX4 interaction and action at stalled RF [104,163].

3.2.5. Translesion Synthesis and Repriming

Depending on the type of lesions encountered during replication, DNA damage tolerance pathways can permit their bypass through the three main mechanisms: translesion DNA synthesis (TLS), template switching or repriming [164]. DNA damage tolerance can be achieved by either specialized DNA polymerases or by delaying repair. To guarantee the replication of the damaged template, TLS involves the action of lesion-bypass DNA polymerases (POL η , REV1, POL κ , POL ι , POL ν , REV3L-REV7, and POL θ) to bypass the fork-associated lesions [165,166]. These polymerases have unique features that allow them to synthesize DNA past damaged bases [165].

Template switching corresponds to a realignment of the nascent strand to somewhere else in the newly synthesized DNA sequence to use as a template, such as the sister newly synthesized strand. Template switching can also occur in fork reversal to replace the obstacle into a conformation that will allow it to be “bypassed” as synthesis uses regressed arm as a template. The classical fork progression is then restored either by strand processing of reversed arm and annealing to sister nascent strand in an HR-dependent fork synthesis restart or, by restoring the initial fork nascent and parental strand position [167].

Alternatively, the replication machinery can skip damaged DNA and reprime the fork downstream of the lesion. The primase/polymerase PRIMPOL is able to synthesize primers and promote the DNA synthesis restart when fork progression is challenged [168,169]. PRIMPOL repriming generates post-replicative ssDNA gaps. The efficient filling of post-replicative gaps requires the action of either TLS polymerases or strand exchange and template-switching mechanisms. Under stress conditions, the activation of PRIMPOL can counteract pathological reversed fork degradation, by reinitiating DNA synthesis past DNA lesions [164]. Recently, the PRIMPOL pathway has been proposed as a therapeutic target in BRCA1-deficient cancer [170]. This study shows that PRIMPOL is involved in an adaptive response to genotoxic stress. Indeed, upon cisplatin pretreatment, ATR induces an increase of PRIMPOL expression, which leads to decreased RF reversal, and an increase in PRIMPOL-dependent repriming, thus promoting cell survival. This balance between fork reversal and repriming allows cells to cope with cisplatin-induced DNA lesions [170]. Targeting both of these pathways could increase cancer cell chemo-sensitivity.

3.3. Responses to Avoid Genome Instability upon Replicative Stress

Absence or insufficient management of replicative stress leads to genome instability and could even result in a chronic inflammatory cellular environment, which is associated with different human diseases, such as neuropathologies, age-related disorders, and cancers.

3.3.1. Nature of DSB during Replicative Stress and the Role of Sister Chromatid Cohesion

The particular nature of DSBs during replication stress is highly prone to result in chromosomal rearrangements. Indeed, in contrast of the “two-ended” DSBs, “one-ended” DSBs do not always have the possibility to be accurately joined with a proximal DSB and can potentially be joined to other distal DSBs, leading to translocations or complex chromosomal rearrangements, such as chromosome fusions or radial figures. Radial figures are observed in cells deficient for HR, in BRCA1 or BRCA2 mutated tumoral cells for instance [171–174] or in Fanconi pathway-deficient cells [101]. A correct sister chromatid cohesion is capital to avoid genome instability. Cohesins play here a crucial role to avoid mobility of the “one-ended” DSB extremities. Gelot et al. showed that RAD21 depletion leads to an increase of distal end-joining and an increase of chromosome rearrangements such as translocations [175,176]. In addition, the human TIMELESS-TIPIN complex, which is involved in RF stabilization/protection, S-phase checkpoint activation and establishment of sister chromatid cohesion [177], helps to prevent genome instability [178].

3.3.2. Mechanisms to Avoid Replication Stress-Induced Chromosome Aberrations by Precluding NHEJ Factor or by Positively Regulating HR

Different sophisticated mechanisms exist to preclude end-joining mechanism in case of unresolved replicative stress to avoid chromosome aberrations or telomeres fusions. For instance, the recruitment of 53BP1, which favors NHEJ by inhibiting end resection with RIF1 and shieldin proteins [179], is impeded at mitosis by PLK1 kinase. The phosphorylation of 53BP1 UDR region inhibits its binding to H2AUB in chromatin. In contrast, its dephosphorylation by PP4C protein in G1 allows this protein to be recruited to damaged chromatin [180–182]. The absence or deficiency of BRCA1 (or other HR proteins as FANC proteins), leading 53BP1 to be active during replicative stress, leads to complex chromosome aberrations, as radial figures [139,140,171,183,184]. However, a PLK1-dependent temporally competition between 53BP1 and BRCA1 to restart stalled fork exists. Indeed, while depleting BRCA1 mediates, a 53BP1-dependant DSB-free fork restart, depletion of 53BP1 leads to a restart by BIR following a SLX4-MUS81 cleavage [185]. This suggests a tight control of 53BP1 recruitment during replication stress/or in each cell cycle phase. Thus, the choice between different DSB repair mechanisms; HR vs NHEJ, is capital to ensure genome stability. Resection, which is very tightly controlled, favors HR at the expense of NHEJ during the S phase. For instance, regulation of key proteins in DSBR, such as CtIP or BLM favors resection or HR during the S phase. We reported that BLM has a dual role: during G1, it avoids large resections by its binding to 53BP1; in contrast during the S phase, BLM binds to TOPB1, which results in its increase of unwinding activity and subsequent resolution of DSB (or replicative stress) by HR [29]. Another example, as cells enter the S phase, phosphorylation of Sae2/CtIP by CDK1 occurs, allowing its binding to BRCA1 and MRN complex leading to a stimulation of resection, not only through MRN activation but also by displacing 53BP1, the factor antagonizing resection [186,187].

3.3.3. Consequences during Mitosis

More than one hundred years ago, Theodor Boveri predicted in his publication “Concerning the Origin of Malignant Tumours” that chromosomal instability, resulting from an improper “splitting” of chromosomes, is a key hallmark of cancer [188]. Now, we know that unresolved replicative stress is a major source of chromosome segregation defect at mitosis. Slowed fork progression in HR-deficient cells (spontaneously without additional treatment) has been shown to elicit an alteration of progression in metaphase and in an increased centrosome number, leading to multipolar mitosis [189–192]. Recently, it has also been reported that replicative stress leads to premature centriole disengagement causing multipolar spindles, lagging chromosome, and micronuclei [193].

However, at difficult-to-replicate regions, such as common fragile sites or telomeres, replicative stress can have detrimental consequences such as under-replicated regions. Studies have identified a mitosis DNA synthesis termed MiDAS initiated at such regions to permit their complete replication [194–198]. This RAD51-independent, RAD52 and POLD3 dependent mechanism appears to result from a MUS81-SLX4 cleavage of a stalled RF as the cells proceeds to mitosis.

A review in this special issue by Wilhelm et al. described the major consequences of replicative stress during mitosis and its role in chromosomal instability (CIN) [199].

3.4. Consequence of Replicative Stress on Inflammation

Beside its direct consequence in chromosomal rearrangements induction, replicative stress has been linked to inflammation. Indeed, during replicative stress, small fragments of DNA could potentially be produced and released into the cytoplasm (Figure 5).

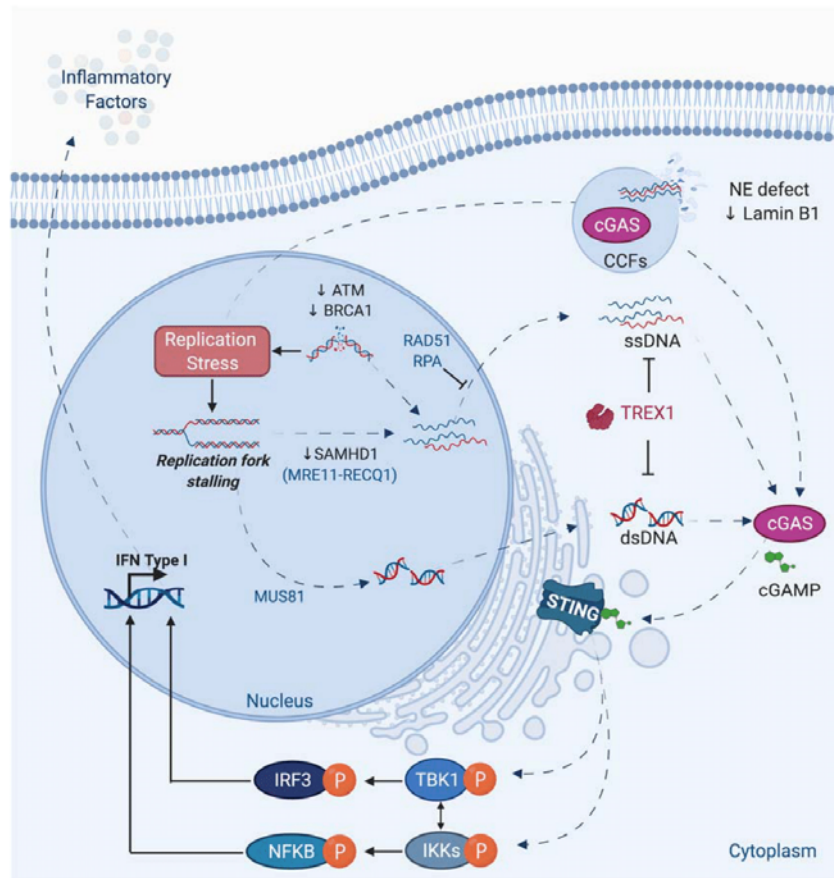


Figure 5. Activation of canonical STING Pathway upon replication stress or DNA damage. Self-cytosolic DNAs arise from genetic instability caused by endogenous (ROS, replication stress, retroelements, etc.), exogenous sources (therapeutics agents, IR, etc.) or DNA damage persistence (loss of ATM, BRCA1, etc.). Cytosolic DNA could be DNA repair mechanism by-products or generated during stalled RF processing. Indeed, MUS81 participates to RF processing and leads to double strand cytosolic DNA accumulation. It has also been reported that aberrant fork processing occurs in the absence of SAMHD1, which leads to the accumulation of cytosolic ssDNA. This is the result of the displacement of the nascent DNA strand by RECQ1 and its cleavage by MRE11. To avoid cytosolic DNA accumulation, DNA repair protein such as RAD51 and RPA are bound to ssDNA to prevent their cleavage and passage in the cytoplasm. Once in the cytoplasm, self-DNA (or cytosolic DNA originated from pathogens sources), if not degraded by TREX1, is sensed by cytoplasmic sensors such as cGAS. Cytosolic DNA are also generated from ruptures of the NE or leakage from micronuclei. cGAS activation leads to the production of cyclic GMP-AMP (cGAMP), a second messenger capable of activating the adaptor molecule STING that resides in the ER. Upon activation, STING translocates to the Golgi where it can recruit kinases IKK and TBK1. Subsequently, these proteins activate NF- κ B and IRF3, respectively. These later translocate to the nucleus leading to the transcription of inflammatory factors to trigger the immune response in a type I IFN-dependent manner.

The exact mechanism of genomic DNA fragments production and release is still not fully understood. The presence of these DNA fragments in the cytosol can activate a part of the innate immune system through the expression of interferon and inflammatory factors. Among different nucleic acids sensor, the DNA sensor cGAS recognizes cytosolic

DNAs and produces the cyclic dinucleotide cGAMP, which is responsible for the activation of STING protein. The subsequent phosphorylation of TBK1 and NF- activation leads to type 1 interferon and cytokines production [4,5,200–202] (Figure 5). The activation of this innate immune system could be considered as a DDR response, since this pathway in response to damage is generally beneficial by recruiting immune cells to eliminate cells bearing damaged DNA or genome instability. However, a chronic activation of this cGAS-STING pathway and the subsequent inflammation are at the origin of inflammatory pathologies such as Aicardi-Goutières [5] and could also participate in aging or tumorigenesis [203–205]. Its activation could favor proliferation or propagation of tumor cells, likely by creating an inflammatory tumoral micro-environment.

Different genotoxic stress leads to cGAS-STING activation, but often the precise molecular mechanism is not fully elucidated [206,207].

Interestingly, a link between BRCA1, BRCA2, MUS81, or SAMHD1, different proteins playing an important role during replicative stress, and cGAS-STING activation has been reported (Figure 5).

It has been shown that deficiency in BRCA1 or BRCA2 leads to activation of the STING pathway [208–210]. MUS81 participates in the cleavage of genomic DNA leading to cytosolic-dependent activation of STING and interferon production. This activation promotes phagocytic and T cell responses and rejection of prostate tumors via mechanisms partly depend on macrophages [211]. SAMHD1, a protein mutated in the inflammatory disease, Aicardi-Goutières syndrome, acts at stalled RFs to prevent interferon induction. Indeed, SAMHD1 is important to control correct resection of nascent DNA, allowing the forks to restart replication. In contrast, its deficiency leads to the RECQ1-dependent release of DNA fragment from stalled forks to cytosol and to an inflammatory response [212]. An extensive review in the same issue describes the different links existing between DNA repair defect, replicative stress, and inflammation [4].

Interestingly, the cGAS-STING-TBK1 pathway, through recognition of DNA in micronuclei, was reported to participate to senescence and the Senescence Associated Secretory Phenotype (SASP) [6,213–216] and thus likely to aging [203]. It is now accepted that “inflammaging”, induced by accumulation of senescent cells likely due to less-efficient DNA repair and immune systems, is responsible for many pathologies associated with old age such as atherosclerosis, arthritis, cancer, etc. [217].

In the next section, we discuss how structural proteins such as lamins, essential components of the nuclear envelope (NE), and the nuclear matrix, have roles in DNA repair and during replicative stress. Expression of a pathological form of Lamin A protein, Progerin, which is at the origin of a very severe premature aging syndrome, Hutchinson-Gilford progeria, also leads to replication defects and an inflammatory phenotype through the cGAS-STING pathway.

4. Presentation of Lamins

The nuclear lamina (NL), which represents a major component of the NE, is composed mainly of the lamins, along with integral proteins of the inner nuclear membrane. Based on sequence homologies and biochemical properties, lamins are classified into two types: A and B. These type V intermediate filaments, which form a fibrous network that line the inner part of the NE, are also present in a relatively smaller yet significant fraction throughout the nucleoplasm [218–220]. Lamins residing in both compartments, the NL and the nucleoplasm, play important roles in various nuclear functions.

4.1. Two Types of Mammalian Lamins

Mammals have three lamin genes that encode for four major and three minor lamin isoforms. The major A-type lamin isoforms, A and C, and the minor A-type lamin isoforms, AΔ10 and C2, arise from a single gene, *LMNA*, through alternative splicing. B-type lamins arise from two genes, *LMNB1* and *LMNB2*. The *LMNB1* gene encodes the major isoform B1 while the *LMNB2* gene encodes the major isoform B2 and the minor isoform B3 [221,222].

Lamins A and C are expressed mainly after the tissue differentiation stage of development, while Lamin A Δ 0 is expressed in somatic cells, Lamin C2 seems specific to germ-lines. In mammals, Lamin B1 and Lamin B2 are ubiquitously expressed along differentiation in germ-line and somatic cells. Lamin B3 is specifically expressed in germinal cells.

4.2. Maturation of Lamins

Lamin precursors undergo several modifications after their synthesis, thus, allowing their maturation (Figure 6). Soon after their synthesis, all lamins except Lamin C, which lacks the final two exons found in Lamin A including the CaaX motif, undergo a farnesylation of the cysteine residue of the CaaX motif by farnesyltransferase. Following the addition of farnesyl, a C15 lipid, the aaX residues are removed by specific proteases. This cleavage is catalysed by FACE2 (also known as RCE1) in the case of the B-type lamins, and by ZMPSTE24 (also known as FACE1), a zinc metallo-endoprotease, in the case of Lamin A. Carboxy-methylation of the Cys residue at the CaaX motif by the carboxymethyltransferase ICMT then follows. In contrast to B-type lamins, which remain permanently farnesylated and carboxy-methylated, Lamin A undergoes an additional ZMPSTE24-mediated cleavage step, which removes 15 amino acids. This final step removes the farnesylated and carboxy-methylated Cys residue, leaving a Tyr residue at the carboxyl end of Lamin A, rendering the latter mature [223] (Figure 6).

Numerous mutations, dysregulation in expression, and failure in maturation of lamins lead to many severe disorders, termed “laminopathies”.

4.3. Associated Pathologies

LMNA is one of the most frequently mutated, disease-associated genes known to date. More than 500 currently reported mutations in the *LMNA* gene (<http://www.umd.be/LMNA/> accessed on 31 January 2020) give rise to at least 12 disorders. These diseases can be classified into four major categories: striated muscle diseases (muscular dystrophy and cardiomyopathies), lipodystrophy syndromes, peripheral nerve disorders, and premature aging syndromes [222,224–227].

The most emblematic premature aging disease Hutchinson-Gilford Progeria syndrome (HGPS) is caused by a *LMNA* mutation preventing the conversion of farnesyl-prelamin A to mature Lamin A [228,229] (Figure 6). The most common mutation leading to HGPS is a de novo, dominant, and silent single-base substitution in exon 11 of the *LMNA* gene leading to the activation of a cryptic splice site and a subsequent elimination of 50 amino acids. The missing residues included the second internal cleavage site of ZMPSTE24. This gives rise to an immature form of Lamin A termed Progerin, which remains farnesylated and carboxy-methylated, and accumulates at the nuclear periphery.

Accumulation of farnesylated forms of Lamin A due to ZMPSTE24 deficiency is also toxic and leads to severe progeroid syndromes. Interestingly, PrelaminA and Progerin accumulate in normal aging cells [230–234], suggesting that these proteins contribute to normal aging.

Diseases associated with B-type lamins are very rare. Yet, a duplication of the *LMNB1* gene leads to autosomal-dominant leukodystrophy (ADLD) [235,236]. ADLD is a fatal demyelinating neuropathy of the central nervous system that is sometimes associated with ataxia, in addition to cardiovascular and skin defects. Increased expression of Lamin B1 in oligodendrocytes leads to reduced expression of lipid synthesis genes, resulting in reduced synthesis of myelin [237,238]. However, the tissue specificity of phenotypic expression of *LMNB1* duplication is not understood.

An increase in Lamin B1 levels has also been reported in Ataxia telangiectasia (AT) and Werner syndrome (WRN) cells [239,240]. In addition, as we will see below, an increase in Lamin B1 is also observed in many tumors. Recently, dominant pathogenic variants in *LMNB1* and *LMNB2* have been identified as genetic causes of primary microcephaly, involving the NL in its etiology, and defining a new form of laminopathy [241]. Besides, de

novo variants were recently identified in the *LMNB1* gene leading to disorganization of the Lamin B1 NL and to nuclei shape alteration in patients with microcephaly [242].

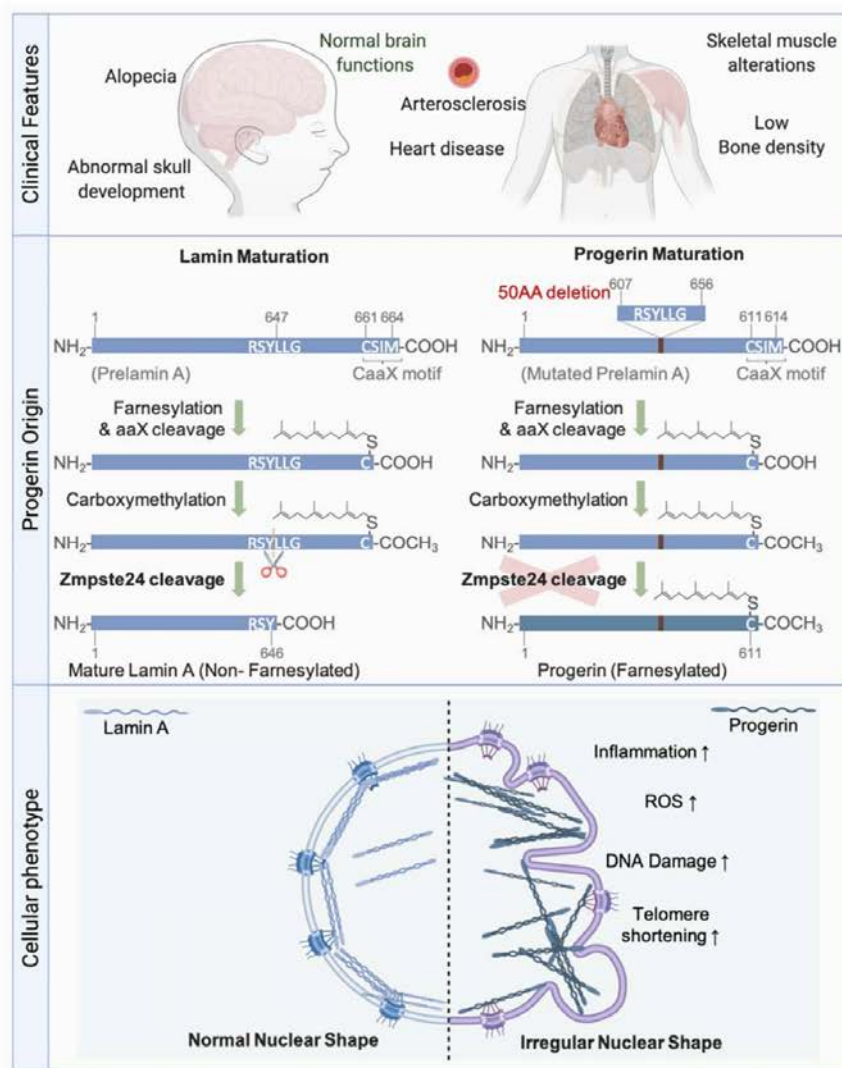


Figure 6. Hutchinson Gilford Progeria Syndrome. Main clinical features of progeria syndrome (Upper panel). Prelamin A protein goes under several post-translational modifications on the CaaX motif: addition of a farnesyl group on the cysteine residue, cleavage of the aaX, and carboxymethylation of the cysteine residue. The final step is the cleavage by ZMPSTE24 endonuclease to produce a mature Lamin A non-farnesylated nor carboxymethylated. HGPS mutation of *LMNA* results in the deletion of 50 amino acids including the cleavage site for the endonuclease ZMPSTE24 (middle panel). Thus, the resulting protein, Progerin, is permanently farnesylated and carboxymethylated. Its accumulation on the NE is associated with nuclear shape alterations. Additional cellular phenotypes of Progerin accumulation comprise increase of DNA damage, ROS, inflammation, and telomere shortening (bottom panel).

Several mutations in *LMNB2* are associated with acquired partial lipodystrophy (also called “Barraquer-Simons syndrome”) involving the loss of adipose tissue [243]. Another homozygous missense mutation in *LMNB2* was identified in certain patients with autosomal recessive progressive myoclonus epilepsy with early ataxia syndrome, perhaps due to abnormal neuronal migration [244].

Furthermore, a study showed that loss of B-type lamins can directly lead to age-related neurodegeneration, as seen in Alzheimer’s disease and related tautopathies, suggesting that these diseases are in fact acquired neurodegenerative laminopathies. In neurons of human brains affected by Alzheimer’s disease, pathological tau causes the stabilization of actin filaments, thus leading to the disruption of the LINC complex and the reduction of B-type, but not A-type lamins. In return, this leads to the relaxation of constitutive heterochromatin and activates the cell cycle in post-mitotic neurons, which leads to their death [245].

4.4. Lamins and Senescence

As seen in several progeroid syndromes and during the aging process of wild-type cells, nuclear shape alterations (NSA) occur commonly during senescence. The premature senescence, observed in cells from several progeroid syndromes including HGPS and also AT and Werner syndrome (with different degree of aging phenotype), depends, at least partially, on a dysregulation in lamins. It has been suggested that an unbalanced ratio between A- and B-type lamins might direct cells into senescence [246]. Interestingly, studies also reported changes in lamin levels during senescence and during the normal aging process.

4.4.1. A-Type Lamins and Senescence

Many studies have proved that the defective maturation of Lamin A or alterations in its levels result in premature entry into senescence. For instance, the silencing of Lamin A with shRNA [247] or its overexpression [248,249] leads to cell cycle arrest and senescence induction. Interestingly, the overexpression of the Prelamin A processing enzyme ZMPSTE24, or treatment with farnesyltransferase inhibitors, improves the growth capacities of cells overexpressing wild type Lamin A. This indicates that the accumulation of farnesylated Prelamin A intermediates contributes to the senescent phenotype of these cells [249]. Indeed, other studies demonstrated that the accumulation of Prelamin A, or progeria-causing lamin A mutants such as Progerin, leads to NSA and senescence induction [248,250,251]. Notably, treatment of Progerin-accumulating HGPS cells with farnesyltransferase inhibitors also restores many of the observed progeroid phenotypes including NSA and senescence, except for the persistence of DNA damages. In addition, analysis of tissues isolated from HGPS and ZMPSTE24-deficient mice revealed an upregulation of SASP genes, which were suggested to contribute to the systemic inflammation observed in these mice [252]. Since an accumulation of Prelamin A or Progerin has been observed in normal aging cells [230–232], it is suggested that these proteins are implicated in the normal aging process. Progerin and PrelaminA expression have a detrimental effect on vascular cells due to diverse molecular causes. HGPS was proposed as a model of vascular aging [253]. Progerin expression leads to an increase of oxidative stress, inflammation, DNA damage persistence, and senescence, leading to endothelial cells dysfunction [254]. This could contribute to HGPS-associated early atherosclerosis. Accumulation of Prelamin A in smooth muscle cells promotes the calcification and aging of these cells and induces the activation of the SASP [255].

4.4.2. B-Type Lamins and Senescence

Cells depleted from Lamin B1 exhibit nuclei with deformed shape and enter into senescence [256–261]. Several studies reported a decrease in Lamin B1 expression during multiple types of cellular senescence, including normal aged tissues, and replication-, irradiation- or oncogene-induced senescence [258,260–264]. Early at the onset of irradiation-induced senescence, the downregulation of Lamin B1 along with the lamin B receptor are necessary

for the release of heterochromatin binding to the NL [264]. Lamin B1 depletion during senescence is coupled to global and local changes in chromatin methylation [260,261], such as formation of domains depleted for the repressive histone mark H3K27me3, and is correlated with the upregulation of key senescence genes, including the SASP genes [261]. However, we and others showed that an increase in Lamin B1 also leads to an alteration in nuclear shape and senescence induction [239,263,265]. We also demonstrated that the increase in Lamin B1, in response to oxidative stress, contributes to the senescence phenotype of AT cells [239].

4.5. Lamins and Cancer

The deformation of nuclear morphology has been identified as a characteristic of cancer cells since the 1800s by Sir Lionel Beale. Although these alterations served for decades as cancer diagnostic tools, and even as prognostic markers [266–268], very few reports have provided insight into how these nuclear abnormalities would be induced, and what their biological consequences would be in the context of malignancies. Different studies reported deregulations of Lamin A expression in different types of cancers. A downregulation of Lamin A is more often observed in tumors than an upregulation. As example, loss of Lamin A correlates with loss of differentiation and higher proliferation in ovarian cancers. Lamin A was suggested to be a potent cancer biomarker that can be used to check tumor progression and prognosis [269,270]. Concerning B-type lamins, the dominating phenotype that is observed is an increased expression, often associated with bad prognosis. For instance, increased Lamin B1 level in pancreatic cancer has been correlated with poor prognosis, and Lamin B1 has been proposed as a therapeutic target. Indeed, the knockdown of Lamin B1 significantly attenuated the proliferation, invasion, and tumorigenicity of pancreatic cancer cells [271]. Patients affected by colon cancers or clear-cell renal cell carcinoma or gastric cancer with high Lamin B1 expression also exhibit a poor prognosis [272–274]. A recent report proposes that high level of Lamin B2 could promote migration of non-small cell lung cancer by increasing H3K9me2 level, which induced *E-Cadherin* gene silencing [275]. High level of Lamin B2 was also observed in triple negative breast cancer (TNBC) tissues. The depletion of LMNB2 suppressed proliferation and induced apoptosis and inhibited tumor growth of TNBC cells in mice. The authors suggest that Lamin B2 may promote TNBC progression and could serve as a potential therapeutic target [276].

The impact of Progerin expression, decreased or increased Lamin A levels, or depletion of Lamin B1 on genome stability and on inflammation, another important hallmark of cancer [277], has started to emerge.

5. Lamins and Genome Stability: Their Roles during DNA Repair, Replication, or Replicative Stress

Beside their important role of ensuring a good shape of the NE, and its reformation at the end of mitosis, many other functions of lamins have been described: genome organization; differentiation; cellular migration; cell cycle regulation; autophagy and apoptosis; and oxidative stress management. Different roles for lamins in DNA metabolism were also described, such as regulation of gene expression (by tethering chromatin to the NE, a repressive compartment for transcription, or by binding specific transcription factors). These different functions will not be described here as they have been extensively reviewed [218–220,278,279]. We will focus on the role of lamins in genome (in)stability. Indeed, in addition to their well-known structural role, nuclear lamins seem to play several roles in DNA repair mechanisms. Accordingly, laminopathies such as HGPS are associated with genomic instability and defects in DNA repair and telomere maintenance. It has been also recently proposed that lamins play a role during replication or in the management of replicative stress.

5.1. Lamins and DNA Repair

HGPS patient fibroblasts and Prelamin A-expressing cells isolated from ZMPSTE24-deficient mice show increased levels of spontaneous DNA damages as visualized by the increased basal levels of γ H2AX [251,280,281]. LMNA-deficient cells also show increased spontaneous γ H2AX foci, chromosome/chromatid breaks, and aneuploidy, suggesting that A-type lamins could participate in DNA repair [282,283].

5.1.1. Lamin A, Chromatin Modifications, and DNA Damage

Among the contributions of A-type lamins to DNA repair is their function in maintaining the positional stability of DNA repair foci, and their impact on damaged chromatin. For instance, a study revealed an association of Lamin A with chromatin via the histones H2AX and γ H2AX [284]. These interactions were reported to increase after DNA damage due to the recruitment of damaged chromatin to A-type lamins [284]. Thus, A-type lamins may serve as anchors for DNA repair foci, thereby contributing to their positional stability.

It has been suggested that altered histone modifications in Progerin- or Prelamin A-accumulating cells participate in inefficient DDR and defective DNA repair. Several studies reported a decrease in the levels of the H3K9me3 heterochromatin histone mark in HGPS cells [230,250,285]. More recent reports precise that during early passages, HGPS cells harbor a high level of H3K9me3, which decreases with increased passages in parallel to Progerin accumulation [286,287]. In early passages, Prelamin A- or Progerin-expressing cells display an increase in the methyltransferase SUV39H1, which is responsible of methylation of H3K9 [286]. It has been showed in HGPS that persistent DNA damage foci are associated with H3K9me3. Condensed chromatin might build up a barrier for the effective DNA repair. Knocking down SUV39H1 and SUV39H2 in HGPS or in ZMPSTE24^{-/-} MEFs decreases H3K9me3, and persisting γ H2AX and 53BP1 foci [286]. In contrast, at late passages, HGPS cells display reduced levels of H3K9me3 coupled with disrupted recruitment of SUV39H1 [287]. When in G0/G1, these cells demonstrate a defective amplification of the γ H2AX signal mediated by a defective ATM activation in response to the DSBs, in addition to a defective recruitment of the 53BP1 and RIF1. Interestingly, in HGPS fibroblasts, the methylene blue, an antioxidant, which removes Progerin from the nuclear rim by increasing its solubility, restores the H3K9me3 level and rescues the defects in ATM activation, γ H2AX signal amplification, and 53BP1 recruitment. Therefore, it is suggested that the loss of H3K9me3 could potentially impair ATM activation and consequently the downstream DDR upon DSBs in G0-G1 phase HGPS cells [287].

In addition, a study identified a role of Lamin A in regulating SIRT6-mediated functions in DNA repair [288]. SIRT6 is a stress-responsive deacetylase and mono-ADP-ribosylase enzyme. Its recruitment to damaged chromatin facilitates DDR signaling and DSB repair by recruiting the chromatin remodeler SNF2H, stabilizing DNA-PKcs at DSBs, and modifying CtIP and PARP1 [289]. Lamin A can directly interact with SIRT6 and facilitate its recruitment to damaged chromatin. Consequently, Lamin A could participate in SIRT6-dependent DNA-PKcs recruitment to chromatin, CtIP deacetylation, and PARP1 mono-ADP ribosylation in response to DNA damage, thereby suggesting that Lamin A regulates SIRT6-mediated DNA damage repair [288]. In HGPS, Progerin interacts more strongly to SIRT6 and tethers it to the nucleoskeleton. The functions of SIRT6 are then significantly impaired in response to DNA damages in HGPS fibroblasts [288]. Interestingly, deficiency of SIRT6 in mice lead to phenotypes that overlap with aging-associated degenerative processes [290]. In contrast, mice overexpressing SIRT6 exhibit an extended maximum lifespan [291].

Links between lamins and the mechanisms of DSB repair, NHEJ, and HR, have been reported (Figure 7). Cells with mutated or deficient Lamin A/C showed an increase in radio-sensitivity and in DNA breaks as revealed by the persistence of γ H2AX foci. These results suggest that DSB repair could be defective in these cells [282,283,292,293].

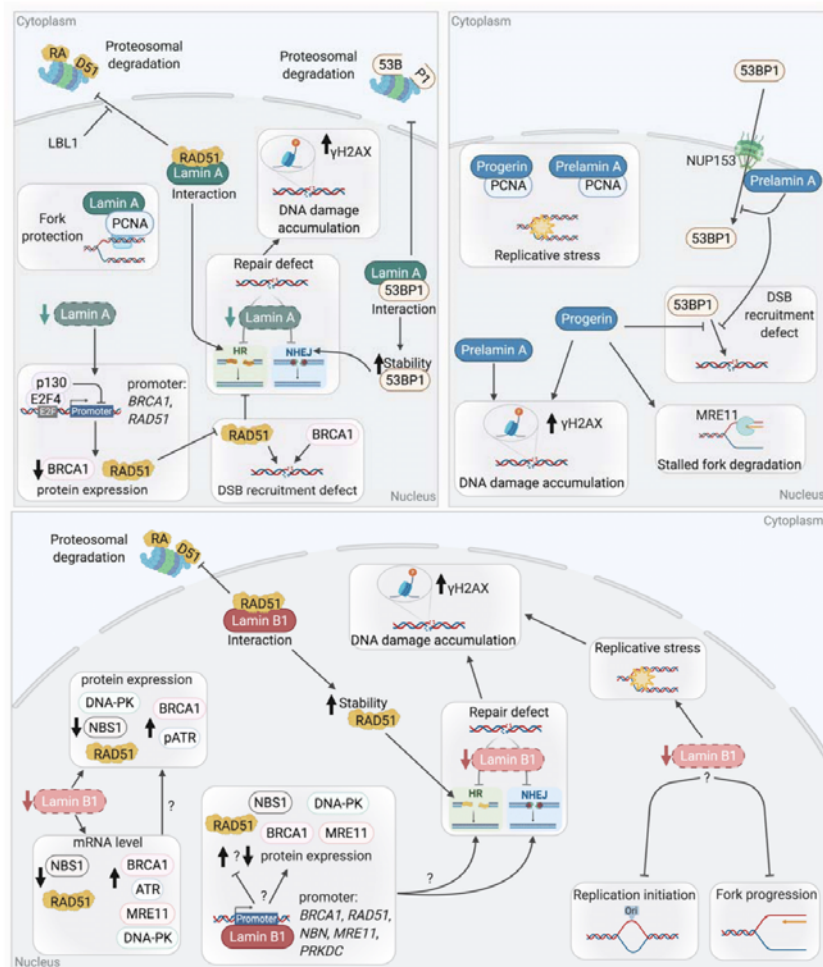


Figure 7. Lamins deregulation leads to DSB repair defect and replication stress. Upper left panel: Cell dysregulated for A type lamins show signs of genomic instability. Indeed, Lamin A has been shown to interact with RAD51, preventing its degradation by the proteasome. A similar interaction of Lamin A is noticeable with 53BP1, also increasing its stability. Decreased level of Lamin A reduces the expression of both RAD51 and BRCA1 through E2F4/p130-dependent repression of their promoter. Their defective recruitment at DSB leads to a decreased HR and NHEJ efficiency. Lamin A also participates to RF stability by its interaction with PCNA. Upper right panel: Cells accumulating Progerin or Prelamin A show DNA damage accumulation (increased level of spontaneous γ H2AX foci) and a defect of 53BP1 recruitment to DSB. Indeed, Prelamin A accumulation impairs 53BP1 nuclear import by NUP153. Progerin and Prelamin A both interact with PCNA, sequestering it away from the RF. In Progerin expressing cells, the defective recruitment of RAD51 at stalled fork leaves them unprotected and subject to extensive degradation by MRE11. Taken together, these observations explain in part the reported replication stress in HGPS cells. Bottom panel: Lamins B1 plays a role in DNA repair mechanism and its loss induces DNA damage accumulation. Indeed, as with Lamin A, Lamin B1 interacts and stabilizes RAD51, thus decreased level of Lamin B1 leads to DSB repair defect. In addition, diminution of Lamin B1 leads to a dysregulation of mRNA and proteins levels of key repair factor such as an upregulation of BRCA1, ATR, and a decrease of DNA-PK, RAD51 and NBS1 protein levels. A role of Lamin B1 in replication has also been reported. Lamin B1 extinction induce replicative stress and an extension of the S phase duration, which suggest a role of Lamin B1 in late origin firing and/or fork progression.

5.1.2. Lamin A and NHEJ

Studies have shown that A-type lamins participate in the repair of DSBs through the regulation of NHEJ. For instance, *LMNA*-deficient MEFs show a defective long-range NHEJ [283]. Comet assays revealed defects in the fast phase of repair of IR-induced DSBs, suggesting a defect in NHEJ in these MEFs [292]. This phenotype is partially explained by the loss of 53BP1, a key factor of NHEJ. An interaction has been reported between Lamin A/C and 53BP1 in basal conditions where Lamin A/C shield 53BP1 from UbxH7-dependent proteasomal degradation [282,294]. Thus, *LMNA*-depleted cells show an impaired formation of 53BP1 foci after irradiation due to a decreased stability of 53BP1 and a reduction in its protein levels.

HGPS and *ZMPSTE24*-deficient cells show defects in DSB repair mechanisms. These defects are attributed, at least partially, to alterations in the expression and recruitment of several DSB repair factors to DNA damage sites due to the presence of Progerin or Prelamin A.

Indeed, as discussed above, altered histone modifications or chromatin compaction may explain defect of DNA repair factors recruitment. Recently, it has also been shown that Prelamin A accumulation impairs 53BP1 recruitment due to a defective nuclear import of 53BP1 by NUP153 [295]. Similarly, HGPS patient cells present a decrease in 53BP1 foci formation and a delay in the colocalization of 53BP1 with γ H2AX.

These results show that the level of Lamin A has to be finely regulated to avoid defects in 53BP1 recruitment and NHEJ-dependent DSB repair.

5.1.3. Lamin A and Homologous Recombination

Lamin A may also play a role in HR-dependent DSB repair. Indeed, it has been reported that *LMNA*-deficient cells showed reduced HR efficiency [292]. However, a different study showed that the HR efficiency was not altered upon *LMNA* depletion (even though the same cell line with the same HR reporter construct were used) [296]. Different expressions of the endonuclease I-SceI used here to induce break in the reporter, or different Lamin A level extinction between both studies might explain the different results observed. However, a decrease in RAD51 expression, associated with a defect in RAD51 foci formation upon irradiation, was reported upon Lamin A depletion, suggesting a defect of HR. Similar results were obtained for BRCA1 [292].

The observed defects of RAD51 and BRCA1 appeared to be due to the transcriptional repression of these genes by the Rb family member p130, which forms a transcriptionally repressive complex with E2F4. Co-IP experiments showed that the depletion of Lamin A promotes an increased formation of p130/E2F4 complexes [296]. It is important to note here that in contrast to what was observed upon the depletion of Lamin A using shRNA in MCF7 or MEFs, unaffected levels of RAD51 were observed in *LMNA* mutant (Y259X) HDFs isolated from a patient [282].

Interestingly, HGPS cells present a defect in RAD51 and BRCA1 recruitment [280]. Progerin accumulation also induces alterations in DSB repair by impacting PARP1. Indeed, depleted levels of PARP1 lead to accumulation of SSBs, which are converted to DSBs during replication. These effects were due to a disrupted nuclear import of PARP1 caused by the abnormal anchorage of Progerin to the NE [297].

5.1.4. Lamin B1 and DSB Repair

Lamin B1 also plays a role in DSB repair (Figure 7). Indeed, the depletion of Lamin B1 in U2OS and HCT116 cancer cell lines leads to chromosomal instability and persistent DNA damages. These damages were revealed by the numerous spontaneous γ H2AX and 53BP1 foci, indicating an accumulation of DSBs [298]. Indeed, the analysis of HR and NHEJ efficiencies in these cells showed that both pathways are less efficient, thus explaining the accumulation of DSBs. Alterations in the mRNA and protein levels of several major DSB repair proteins are observed upon Lamin B1 depletion. For instance, increases in 53BP1, BRCA1, ATR, RAD50, and MRE11 levels are seen in Lamin B1-depleted cells. On

the contrary, the protein level of DNA-PKcs, NBS1, and RAD51 were dramatically reduced in these cells. It was also assumed that improper assembly of the MRN complex takes place in these cells due to the reduction in NBS1 levels [298]. Although the misregulation of some DSB repair factors could explain the accumulation of DNA damages, supplementary investigations are still required to associate the reduced levels of these factors with the observed defects in NHEJ or HR. Finally, another study also identified a role of Lamin B1 in the control of HR via its interaction with RAD51 and the stabilization of this key HR factor [299]. The transient depletion of Lamin B1 by siRNA in U2OS cells led to an increased sensitivity to IR and an impaired HR efficiency. In these cells, the formation of RAD51 foci after IR was impaired. It was proposed that an interaction between Lamin B1 and RAD51 favors the stabilization of RAD51 after IR, through the inhibition of proteasomal degradation, thereby regulating HR [299].

5.1.5. Lamins and Other DNA Repair Mechanisms

Recently, the role of lamins in other DNA repair mechanisms such as Base excision repair (BER) or Nucleotide excision repair (NER) has been also investigated. Indeed, *LMNA*-null cells showed a reduced expression of proteins involved in BER such as PARP1, LIG3, and POL β and a decreased activity of APE1 and POL β . These defects led to an accumulation of 8-oxoguanine and an increased frequency of substitution mutations in *LMNA*-deficient cells [300].

Another study reported that HGPS patient cells and cells deficient for ZMPSTE24 show an aberrant accumulation of the XPA protein, which is involved in NER, at sites of DNA damages [301].

It has been also shown that a decrease in Lamin B1 levels leads to a defect in UV-induced DNA damage repair, associated with an increased sensitivity to UV irradiation, a delay in DNA repair foci formation, and in damage removal. These results are correlated with a reduction in the protein levels of DDB1 and CSB, both of which are key factors of NER [302].

Altogether, these studies suggest that the levels of lamin proteins have to be finely regulated to avoid defects in expression, stability, or nuclear transport of different key DNA repair factors, in addition to subsequent DNA repair defects and genome instability.

5.2. Lamins and Telomere Maintenance

In mammals, the protective T-loop structure of telomeres and the complex of telomeric proteins, named shelterin, found at telomeres, are essential for genome stability [303,304]. Indeed, this particular structure and the associated proteins ensure that the telomere extremities are not recognized as DSBs, thus preventing an ATM-dependent DDR and NHEJ or HR to occur at the ends of chromosomes. A defect in telomere protection induced by the functional loss of one of the major shelterin proteins, TRF2 (by the expression of TRF2 Δ BM), leads to damages at telomeres (known as telomere dysfunction-induced foci, TIFs), end-to-end chromosome fusions, senescence, or apoptosis [305–308]. In addition to its role in T-loop formation [309–312], TRF2 inhibits the ATM-dependent DNA damage response as well as NHEJ and HR at telomeres, thanks to its interactions with different factors involved in these processes [313–317].

Links between telomeres, NE and lamins, especially Lamin A/C, have been reported. In mammals, meiotic telomeres are clustered to the NE and move along during meiotic prophase I [318]. After mitosis in somatic cells, at the stage of NE reassembly, telomeres are transiently enriched at the nuclear periphery [319]. Recently, contact between telomeres and the nuclear rim was also detected using the MadID approach in G1/S arrested HeLa cells [320]. A subset of telomeres is also found close to the nuclear periphery during replication [321]. As previous studies had suggested that human telomeres are attached to the nuclear matrix [322], lamins may play a role in tethering telomeres to the nuclear matrix or to the NE, (most) likely in different phases of the cell cycle.

During the senescence of mesenchymal stem cells, an aggregation and re-localization of telomeres at the lamina were observed [323]. Interestingly, a shortening of telomeres has been reported in HGPS cells [248,324,325] and also upon the expression of Progerin in fibroblasts [326]. This shortening is associated with TIFs and telomeric aberrations. Recently, it was proposed that the DDR activation at telomeres participates in progeroid detrimental phenotypes of HGPS mouse model [327]. In addition, a deficiency of Lamin A in mouse cells leads to the attrition of telomeres and a defect in their localization. Moreover, an interaction between Lamin A/C (but not Progerin) and TRF2 stabilizes T-loops with interstitial telomeric sequences (ITL), suggested/proposed to be novel chromosome-end structures [328].

The impact of Lamin B1 on telomere stability has been poorly explored. Our team showed that Lamin B1 overexpression leads to NE alteration and induction of senescence [239]. Interestingly, another team reported that this proliferative defect in Lamin B1-overexpressing cells is rescued by the telomerase catalytic subunit hTERT, suggesting that telomeric alterations could be involved in this phenotype [263].

Altogether, these data suggest that the levels of lamins or the NE/matrix organization play an important role in DNA repair mechanisms and telomere maintenance. Thus, one could suggest that a misregulation of lamins may participate in genome instability, aging phenotypes, and may also participate in tumorigenesis, particularly in the case of senescence escape.

5.3. Lamins, Replication, and Replicative Stress

Several lines of evidence also reveal an implication of lamins in DNA replication and in the management of replicative stress (Figure 7).

5.3.1. On Replication Progression

Early studies in *Xenopus* eggs extracts depleted for lamins or expressing mutant form of lamins agree on the necessity of an intact NL for proper replication and PCNA localization [329–332]. However, these studies implicate lamins either in the initiation phase of replication [329,330] or in its elongation phase [331,332]. Lamin A and Lamin B1 nuclear foci/structures are also found at replication sites, respectively, in early or mid-late S phase (PCNA staining colocalization or BrdU incorporation) [218,333]. Consistently, Lamin A is associated in the early S phase with MCM3 and the replicative polymerase POL ϵ , POL α , and POL δ , while in the late S phase, only the association with MCM3 and POL ϵ remains [334]. More recently, a lamins IgG-like domain was shown to interact with PCNA in vitro [335]. The PCNA-Lamin A interaction was also confirmed by GST-pull down in non-challenged cells [336] and in a yeast two-hybrids screen [337]. Interestingly, Prelamin A and Progerin seem to interact even better with PCNA than mature Lamin A [336,338–340]. Those observations have led to the hypothesis that Prelamin A and/or Progerin sequesters PCNA, as evidenced by the diminution of MCM7-PCNA interaction in HGPS cells [339] or by the increased PCNA monoubiquitination and the increased colocalization of POL η and PCNA foci with γ H2AX after Prelamin A ectopic expression [336]. PCNA interaction with Prelamin A and/or Progerin would therefore prevent its interaction with Lamin A and induce stalled RF, thus revealing a role for Lamin A in RF progression.

Interestingly, more mechanistic insight has emerged in recent years concerning Lamin A implication in the replication process although the picture is still incomplete. *LMNA*^{-/-} cells spend more time in the S-phase [341] while Progerin expressing cells have delayed passage through the S-phase [340]. Importantly, BrdU CHIPs analyses and iPOND results reveal the presence of Lamin A (and C) on newly synthesized DNA along with PCNA [298,340], but not that of Progerin [340]. Besides, while less PCNA immunoprecipitated from Progerin expressing cells, γ H2AX is found on the nascent DNA in these cells, reinforcing the idea that Progerin sequesters PCNA, away from the active RF. Thus, PCNA sequestration could be one reason behind the replicative stress observed [340]. Moreover, it was recently observed that while Lamin A overexpression had no effect, ectopic ex-

pression of progerin in unchallenged cells induces slowdown of the RF progression and increases its stalling, leaving the fork unprotected and subjected to MRE11-dependent degradation [342].

Reports of a role of Lamin B1 in replication have also been made. Lamin B1 extinction seems to delay growth due to the extension of the S phase duration, rather than a defect of S-phase entry and suggest the inhibition of late origin firing and/or of fork progression [343]. Indeed, Lamin B1-depleted cells are capable of EdU incorporation, despite spending more time in the S phase and present signs of replicative stress [343]. Although Lamin B1 was not associated with newly synthesized DNA, less PCNA and RPA were bound to the nascent DNA in Lamin B1-depleted cells [298]. The increase in CDC6 protein level, the sensitivity to depletion of this licensing factor in LMNB1-depleted cells [343], and the observations mentioned above leads to the idea that Lamin B1 could have a role in the replication initiation, such as assembly of replicative complex and in fork progression, especially during the elongation phase.

5.3.2. Replication Timing

In eukaryotic cells, large regions of chromosome replicate simultaneously and in a temporally ordered manner, a phenomenon called the replication timing (RT) program [344].

The replication timing is very robust, cell-type specific, and more or less conserved between close species, although differences have been reported during differentiation. Genome-wide replication timing studies have more precisely revealed the existence of megabases domains of chromosome that replicate at defined time during the S phase and called constant timing regions (CTR). In-between early and late CTR, timing transition regions (TTR) have progressive changes in replication timing. Correlations have been made between transcription and replication timing. Indeed, actively transcribed region tends to replicate earlier in the S-phase, but differences can occur depending of the developmental stage or cell types. Interestingly, Lamina-associated domain (LAD) often have repressed chromatin and tend to have late replication timing [345,346]. The LADs have also been mostly mapped to late CTR and TTR. These genomic studies are also supported by the replication timing analysis of tagged loci in DT40 cells, where late replicating loci tend to be in closer proximity to Lamin B1. Furthermore, the allelic asynchrony in replication timing at the same locus is higher when the first allele to replicate is located in a central compartment and the second one at the periphery, as compared to both allele of the same locus being at the periphery of the nucleus [347]. Among the factors identified as playing a part in replication timing, RIF1 seems to be a primordial one. In the mouse genome, RIF1 interacting domains mostly correspond to late replicating regions and therefore strongly coincide with LAD. Of note, RIF1 is found at the nuclear periphery and coimmunoprecipitates with Lamin B1. Interestingly, as Lamin B1 interacting domains, not bound to RIF1, have less synchronized replication timing and cannot be strictly categorized as a late replicating region, RIF1 seems essential for late replication only in regions devoid of Lamin B1 interactions [348]. Therefore, one could speculate that Lamin B1 through interaction with RIF1 might participate in the synchronized (late) replication of interacting domain. The role of lamins in replication timing was emphasized by a recent study showing that temporal order of replication is altered in Progeria (HGPS) cells. A specific "Progeria" RT signature, containing regions that replicate early in progeria, but replicate later in cells from healthy donors, was identified. Interestingly, one of the earliest RT alterations corresponds to the *P63* gene. This RT defect was also found in fibroblasts from Rothmund-Thompson syndrome patients, another premature aging disease. The authors suggest that this altered RT and the subsequent abnormal *P63* gene expression could be linked to some pathophysiological manifestations of progeroid diseases [349].

5.3.3. During Replicative Stress

Lamins also seems to intervene in the management of the replicative stress, essentially through defective recruitment of DNA repair or stalled fork protection factors.

Lamin A was reported to maintain the stalled RFs [296]. Indeed, LMNA-depleted cells have increased sensitivity to treatment preventing RF progression such as topoisomerase inhibitors (camptothecin), crosslink inducing agents (cisplatin, mitomycin C, formaldehyde) or replication stress inducing agents (hydroxyurea, HU). Interestingly, release from HU increased stalled fork and reduced new origin firing in these cells, while more radial chromosomes are observed. Surprisingly, no HR repair efficiency defect was measurable in these cells, although defective recruitment of repair factor (such as MRE11, CtIP, RAD51, RPA, FANCD2) was found after the HU treatment [296]. Yet, in another study, although the monitoring of HR repair efficiency was performed with the same reporter, a defect was reported after shLamin A depletion and correlated to a decrease protein and transcription level of BRCA1 and RAD51 [292]. The difference in lamin A downregulation level might contribute to the difference observed in these HR repair efficiency reports.

Using a Lamin-binding ligand (LBL1), a Lamin A-RAD51 interaction was identified to prevent RAD51 degradation or to ensure RAD51 stability and might therefore protect HR repair efficiency [350]. These reports suggest that the defective HR repair or stalled fork protection might be the issue behind replication stress management.

In Progerin-accumulating cells, the replication stress and damage observed is proposed to result from the sequestration of PCNA by Progerin, leading to an aberrant recruitment of XPA at stalled/collapse forks and the subsequent defective recruitment of repair factors, such as RAD50 and RAD51 [301,339].

Therefore, it seems there is a bundle of evidence suggesting that Lamin A deregulation impairs RAD51 function in replicative stress management.

Lamin B1 seems also involved in replication stress management. Indeed, LMNB1 depletion increases fork stalling and impedes fork restart upon release from HU treatment [298]. The LMNB1-depleted cells also affected levels of repair proteins such as an increase in 53BP1, BRCA1, pATR, CHK1, and pCHK1 but a decrease in NBS, RAD51, and DNA-PK. Following camptothecin treatment, LMNB1-depleted cells presents decreased survival, which is also accompanied by the absence of MRE11 recruitment. This suggest that Lamin B1 defect could affect the recruitment of protein implicated in early step of the DDR, such as signalization through the recruitment of MRN complex. Lamin B1 also binds the promoter of many HR proteins, leaving the possibility that it might regulate their expression, although no absolute correlation has been made so far. For instance, Lamin B1 binds to both *RAD51* and *BRCA1* promoter and respectively a decrease and an increase level of the protein is found in LMNB1-depleted cells [298].

6. A Link between Nuclear Envelope Integrity, DNA Damage, Inflammation, and Aging: The Case of the HGP Syndrome

The mechanisms leading to “inflammaging” in premature pathological aging or in physiological aging must be precisely understood in order to be able to improve health during old age. Different reports suggest a link between nuclear organization or NE integrity, lamins, inflammation, and aging [351,352]. Indeed, NE and/or micronuclei integrity are important to shield genetic material against genotoxic insults (such as oxidative stress as discussed in [259]) and importantly to avoid leakage of self-DNA in cytoplasm, which will trigger an inflammatory response, being recognized by different DNA sensors such as cGAS protein. It has been shown that the cGAS-STING signalling is activated in HGPS cells [342] and in a murine progeria model [353] (likely due to DNA repair defect or replicative stress). The AIM2 inflammasome pathway is also activated by pharmacological disruption of NE integrity [354].

Here we discuss the link between replicative stress, NE integrity, and inflammation in the case of HGPs.

Recent data support that replication stress could be a major cause of genomic instability in laminopathies/or as observed in HGPS, which could contribute to the activation of an innate immune responses to self-DNA and inflammation that in turn may accelerate the aging process (Figure 8).

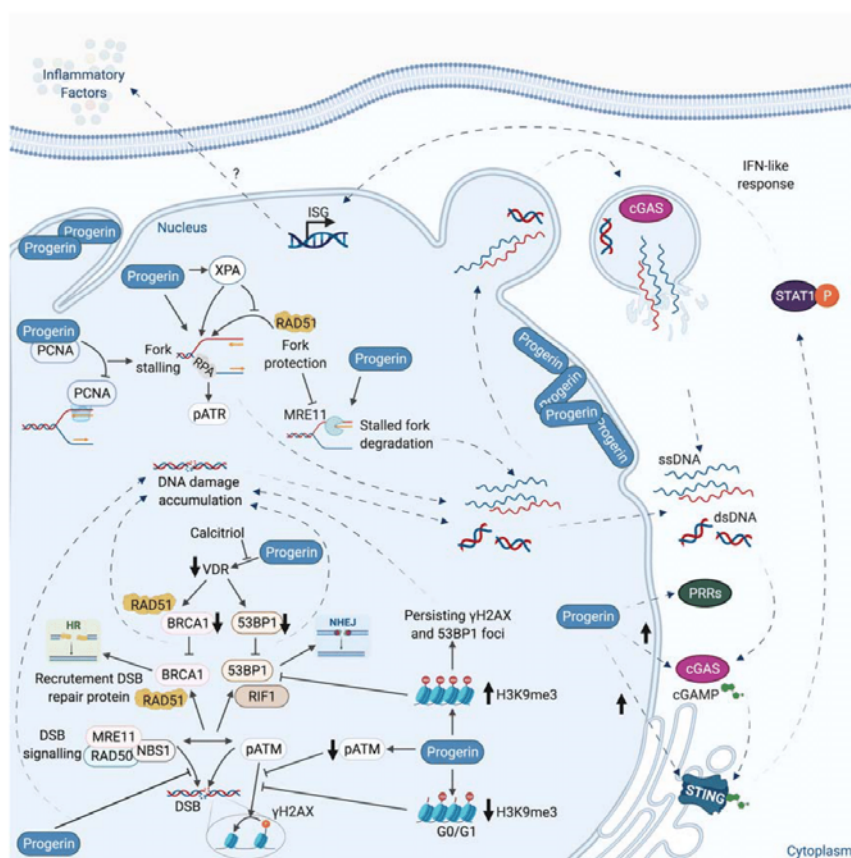


Figure 8. Progerin expression in HGPS leads to DNA repair defect, replicative stress, and inflammation through DNA sensing in the cytosol. Expression of Progerin and the ensuing genomic instability has recently been reported to contribute to the activation cGAS-STAT1 pathway and the production of an inflammatory response that may accelerate the aging process in HGPS cells. Indeed, Progerin accumulation leads to replicative stress by the sequestration of PCNA, away from the fork, and aberrant recruitment of XPA to stalled fork, which impedes their RAD51-dependent protection leading to degradation of stalled fork by MRE11. HGPS cells present an important accumulation of DNA damage due in part to the decreased level of VDR caused by Progerin which leads to a diminution of key DNA repair factor such as RAD51, BRCA1 (leading likely an HR defect) and 53BP1. Recently, it was reported that a calcitriol treatment could reduce the effect of Progerin accumulation on the VDR level, thus partially rescuing DSB repair mechanism in HGPS cells. It has also been shown altered histone modifications in Progerin accumulating cells, leading to reduced level of H3K9me3 in G0/G1 cells, inducing a defective ATM activation and defective amplification of the γ H2AX signal in response to the DSBs and an impaired recruitment of 53BP1 and RIF1 during NHEJ. In contrast, it has been also reported (in early passage), an increase of SUV39 protein and H3K9me3; the condensed chromatin preventing access to DNA repair factors lead to persistent DNA damage. Depletion of SUV39 H1 rescue the DNA repair factor recruitment. As described previously, replicative stress and DNA damage accumulation (through the different mechanisms described here) can lead to cytosolic DNA production, which activate the cGAS-STING pathway and production of inflammatory factors. Moreover, Progerin accumulation has been reported to increase proteins levels of cGAS, STING, and PRRs and induce a IFN-like response mediated by STAT1. As a result, Progerin cells show an increased level of ISG.

Recently, the team of Gonzalo showed an increase in inflammatory cytokine expression through cGAS activation upon Progerin expression [8,342]. This result is in agreement with the previous description of a NF- κ B-dependent inflammation observed in *ZMPSTE24*^{-/-} mice (a murine progeria model) [252], since NF- κ B activation may result also from cGAS-STING-TBK1 pathway. Importantly the cytokine expression was linked to replicative stress observed in HGPS. Indeed, fiber assay show an augmentation of stalled RF upon Progerin expression. In addition, nucleolytic degradation of stalled RF was observed upon Progerin expression. This could be explained by deprotection of stalled forks, due for instance to a defect of RAD51 and BRCA1 recruitment in HGPS cells. Indeed, Mirin treatment, an MRE11 inhibitor, rescued fork degradation, showing an involvement of MRE11 [342]. An uncontrolled degradation by nucleases of RFs was previously linked with cytosolic DNA production and cGAS-STING activation in context of SAMHD1 deficiency [5,212]. In addition, *BRCA1*^{-/-} defective cells also show an increase of cytosolic DNA.

Importantly, cytokine expression after Progerin expression is abolished after calcitriol (Vitamin D) treatment. Indeed, Vitamin D receptor (VDR) is involved in genome stability, and HGPS cells reduce the expression of VDR due to Progerin accumulation [97]. Treatment with calcitriol increases VDR level and restores RAD51 levels. Calcitriol treatment was also comparable to the mirin treatment and rescue decreased stalled fork degradation in Progerin expressing cells, thus leading to a diminution of IFN response [342].

Expression of Progerin has been reported in atherosclerotic coronary arteries from aging individuals [233,355]. Interestingly, Progerin overexpression in endothelial cells recapitulates some features of aging-associated endothelial cell dysfunction, including a proinflammatory phenotype and oxidative stress, together with persistent DNA damage. In accordance with a pathogenic role for the persistence of the farnesyl moiety of Progerin, pharmacological inhibition of farnesylation partly restored endothelial cell function [254].

In combination with the genetic instability and replicative stress observed in Progerin expression, it is possible that the perturbation of NE structure in HGPS cells could also favor genomic DNA leakage and its release into cytoplasm. Cytosolic DNA accumulation activates the cGAS-STING pathway and production of inflammatory factors [356]. Replicative stress and DNA damage lead, upon mitosis, to micronuclei formation, shielding mis-segregated chromatin or lagging chromosomes. Micronuclei envelope fragility has been linked to cGAS activation during mitosis [357]. Indeed, cGAS has been shown to colocalize with micronuclei and the sensing of DNA into micronuclei could activate the STING pathway [358]. Recently, cytoplasmic chromatin fragments (CCF) present in the micronuclei derived from the main nucleus were shown to trigger cGAS-STING innate immune signaling and cellular senescence [359].

In addition, with NE fragility, the disruption of micronuclei envelope may lead to DNA leakage and cytosolic DNA accumulation in HGPS. It has been shown that Lamin B1 depletion, but not Lamin B2 and A/C, leads to micronuclei disruption, which was characterized by large holes in the micronuclei envelope. Interestingly overexpression of Lamin B2 impedes this mechanism, likely by avoiding rupture of the micronuclei envelope [360]. The importance of lamins in micronuclei stability and in subsequent cellular responses has been illustrated recently by a study showing that, upon paclitaxel treatment, cGAS co-localizes with micronuclei and triggers not only an inflammatory response but also apoptotic death of neighbour cells. This cellular death is dependent of the pro-apoptotic Bcl-2 family member, NOXA. Interestingly overexpression of Lamin B2 impedes this mechanism, likely by avoiding rupture of the micronuclei envelope [361].

In agreement, with this hypothesis linking NSA, micronuclei, and inflammation, it has been recently reported that the Muscle stem cells (MSCs) from *ZMPSTE24*^{-/-} mice, exhibit increased nuclear abnormalities, cytoskeletal stiffness, and the presence of cytoplasmic chromatin fragment in cGAS-positive micronuclei. These cells have elevated expression of SASP that negatively impact muscle stem cell function. Interestingly, RhoA signalling promotes nuclear abnormalities and cellular senescence in these cells. Inhibition of this signalling reduces F-actin polymerisation, nuclear blebbing, DNA damage, cGAS-

STING signaling, and cellular senescence. Consequently, the RhoA inhibition rescue extended the defective phenotypes in skeletal muscle and extended the healthspan of *ZMPSTE24*^{-/-} mice [353]. This study suggests that abnormal activation of cGAS-STING pathway could be detrimental in HGPs and that RhoA might serve as a promising target for therapeutic treatment of HGPs. Rescue of NE shape alteration was also previously proposed as a therapeutic strategy for HGPs. This rescue of nuclear shape can be performed by Remodelin, an NAT10 acetyl-transferase inhibitor [362,363]. Interestingly, it was recently published that NAT10 may be involved in micronuclei formation (through regulation of DNA replication) and may have activated a SASP signaling in colorectal cancer cells [364].

Finally, one could also propose that Progerin expression may lead to inflammation, by affecting chromosome domain organization, especially chromatin location at the periphery and alteration of gene expression associated with LADs and consequent abnormal induction of some inflammatory factors as SASP genes, as has been observed in the case of Lamin B1 extinction [261].

7. Concluding Remarks

In this review, we present the DSB repair mechanisms, the important role of HR factors to protect and restart stalled forks. The in-depth knowledge of DNA repair mechanisms and especially of management of replicative stress has already made it possible to propose novel anti-tumoral strategies. Using the concept of synthetic lethality, targeted treatment with PARP1 inhibitors of HR-deficient tumors is one example [365–369]. However, the emergence of resistance to this treatment still requires active research in this area of DSB repair to continue improving our knowledge and offer personalized treatment.

Studying the link between DNA damage accumulation, replicative stress, and cGAS-dependent inflammation is also important for understanding many human pathologies. These pathologies include inflammatory pathologies (such as Aicardie Gouttières), severe inflammatory situations (such as in the event of a “cytokine storm” during viral Covid19 infection), cancers and also pathologies associated with normal or premature aging. As also proposed by others, targeting the cytoplasmic chromatin-mediated pathway may hold promise in the treatment of inflammation-related disorders [359]. In addition, a link between STING activation and efficiency of radiotherapy [370–372] and also immunotherapy [373,374] has recently been highlighted. Novel strategies are proposed to strengthen the STING pathway, in combination (or not) to immunotherapy, to improve conventional anti-tumoral treatment, especially to transform cold tumor (refractory to immunotherapy) to hot tumors.

We also discuss the role of lamins in DNA repair. Altered level lamins affect the recruitment of key DSB repair (and replication) factors, through different mechanisms (altered transport through nucleus, gene expression and/or DNA damage signaling). This raises the question about their potential role more generally on genome stability and their potential role during tumorigenesis. Alteration of NE shape has been used for decades by cytologists as a prognostic factor for tumor aggressiveness. However, the causes and consequences on the tumorigenesis process are still unclear. Of course, misregulation or altered levels of lamins found in different tumors may account for the NE shape alterations. Misregulation of lamins are often associated with tumor aggressiveness and metastasis, and this alteration of lamin level, especially increased level of Lamin B1, has been suggested as a biomarker and even as a therapeutic target [271]. How the lamins level is altered is not yet understood in different tumors. It could be suggested that oxidative stress, which was also associated with aggressive stage of tumors and potentiate tumor dissemination [375,376], might participate in the increase of Lamin B1 level. Indeed, our team and others showed that Lamin B1 is upregulated in oxidative stress situations [239,240,259,265]. Since it has not been reported yet that mouse models with lamins deficiency or lamins overexpression are more prone to develop cancer, it is unlikely that alteration lamins level participate alone in the initiation of tumorigenesis. However, recent studies highlight the role of

lamins in DNA repair and in replication, consequently in the control of inflammatory factors production. This might suggest an impact of the dysregulation of these key nuclear components in tumorigenesis progression through genome instability and the production of an inflammatory tumor environment, which are both important hallmarks of cancer [277]. In addition, deformation or fragility of NE can also lead to DNA damage (as it has been shown during constrained cellular migration [377]), and could therefore participate in a leakage of DNA fragments in cytoplasmic compartment or their increased accessibility by DNA sensors. Although the innate immune response is beneficial in destroying cells carrying DNA damages and may participate in protection against tumor development, the accumulation of DNA damage may lead to a chronic inflammatory microenvironment, which could instead favor tumor progression. For instance, IL-6 or IL-8 production is associated with the epithelial-mesenchymal transition [378]. The altered level of lamins and thus the alterations of the NE may also have an impact on the formation of micronuclei and on their permeability (to the cGAS factor for example). The formation of micronuclei upon mitosis is a consequence of genome instability (consequence of DNA repair defect or replicative stress), but could be also a cause of alterations in the genome since it has been suggested to participate in chromothripsis [357,379,380].

The level of Lamin B1 is also affected during the establishment of senescence and also in different tumors. Decrease of Lamin B1 affects the expression of many DNA repair factors, although the cause of these differential expressions is not fully understood. However, to know whether lower and higher level of lamins could directly participate in or worsen the genome instability and thus participate in tumorigenesis, especially after escape of senescence, require further investigations.

Another important role of lamins is their involvement in senescence and aging. What can we learn about the recently described connection between NE envelope alteration, genome stability, and inflammation?

It is known that Progerin is expressed during normal aging [230–234]. Expression of Progerin leads to DNA damage accumulation (as it is observed in HGP's cells) and also participates in replicative stress and inflammation through activation of the cGAS-STING pathway. Further experiments remain to be done to address the role of Progerin in inflammatory pathologies associated with normal aging. The mechanisms leading to “inflammaging” in premature pathological aging or in physiological aging must be precisely understood in order to consider (therapeutical approaches) an improvement of health during old age. Important novel connection between cGAS, senescence, SASP and aging has been reported [6,213,216,381,382]. Targeting the pathway(s) responsible for the formation/signalling of cytosolic DNA may offer a new therapeutical avenue for treating diseases relating to normal or premature aging.

In conclusion, recent findings and current research establishing, on the one hand, the link between DNA damage, in particular replicative stress with inflammation, and on the other hand, the relationship between the integrity of the NE and the response to DNA damage, will undoubtedly bring progress in the understanding of the mechanisms of premature or normal aging and also of tumorigenesis. Ultimately, this will bring therapeutic avenues to improve health during old age, which is a major societal issue, but also to new personalized anti-tumor strategies.

Author Contributions: S.W., E.R., P.F.-R. and P.B. wrote the paper; P.W. participated in the writing; A.M. participated in the writing and editing of the paper. E.R., P.F.-R. and P.B. designed the figures and P.F.-R., E.R. and P.W. prepared the figures. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work was supported by the Ligue Nationale Contre le Cancer (Ile de France committee; Association for Research against Cancer (Fondation ARC), n° ARCPJA32020070002430; AT Europe Association; “Radiobiology program” CEA grant; EDF grant V3-101 and V3-103; INCA grant n°2015-112; AFM-Téléthon grant, n° 21566; Emergence Cancéropôle IDF grant, n° R20037LL and INSERM house funding. S.W. is a recipient of a CEA Phare PhD fellowship and of a Fondation ARC fellowship; ER was a recipient of a post-doc fellowship from FRM #ARF20151234948; PF-R was a recipient of a

PhD fellowship from University Paris Saclay (ED SDSV) and of a Ligue Nationale Contre le Cancer fellowship. A.M. was a recipient of a CEA DSV IRTELIS international PhD fellowship and of a Fondation ARC fellowship. P.W. is supported by a Ligue Nationale Contre le Cancer PhD fellowship.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Not applicable.

Acknowledgments: We want to acknowledge members of the LREV team, especially Gaelle Penarun for her proofreading the part concerning the connection between lamins and telomeres. Most of the figures were prepared using Biorender.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

- Berti, M.; Vindigni, M.B.A. Replication stress: Getting back on track. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2016**, *23*, 103–109. [\[CrossRef\]](#)
- Berti, M.; Cortez, D.; Lopes, M. The Plasticity of DNA Replication Forks in Response to Clinically Relevant Genotoxic Stress. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2020**. [\[CrossRef\]](#)
- Pasero, P.; Vindigni, A. Nucleases Acting at Stalled Forks: How to Reboot the Replication Program with a Few Shortcuts. *Annu. Rev. Genet.* **2017**, *51*, 477–499. [\[CrossRef\]](#)
- Ragu, S.; Matos-Rodrigues, G.; Lopez, B.S. Replication Stress, DNA Damage, Inflammatory Cytokines and Innate Immune Response. *Genes* **2020**, *11*, 409. [\[CrossRef\]](#)
- Coquel, F.; Neumayer, C.; Lin, Y.-L.; Pasero, P. SAMHD1 and the Innate Immune Response to Cytosolic DNA during DNA Replication. *Curr. Opin. Immunol.* **2019**, *56*, 24–30. [\[CrossRef\]](#)
- Glück, S.; Guey, B.; Gulen, M.F.; Wolter, K.; Kang, T.-W.; Schmacke, N.A.; Bridgeman, A.; Rehwinkel, J.; Zender, L.; Ablasser, A. Innate Immune Sensing of Cytosolic Chromatin Fragments through cGAS Promotes Senescence. *Nat. Cell Biol.* **2017**, *19*, 1061–1070. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Hatch, E.M. Nuclear Envelope Rupture: Little Holes, Big Openings. *Curr. Opin. Cell Biol.* **2018**, *52*, 66–72. [\[CrossRef\]](#)
- Gonzalo, S.; Coll-Bonfill, N. Genomic Instability and Innate Immune Responses to Self-DNA in Progeria. *GeroScience* **2019**, *41*, 255–266. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Wei, P.-C.; Chang, A.N.; Kao, J.; Du, Z.; Meyers, R.M.; Alt, F.W.; Schwer, B. Long Neural Genes Harbor Recurrent DNA Break Clusters in Neural Stem/Progenitor Cells. *Cell* **2016**, *164*, 644–655. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Madabhushi, R.; Gao, F.; Pfenning, A.R.; Pan, L.; Yamakawa, S.; Seo, J.; Rueda, R.; Phan, T.X.; Yamakawa, H.; Pao, P.-C.; et al. Activity-Induced DNA Breaks Govern the Expression of Neuronal Early-Response Genes. *Cell* **2015**, *161*, 1592–1605. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Wang, J.L.; Duboc, C.; Wu, Q.; Ochi, T.; Liang, S.; Tsutakawa, S.E.; Lees-Miller, S.P.; Nadal, M.; Tainer, J.A.; Blundell, T.L.; et al. Dissection of DNA Double-Strand-Break Repair Using Novel Single-Molecule Forceps. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2018**, *25*, 482–487. [\[CrossRef\]](#)
- Graham, T.G.W.; Walter, J.C.; Loparo, J.J. Two-Stage Synapsis of DNA Ends during Non-Homologous End Joining. *Mol. Cell* **2016**, *61*, 850–858. [\[CrossRef\]](#)
- Reid, D.A.; Keegan, S.; Leo-Macias, A.; Watanabe, G.; Strande, N.T.; Chang, H.H.; Oksuz, B.A.; Fenyo, D.; Lieber, M.R.; Ramsden, D.A.; et al. Organization and Dynamics of the Nonhomologous End-Joining Machinery during DNA Double-Strand Break Repair. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2015**, *112*, E2575–E2584. [\[CrossRef\]](#)
- Zhao, B.; Watanabe, G.; Morten, M.J.; Reid, D.A.; Rothenberg, E.; Lieber, M.R. The Essential Elements for the Noncovalent Association of Two DNA Ends during NHEJ Synapsis. *Nat. Commun.* **2019**, *10*, 3588. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Buck, D.; Malivert, L.; de Chasseval, R.; Barraud, A.; Fondaneche, M.; Sanal, O.; Plebani, A.; Stephan, J.; Hufnagel, M.; le Deist, F.; et al. Cernunnos, a Novel Nonhomologous End-Joining Factor, Is Mutated in Human Immunodeficiency with Microcephaly. *Cell* **2006**, *124*, 287–299. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Ahnesorg, P.; Smith, P.; Jackson, S.P. XLF Interacts with the XRCC4-DNA Ligase IV Complex to Promote DNA Nonhomologous End-Joining. *Cell* **2006**, *124*, 301–313. [\[CrossRef\]](#)
- Riballo, E.; Woodbine, L.; Stiff, T.; Walker, S.; Goodarzi, A.; Jeggo, P. XLF-Cernunnos Promotes DNA Ligase IV-XRCC4 Re-Adenylation Following Ligation. *Nucleic Acids Res.* **2009**, *37*, 482–492. [\[CrossRef\]](#)
- Tadi, S.K.; Tellier-Lebègue, C.; Nemoz, C.; Drevet, P.; Audebert, S.; Roy, S.; Meek, K.; Charbonnier, J.-B.; Modesti, M. PAXX Is an Accessory c-NHEJ Factor That Associates with Ku70 and Has Overlapping Functions with XLF. *Cell Rep.* **2016**, *17*, 541–555. [\[CrossRef\]](#)
- Ochi, T.; Blackford, A.N.; Coates, J.; Jhujh, S.; Mehmood, S.; Tamura, N.; Travers, J.; Wu, Q.; Draviam, V.M.; Robinson, C.V.; et al. DNA Repair. PAXX, a Paralog of XRCC4 and XLF, Interacts with Ku to Promote DNA Double-Strand Break Repair. *Science* **2015**, *347*, 185–188. [\[CrossRef\]](#)

20. Brouwer, I.; Sitters, G.; Candelli, A.; Heerema, S.J.; Heller, I.; de Melo, A.J.; Zhang, H.; Normanno, D.; Modesti, M.; Peterman, E.J.G.; et al. Sliding Sleeves of XRCC4-XLF Bridge DNA and Connect Fragments of Broken DNA. *Nature* **2016**, *535*, 566–569. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
21. Ropars, V.; Drevet, P.; Legrand, P.; Bacconnais, S.; Amram, J.; Faure, G.; Márquez, J.A.; Piétrement, O.; Guerois, R.; Callebaut, I.; et al. Structural Characterization of Filaments Formed by Human Xrcc4-Cernunnos/XLF Complex Involved in Nonhomologous DNA End-Joining. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2011**, *108*, 12663–12668. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Andres, S.N.; Vergnes, A.; Ristic, D.; Wyman, C.; Modesti, M.; Junop, M. A Human XRCC4-XLF Complex Bridges DNA. *Nucleic Acids Res.* **2012**, *40*, 1868–1878. [[CrossRef](#)]
23. Hammel, M.; Rey, M.; Yu, Y.; Mani, R.S.; Classen, S.; Liu, M.; Pique, M.E.; Fang, S.; Mahaney, B.L.; Weinfeld, M.; et al. XRCC4 Protein Interactions with XRCC4-like Factor (XLF) Create an Extended Grooved Scaffold for DNA Ligation and Double Strand Break Repair. *J. Biol. Chem.* **2011**, *286*, 32638–32650. [[CrossRef](#)]
24. Nemoz, C.; Ropars, V.; Frit, P.; Gontier, A.; Drevet, P.; Yu, J.; Guerois, R.; Pitois, A.; Comte, A.; Delteil, C.; et al. XLF and APLF Bind Ku80 at Two Remote Sites to Ensure DNA Repair by Non-Homologous End Joining. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2018**, *25*, 971–980. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Zhao, B.; Rothenberg, E.; Ramsden, D.A.; Lieber, M.R. The Molecular Basis and Disease Relevance of Non-Homologous DNA End Joining. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2020**, *21*, 765–781. [[CrossRef](#)]
26. Guirouilh-Barbat, J.; Huck, S.; Bertrand, P.; Pirzio, L.; Desmaze, C.; Sabatier, L.; Lopez, B.S. Impact of the KU80 Pathway on NHEJ-Induced Genome Rearrangements in Mammalian Cells. *Mol. Cell* **2004**, *14*, 611–623. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Guirouilh-Barbat, J.; Rass, E.; Plo, I.; Bertrand, P.; Lopez, B. Defects in XRCC4 and KU80 Differentially Affect the Joining of Distal Nonhomologous Ends. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 20902–20907. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Rass, E.; Grabarz, A.; Plo, I.; Gautier, J.; Bertrand, P.; Lopez, B. Role of Mre11 in Chromosomal Nonhomologous End Joining in Mammalian Cells. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2009**, *16*, 819–824. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Grabarz, A.; Guirouilh-Barbat, J.; Barascu, A.; Pennarun, G.; Genet, D.; Rass, E.; Germann, S.; Bertrand, P.; Hickson, I.; Lopez, B. A Role for BLM in Double-Strand Break Repair Pathway Choice: Prevention of CtIP/Mre11-Mediated Alternative Nonhomologous End-Joining. *Cell Rep.* **2013**, *5*, 21–28. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Betermier, M.; Bertrand, P.; Lopez, B. Is Non-Homologous End-Joining Really an Inherently Error-Prone Process? *PLoS Genet.* **2014**, *10*, e1004086. [[CrossRef](#)]
31. Wang, H.; Perrault, A.R.; Takeda, Y.; Qin, W.; Iliakis, G. Biochemical Evidence for Ku-Independent Backup Pathways of NHEJ. *Nucleic Acids Res.* **2003**, *31*, 5377–5388. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Wang, H.; Rosidi, B.; Perrault, R.; Wang, M.; Zhang, L.; Windhofer, F.; Iliakis, G. DNA Ligase III as a Candidate Component of Backup Pathways of Nonhomologous End Joining. *Cancer Res.* **2005**, *65*, 4020–4030. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Wang, M.; Wu, W.; Wu, W.; Rosidi, B.; Zhang, L.; Wang, H.; Iliakis, G. PARP-1 and Ku Compete for Repair of DNA Double Strand Breaks by Distinct NHEJ Pathways. *Nucleic Acids Res.* **2006**, *34*, 6170–6182. [[CrossRef](#)]
34. Audebert, M.; Salles, B.; Calsou, P. Involvement of poly(ADP-Ribose) Polymerase-1 and XRCC1/DNA Ligase III in an Alternative Route for DNA Double-Strand Breaks Rejoining. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 55117–55126. [[CrossRef](#)]
35. Xie, A.; Kwok, A.; Scully, R. Role of Mammalian Mre11 in Classical and Alternative Nonhomologous End Joining. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2009**, *16*, 814–818. [[CrossRef](#)]
36. Grabarz, A.; Barascu, A.; Guirouilh-Barbat, J.; Lopez, B. Initiation of DNA Double Strand Break Repair: Signaling and Single-Stranded Resection Dictate the Choice between Homologous Recombination, Non-Homologous End-Joining and Alternative End-Joining. *Am. J. Cancer Res.* **2012**, *2*, 249–268.
37. Beck, C.; Boehler, C.; Guirouilh Barbat, J.; Bonnet, M.; Illuzzi, G.; Ronde, P.; Gauthier, L.; Magroun, N.; Rajendran, A.; Lopez, B.; et al. PARP3 Affects the Relative Contribution of Homologous Recombination and Nonhomologous End-Joining Pathways. *Nucleic Acids Res.* **2014**, *42*, 5616–5632. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Mateos-Gomez, P.A.; Gong, F.; Nair, N.; Miller, K.M.; Lazzarini-Denchi, E.; Sfeir, A. Mammalian Polymerase θ Promotes Alternative NHEJ and Suppresses Recombination. *Nature* **2015**, *518*, 254–257. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Ceccaldi, R.; Rondinelli, B.; D'Andrea, A.D. Repair Pathway Choices and Consequences at the Double-Strand Break. *Trends Cell Biol.* **2016**, *26*, 52–64. [[CrossRef](#)]
40. Ceccaldi, R.; Liu, J.C.; Amunugama, R.; Hajdu, I.; Primack, B.; Petalcorin, M.I.R.; O'Connor, K.W.; Konstantinopoulos, P.A.; Elledge, S.J.; Boulton, S.J.; et al. Homologous-Recombination-Deficient Tumours Are Dependent on Pol θ -Mediated Repair. *Nature* **2015**, *518*, 258–262. [[CrossRef](#)]
41. Daley, J.M.; Niu, H.; Miller, A.S.; Sung, P. Biochemical mechanism of DSB end resection and its regulation. *DNA Repair* **2015**, *32*, 66–74. [[CrossRef](#)]
42. Cejka, P. DNA End Resection: Nucleases Team Up with the Right Partners to Initiate Homologous Recombination. *J. Biol. Chem.* **2015**, *290*, 22931–22938. [[CrossRef](#)]
43. Prakash, R.; Zhang, Y.; Feng, W.; Jasin, M. Homologous Recombination and Human Health: The Roles of BRCA1, BRCA2, and Associated Proteins. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2015**, *7*, a016600. [[CrossRef](#)]
44. Mehta, A.; Haber, J.E. Sources of DNA Double-Strand Breaks and Models of Recombinational DNA Repair. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2014**, *6*, a016428. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

45. Li, J.; Sun, H.; Huang, Y.; Wang, Y.; Liu, Y.; Chen, X. Pathways and assays for DNA double-strand break repair by homologous recombination. *Acta Biochim. Biophys. Sin.* **2019**, *51*, 879–889. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Ranjha, L.; Howard, S.M.; Cejka, P. Main Steps in DNA Double-Strand Break Repair: An Introduction to Homologous Recombination and Related Processes. *Chromosoma* **2018**, *127*, 187–214. [[CrossRef](#)]
47. Guirouilh-Barbat, J.; Lambert, S.; Bertrand, P.; Lopez, B. Is Homologous Recombination Really an Error-Free Process? *Front. Genet.* **2014**, *5*, 175. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Sakofsky, C.J.; Malkova, A. Break Induced Replication in Eukaryotes: Mechanisms, Functions, and Consequences. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **2017**, *52*, 395–413. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
49. Costantino, L.; Sotiriou, S.K.; Rantala, J.K.; Magin, S.; Mladenov, E.; Helleday, T.; Haber, J.E.; Iliakis, G.; Kallioniemi, O.P.; Halazonetis, T.D. Break-Induced Replication Repair of Damaged Forks Induces Genomic Duplications in Human Cells. *Science* **2014**, *343*, 88–91. [[CrossRef](#)]
50. Roumelioti, F.-M.; Sotiriou, S.K.; Katsini, V.; Chiourea, M.; Halazonetis, T.D.; Gagos, S. Alternative Lengthening of Human Telomeres Is a Conservative DNA Replication Process with Features of Break-Induced Replication. *EMBO Rep.* **2016**, *17*, 1731–1737. [[CrossRef](#)]
51. Dilley, R.L.; Verma, P.; Cho, N.W.; Winters, H.D.; Wondisford, A.R.; Greenberg, R.A. Break-Induced Telomere Synthesis Underlies Alternative Telomere Maintenance. *Nature* **2016**, *539*, 54–58. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Yang, Z.; Takai, K.K.; Lovejoy, C.A.; de Lange, T. Break-Induced Replication Promotes Fragile Telomere Formation. *Genes Dev.* **2010**, *34*, 1392–1405. [[CrossRef](#)]
53. Carr, A.M.; Lambert, S. Replication Stress-Induced Genome Instability: The Dark Side of Replication Maintenance by Homologous Recombination. *J. Mol. Biol.* **2013**, *425*, 4733–4744. [[CrossRef](#)]
54. Ait Saada, A.; Lambert, S.A.E.; Carr, A.M. Preserving Replication Fork Integrity and Competence via the Homologous Recombination Pathway. *DNA Repair* **2018**, *71*, 135–147. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Cortez, D. Replication-Coupled DNA Repair. *Mol. Cell* **2019**, *74*, 866–876. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Rickman, K.; Smogorzewska, A. Advances in Understanding DNA Processing and Protection at Stalled Replication Forks. *J. Cell Biol.* **2019**, *218*, 1096–1107. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
57. Zeman, M.K.; Cimprich, K.A. Causes and Consequences of Replication Stress. *Nat. Cell Biol.* **2014**, *16*, 2–9. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
58. Irani, K.; Xia, Y.; Zweier, J.L.; Sollott, S.J.; Der, C.J.; Fearon, E.R.; Sundaresan, M.; Finkel, T.; Goldschmidt-Clermont, P.J. Mitogenic Signaling Mediated by Oxidants in Ras-Transformed Fibroblasts. *Science* **1997**, *275*, 1649–1652. [[CrossRef](#)]
59. Vafa, O.; Wade, M.; Kern, S.; Beeche, M.; Pandita, T.K.; Hampton, G.M.; Wahl, G.M. C-Myc Can Induce DNA Damage, Increase Reactive Oxygen Species, and Mitigate p53 Function: A Mechanism for Oncogene-Induced Genetic Instability. *Mol. Cell* **2002**, *9*, 1031–1044. [[CrossRef](#)]
60. Di Micco, R.; Fumagalli, M.; Cicalese, A.; Piccinin, S.; Gasparini, P.; Luise, C.; Schurra, C.; Garre', M.; Nuciforo, P.; Bensimon, A.; et al. Oncogene-Induced Senescence Is a DNA Damage Response Triggered by DNA Hyper-Replication. *Nature* **2006**, *444*, 638–642. [[CrossRef](#)]
61. Maya-Mendoza, A.; Ostrakova, J.; Kosar, M.; Hall, A.; Duskova, P.; Mistrik, M.; Merchut-Maya, J.M.; Hodny, Z.; Bartkova, J.; Christensen, C.; et al. Myc and Ras Oncogenes Engage Different Energy Metabolism Programs and Evoke Distinct Patterns of Oxidative and DNA Replication Stress. *Mol. Oncol.* **2015**, *9*, 601–616. [[CrossRef](#)]
62. Tubbs, A.; Nussenzweig, A. Endogenous DNA Damage as a Source of Genomic Instability in Cancer. *Cell* **2017**, *168*, 644–656. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
63. Wallace, S.S. Biological Consequences of Free Radical-Damaged DNA Bases. *Free Radic. Biol. Med. Vol.* **2002**, *33*, 1–14. [[CrossRef](#)]
64. Wilhelm, T.; Ragu, S.; Magdalou, I.; Machon, C.; Dardillac, E.; Técher, H.; Guitton, J.; Debatisse, M.; Lopez, B.S. Slow Replication Fork Velocity of Homologous Recombination-Defective Cells Results from Endogenous Oxidative Stress. *PLoS Genet.* **2016**, *12*, e1006007. [[CrossRef](#)]
65. Zellweger, R.; Dalcher, D.; Mutreja, K.; Berti, M.; Schmid, J.A.; Herrador, R.; Vindigni, A.; Lopes, M. Rad51-Mediated Replication Fork Reversal Is a Global Response to Genotoxic Treatments in Human Cells. *J. Cell Biol.* **2015**, *208*, 563–579. [[CrossRef](#)]
66. Somyajit, K.; Gupta, R.; Sedlackova, H.; Neelsen, K.J.; Ochs, F.; Rask, M.-B.; Choudhary, C.; Lukas, J. Redox-Sensitive Alteration of Replisome Architecture Safeguards Genome Integrity. *Science* **2017**, *358*, 797–802. [[CrossRef](#)]
67. Aller, P.; Rould, M.A.; Hogg, M.; Wallace, S.S.; Doublé, S. A Structural Rationale for Stalling of a Replicative DNA Polymerase at the Most Common Oxidative Thymine Lesion, Thymine Glycol. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 814–818. [[CrossRef](#)]
68. Hegde, M.L.; Hegde, P.M.; Bellot, L.J.; Mandal, S.M.; Hazra, T.K.; Li, G.-M.; Boldogh, I.; Tomkinson, A.E.; Mitra, S. Prereplicative Repair of Oxidized Bases in the Human Genome Is Mediated by NEIL1 DNA Glycosylase Together with Replication Proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2013**, *110*, E3090–E3099. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
69. Berquist, B.R.; Wilson, D.M. Pathways for Repairing and Tolerating the Spectrum of Oxidative DNA Lesions. *Cancer Lett.* **2012**, *327*, 61–72. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
70. Bj Rås, K.Ø.; Sousa, M.M.L.; Sharma, A.; Fonseca, D.M.; S Gaard, C.K.; Bj Rås, M.; Otterlei, M. Monitoring of the Spatial and Temporal Dynamics of BER/SSBR Pathway Proteins, Including MYH, UNG2, MPG, NTH1 and NEIL1–3, during DNA Replication. *Nucleic Acids Res.* **2017**, *45*, 8291–8301. [[CrossRef](#)]

71. Visnes, T.; Benítez-Buelga, C.; Cázares-Körner, A.; Sanjiv, K.; Hanna, B.M.F.; Mortusewicz, O.; Rajagopal, V.; Albers, J.J.; Hagey, D.W.; Bekkhus, T.; et al. Targeting OGG1 Arrests Cancer Cell Proliferation by Inducing Replication Stress. *Nucleic Acids Res.* **2020**, *48*, 12234–12251. [[CrossRef](#)]
72. Boyer, A.-S.; Grgurevic, S.; Cazaux, C.; Hoffmann, J.-S. The Human Specialized DNA Polymerases and Non-B DNA: Vital Relationships to Preserve Genome Integrity. *J. Mol. Biol.* **2013**, *425*, 4767–4781. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
73. Madireddy, A.; Gerhardt, J. Replication through Repetitive DNA Elements and Their Role in Human Diseases. In *DNA Replication*; Masai, H., Foiani, M., Eds.; Advances in Experimental Medicine and Biology; Springer: Singapore, 2017; Volume 1042, pp. 549–581. ISBN 978-981-10-6954-3.
74. Tubbs, A.; Sridharan, S.; van Wietmarschen, N.; Maman, Y.; Callen, E.; Stanlie, A.; Wu, W.; Wu, X.; Day, A.; Wong, N.; et al. Dual Roles of Poly(dA:dT) Tracts in Replication Initiation and Fork Collapse. *Cell* **2018**, *174*, 1127–1142.e19. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
75. Shastri, N.; Tsai, Y.-C.; Hile, S.; Jordan, D.; Powell, B.; Chen, J.; Maloney, D.; Dose, M.; Lo, Y.; Anastassiadis, T.; et al. Genome-Wide Identification of Structure-Forming Repeats as Principal Sites of Fork Collapse upon ATR Inhibition. *Mol. Cell* **2018**, *72*, 222–238.e11. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
76. Wang, G.; Vasquez, K. Effects of Replication and Transcription on DNA Structure-Related Genetic Instability. *Genes* **2017**, *8*, 17. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
77. Besnard, E.; Babled, A.; Lapasset, L.; Milhavet, O.; Parrinello, H.; Dantec, C.; Marin, J.-M.; Lemaitre, J.-M. Unraveling Cell Type-Specific and Reprogrammable Human Replication Origin Signatures Associated with G-Quadruplex Consensus Motifs. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2012**, *19*, 837–844. [[CrossRef](#)]
78. Lansdorp, P.; Van Wietmarschen, N. Helicases FANCI, RTEL1 and BLM Act on Guanine Quadruplex DNA in Vivo. *Genes* **2019**, *10*, 870. [[CrossRef](#)]
79. Schwab, R.A.; Nieminuszczy, J.; Shin-ya, K.; Niedzwiedz, W. FANCI Couples Replication Past Natural Fork Barriers with Maintenance of Chromatin Structure. *J. Cell Biol.* **2013**, *201*, 33–48. [[CrossRef](#)]
80. Valton, A.-L.; Prioleau, M.-N. G-Quadruplexes in DNA Replication: A Problem or a Necessity? *Trends Genet.* **2016**, *32*, 697–706. [[CrossRef](#)]
81. Santos-Pereira, J.M.; Aguilera, A. R loops: New modulators of genome dynamics and function. *Nat. Rev. Genet.* **2015**, *16*, 583–597. [[CrossRef](#)]
82. Garcia-Muse, T.; Aguilera, A. Transcription–replication Conflicts: How They Occur and How They Are Resolved. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2016**, *17*, 553–563. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
83. Lin, Y.-L.; Pasero, P. Interference between DNA Replication and Transcription as a Cause of Genomic Instability. *Curr. Genom.* **2012**, *13*, 65–73. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
84. Hamperl, S.; Bocek, M.J.; Saldivar, J.C.; Swigut, T.; Cimprich, K.A. Transcription-Replication Conflict Orientation Modulates R-Loop Levels and Activates Distinct DNA Damage Responses. *Cell* **2017**, *170*, 774–786.e19. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
85. Wood, M.; Quinet, A.; Lin, Y.-L.; Davis, A.A.; Pasero, P.; Ayala, Y.M.; Vindigni, A. TDP-43 Dysfunction Results in R-Loop Accumulation and DNA Replication Defects. *J. Cell Sci.* **2020**, *133*. [[CrossRef](#)]
86. Brambati, A.; Zardoni, L.; Nardini, E.; Pellicoli, A.; Liberi, G. The Dark Side of RNA: DNA Hybrids. *Mutat. Res. Mutat. Res.* **2020**, *784*, 108300. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
87. Liu, S.; Hua, Y.; Wang, J.; Li, L.; Yuan, J.; Zhang, B.; Wang, Z.; Ji, J.; Kong, D. RNA Polymerase III Is Required for the Repair of DNA Double-Strand Breaks by Homologous Recombination. *Cell* **2021**, *184*, 1314–1329.e10. [[CrossRef](#)]
88. Helmrich, A.; Ballarino, M.; Tora, L. Collisions between Replication and Transcription Complexes Cause Common Fragile Site Instability at the Longest Human Genes. *Mol. Cell* **2011**, *44*, 966–977. [[CrossRef](#)]
89. Tuduri, S.; Crabbé, L.; Conti, C.; Tourrière, H.; Holtgreve-Grez, H.; Jauch, A.; Pantescio, V.; De Vos, J.; Thomas, A.; Theillet, C.; et al. Topoisomerase I Suppresses Genomic Instability by Preventing Interference between Replication and Transcription. *Nat. Cell Biol.* **2009**, *11*, 1315–1324. [[CrossRef](#)]
90. Maffia, A.; Ranise, C.; Sabbioneda, S. From R-Loops to G-Quadruplexes: Emerging New Threats for the Replication Fork. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 1506. [[CrossRef](#)]
91. Puget, N.; Miller, K.M.; Legube, G. Non-Canonical DNA/RNA Structures during Transcription-Coupled Double-Strand Break Repair: Roadblocks or Bona Fide Repair Intermediates? *DNA Repair* **2019**, *81*, 102661. [[CrossRef](#)]
92. Garcia-Muse, T.; Aguilera, A. R Loops: From Physiological to Pathological Roles. *Cell* **2019**, *179*, 604–618. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
93. Kotsantis, P.; Petermann, E.; Boulton, S.J. Mechanisms of Oncogene-Induced Replication Stress: Jigsaw Falling into Place. *Cancer Discov.* **2018**, *8*, 537–555. [[CrossRef](#)]
94. Primo, L.M.F.; Teixeira, L.K. DNA Replication Stress: Oncogenes in the Spotlight. *Genet. Mol. Biol.* **2019**, *43*, e20190138. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
95. Halazonetis, T.D.; Gorgoulis, V.G.; Bartek, J. An Oncogene-Induced DNA Damage Model for Cancer Development. *Science* **2008**, *319*, 1352–1355. [[CrossRef](#)]
96. Macheret, M.; Halazonetis, T.D. Intragenic Origins due to Short G1 Phases Underlie Oncogene-Induced DNA Replication Stress. *Nature* **2018**, *555*, 112–116. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
97. Graziano, S.; Johnston, R.; Deng, O.; Zhang, J.; Gonzalo, S. Vitamin D/Vitamin D Receptor Axis Regulates DNA Repair during Oncogene-Induced Senescence. *Oncogene* **2016**, *35*, 5362–5376. [[CrossRef](#)]
98. Ciccio, A.; Elledge, S.J. The DNA Damage Response: Making It Safe to Play with Knives. *Mol. Cell* **2010**, *40*, 179–204. [[CrossRef](#)]

99. Clauson, C.; Schärer, O.D.; Niedernhofer, L. Advances in Understanding the Complex Mechanisms of DNA Interstrand Cross-Link Repair. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2013**, *5*, a012732. [[CrossRef](#)]
100. Ceccaldi, R.; Sarangi, P.; D'Andrea, A.D. The Fanconi Anaemia Pathway: New Players and New Functions. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2016**, *17*, 337–349. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
101. García-de-Teresa, B.; Rodriguez, A.; Frias, S. Chromosome Instability in Fanconi Anemia: From Breaks to Phenotypic Consequences. *Genes* **2020**, *11*, 15288. [[CrossRef](#)]
102. Bester, A.C.; Roniger, M.; Oren, Y.S.; Im, M.M.; Sarni, D.; Chaoat, M.; Bensimon, A.; Zamir, G.; Shewach, D.S.; Kerem, B. Nucleotide Deficiency Promotes Genomic Instability in Early Stages of Cancer Development. *Cell* **2011**, *145*, 435–446. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
103. Chabosseau, P.; Buhagiar-Labarchède, G.; Onclercq-Delic, R.; Lambert, S.; Debatisse, M.; Brison, O.; Amor-Guélet, M. Pyrimidine Pool Imbalance Induced by BLM Helicase Deficiency Contributes to Genetic Instability in Bloom Syndrome. *Nat. Commun.* **2011**, *2*, 368. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
104. Beck, H.; Nähse-Kumpf, V.; Larsen, M.S.Y.; O'Hanlon, K.A.; Patzke, S.; Holmberg, C.; Mejlvang, J.; Groth, A.; Nielsen, O.; Syljuäsen, R.G.; et al. Cyclin-Dependent Kinase Suppression by WEE1 Kinase Protects the Genome through Control of Replication Initiation and Nucleotide Consumption. *Mol. Cell Biol.* **2012**, *32*, 4226–4236. [[CrossRef](#)]
105. Di Micco, R.; Fumagalli, M.; d'Adda di Fagagna, F. Breaking News: High-Speed Race Ends in Arrest—How Oncogenes Induce Senescence. *Trends Cell Biol.* **2007**, *17*, 529–536. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
106. Gaillard, H.; García-Muse, T.; Aguilera, A. Replication Stress and Cancer. *Nat. Rev. Cancer* **2015**, *15*, 276–289. [[CrossRef](#)]
107. Blumenfeld, B.; Ben-Zimra, M.; Simon, I. Perturbations in the Replication Program Contribute to Genomic Instability in Cancer. *Int. J. Mol. Sci.* **2017**, *18*, 1138. [[CrossRef](#)]
108. Zou, L.; Elledge, S.J. Sensing DNA Damage through ATRIP Recognition of RPA-ssDNA Complexes. *Science* **2003**, *300*, 1542–1548. [[CrossRef](#)]
109. Cortez, D.; Guntuku, S.; Qin, J.; Elledge, S.J. ATR and ATRIP: Partners in Checkpoint Signaling. *Science* **2001**, *294*, 1713–1716. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
110. Byun, T.S.; Pacek, M.; Yee, M.; Walter, J.C.; Cimprich, K.A. Functional Uncoupling of MCM Helicase and DNA Polymerase Activities Activates the ATR-Dependent Checkpoint. *Genes Dev.* **2005**, *19*, 1040–1052. [[CrossRef](#)]
111. Cotta-Ramusino, C.; McDonald, E.R.; Hurov, K.; Sowa, M.E.; Harper, J.W.; Elledge, S.J. A DNA Damage Response Screen Identifies RHINO, a 9-1-1 and TopBP1 Interacting Protein Required for ATR Signaling. *Science* **2011**, *332*, 1313–1317. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
112. Lindsey-Boltz, L.A.; Kemp, M.G.; Capp, C.; Sancar, A. RHINO Forms a Stoichiometric Complex with the 9-1-1 Checkpoint Clamp and Mediates ATR-Chk1 Signaling. *Cell Cycle* **2015**, *14*, 99–108. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
113. Duursma, A.M.; Driscoll, R.; Elias, J.E.; Cimprich, K.A. A Role for the MRN Complex in ATR Activation through TOPBP1 Recruitment. *Mol. Cell* **2013**, *50*, 116–122. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
114. Kumagai, A.; Lee, J.; Yoo, H.Y.; Dunphy, W.G. TopBP1 Activates the ATR-ATRIP Complex. *Cell* **2006**, *124*, 943–955. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
115. MacDougall, C.A.; Byun, T.S.; Van, C.; Yee, M.; Cimprich, K.A. The Structural Determinants of Checkpoint Activation. *Genes Dev.* **2007**, *21*, 898–903. [[CrossRef](#)]
116. Bass, T.E.; Luzwick, J.W.; Kavanaugh, G.; Carroll, C.; Dungrawala, H.; Glick, G.G.; Feldkamp, M.D.; Putney, R.; Chazin, W.J.; Cortez, D. ETAA1 Acts at Stalled Replication Forks to Maintain Genome Integrity. *Nat. Cell Biol.* **2016**, *18*, 1185–1195. [[CrossRef](#)]
117. Haahr, P.; Hoffmann, S.; Tollenaere, M.A.X.; Ho, T.; Toledo, L.I.; Mann, M.; Bekker-Jensen, S.; Räschle, M.; Mailand, N. Activation of the ATR Kinase by the RPA-Binding Protein ETAA1. *Nat. Cell Biol.* **2016**, *18*, 1196–1207. [[CrossRef](#)]
118. Lee, Y.-C.; Zhou, Q.; Chen, J.; Yuan, J. RPA-Binding Protein ETAA1 Is an ATR Activator Involved in DNA Replication Stress Response. *Curr. Biol. CB* **2016**, *26*, 3257–3268. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
119. Saldivar, J.C.; Cortez, D.; Cimprich, K.A. The Essential Kinase ATR: Ensuring Faithful Duplication of a Challenging Genome. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2017**, *18*, 622–636. [[CrossRef](#)]
120. Toledo, L.I.; Altmeyer, M.; Rask, M.-B.; Lukas, C.; Larsen, D.H.; Povlsen, L.K.; Bekker-Jensen, S.; Mailand, N.; Bartek, J.; Lukas, J. ATR Prohibits Replication Catastrophe by Preventing Global Exhaustion of RPA. *Cell* **2013**, *155*, 1088–1103. [[CrossRef](#)]
121. Dungrawala, H.; Rose, K.L.; Bhat, K.P.; Mohni, K.N.; Glick, G.G.; Couch, F.B.; Cortez, D. The Replication Checkpoint Prevents Two Types of Fork Collapse without Regulating Replisome Stability. *Mol. Cell* **2015**, *59*, 998–1010. [[CrossRef](#)]
122. Cortez, D. Preventing Replication Fork Collapse to Maintain Genome Integrity. *DNA Repair* **2015**, *32*, 149–157. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
123. Teixeira-Silva, A.; Ait Saada, A.; Hardy, J.; Iraqui, I.; Nocente, M.C.; Fréon, K.; Lambert, S.A.E. The End-Joining Factor Ku Acts in the End-Resection of Double Strand Break-Free Arrested Replication Forks. *Nat. Commun.* **2017**, *8*, 1982. [[CrossRef](#)]
124. Sotiriou, S.K.; Kamileri, I.; Lugli, N.; Evangelou, K.; Da-Ré, C.; Huber, F.; Padayachy, L.; Tardy, S.; Nicati, N.L.; Barriot, S.; et al. Mammalian RAD52 Functions in Break-Induced Replication Repair of Collapsed DNA Replication Forks. *Mol. Cell* **2016**, *64*, 1127–1134. [[CrossRef](#)]
125. Schlacher, K.; Christ, N.; Siaud, N.; Egashira, A.; Wu, H.; Jasin, M. Double-Strand Break Repair Independent Role for BRCA2 in Blocking Stalled Replication Fork Degradation by MRE11. *Cell* **2011**, *145*, 529–542. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

126. Lemaçon, D.; Jackson, J.; Quinet, A.; Brickner, J.R.; Li, S.; Yazinski, S.; You, Z.; Ira, G.; Zou, L.; Mosammaparast, N.; et al. MRE11 and EXO1 Nucleases Degrade Reversed Forks and Elicit MUS81-Dependent Fork Rescue in BRCA2-Deficient Cells. *Nat. Commun.* **2017**, *8*, 860. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
127. Billing, D.; Horiguchi, M.; Wu-Baer, F.; Tagliatalata, A.; Leuzzi, G.; Alvarez Nanez, S.; Jiang, W.; Zha, S.; Szabolcs, M.; Lin, C.-S.; et al. The BRCT Domains of the BRCA1 and BARD1 Tumor Suppressors Differentially Regulate Homology-Directed Repair and Stalled Fork Protection. *Mol. Cell* **2018**, *72*, 127–139.e8. [[CrossRef](#)]
128. Daza-Martin, M.; Starowicz, K.; Jamshad, M.; Tye, S.; Ronson, G.E.; MacKay, H.L.; Chauhan, A.S.; Walker, A.K.; Stone, H.R.; Beesley, J.F.; et al. Isomerization of BRCA1-BARD1 Promotes Replication Fork Protection. *Nature* **2019**, *571*, 521–527. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
129. Hashimoto, Y.; Ray Chaudhuri, A.; Lopes, M.; Costanzo, V. Rad51 Protects Nascent DNA from Mre11-Dependent Degradation and Promotes Continuous DNA Synthesis. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2010**, *17*, 1305–1311. [[CrossRef](#)]
130. Zadorozhny, K.; Sannino, V.; Beláň, O.; Mičoušková, J.; Špirek, M.; Costanzo, V.; Krejčí, L. Fanconi-Anemia-Associated Mutations Destabilize RAD51 Filaments and Impair Replication Fork Protection. *Cell Rep.* **2017**, *21*, 333–340. [[CrossRef](#)]
131. Mijic, S.; Zellweger, R.; Chappidi, N.; Berti, M.; Jacobs, K.; Mutreja, K.; Ursich, S.; Ray Chaudhuri, A.; Nussenzweig, A.; Janscak, P.; et al. Replication Fork Reversal Triggers Fork Degradation in BRCA2-Defective Cells. *Nat. Commun.* **2017**, *8*, 859. [[CrossRef](#)]
132. Mason, J.M.; Chan, Y.-L.; Weichselbaum, R.W.; Bishop, D.K. Non-Enzymatic Roles of Human RAD51 at Stalled Replication Forks. *Nat. Commun.* **2019**, *10*, 4410. [[CrossRef](#)]
133. Quinet, A.; Lemaçon, D.; Vindigni, A. Replication Fork Reversal: Players and Guardians. *Mol. Cell* **2017**, *68*, 830–833. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
134. Kolinjivadi, A.M.; Sannino, V.; De Antoni, A.; Zadorozhny, K.; Kilkenny, M.; Técher, H.; Baldi, G.; Shen, R.; Ciccio, A.; Pellegrini, L.; et al. SMC1-Mediated Fork Reversal Triggers Mre11-Dependent Degradation of Nascent DNA in the Absence of Brca2 and Stable Rad51 Nucleofilaments. *Mol. Cell* **2017**, *67*, 867–881.e7. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
135. Przetocka, S.; Porro, A.; Bolck, H.A.; Walker, C.; Lezaja, A.; Trenner, A.; von Aesch, C.; Himmels, S.-F.; D'Andrea, A.D.; Ceccaldi, R.; et al. CtIP-Mediated Fork Protection Synergizes with BRCA1 to Suppress Genomic Instability upon DNA Replication Stress. *Mol. Cell* **2018**, *72*, 568–582.e6. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
136. Tagliatalata, A.; Alvarez, S.; Leuzzi, G.; Sannino, V.; Ranjha, L.; Huang, J.-W.; Madubata, C.; Anand, R.; Levy, B.; Rabadan, R.; et al. Restoration of Replication Fork Stability in BRCA1- and BRCA2-Deficient Cells by Inactivation of SNF2-Family Fork Remodelers. *Mol. Cell* **2017**, *68*, 414–430.e8. [[CrossRef](#)]
137. Higgs, M.R.; Stewart, G.S. Protection or Resection: BOD1L as a Novel Replication Fork Protection Factor. *Nucleus* **2016**, *7*, 34–40. [[CrossRef](#)]
138. Saintigny, Y.; Delacote, F.; Vares, G.; Petitot, F.; Lambert, S.; Averbeck, D.; Lopez, B.S. Characterization of Homologous Recombination Induced by Replication Inhibition in Mammalian Cells. *Embo J.* **2001**, *20*, 3861–3870. [[CrossRef](#)]
139. Mills, K.D.; Ferguson, D.O.; Essers, J.; Eckersdorff, M.; Kanaar, R.; Alt, F.W. Rad54 and DNA Ligase IV Cooperate to Maintain Mammalian Chromatid Stability. *Genes Dev.* **2004**, *18*, 1283–1292. [[CrossRef](#)]
140. Couedel, C.; Mills, K.D.; Barchi, M.; Shen, L.; Olshen, A.; Johnson, R.D.; Nussenzweig, A.; Essers, J.; Kanaar, R.; Li, G.C.; et al. Collaboration of Homologous Recombination and Nonhomologous End-Joining Factors for the Survival and Integrity of Mice and Cells. *Genes Dev.* **2004**, *18*, 1293–1304. [[CrossRef](#)]
141. Mukherjee, C.; Tripathi, V.; Manolika, E.M.; Heijink, A.M.; Ricci, G.; Merzouk, S.; de Boer, H.R.; Demmers, J.; van Vugt, M.A.T.M.; Ray Chaudhuri, A. RIF1 Promotes Replication Fork Protection and Efficient Restart to Maintain Genome Stability. *Nat. Commun.* **2019**, *10*, 3287. [[CrossRef](#)]
142. Chen, B.-R.; Quinet, A.; Byrum, A.K.; Jackson, J.; Berti, M.; Thangavel, S.; Bredemeyer, A.L.; Hindi, I.; Mosammaparast, N.; Tyler, J.K.; et al. XLF and H2AX Function in Series to Promote Replication Fork Stability. *J. Cell Biol.* **2019**, *218*, 2113–2123. [[CrossRef](#)]
143. Costanzo, V.; Robertson, K.; Bibikova, M.; Kim, E.; Grieco, D.; Gottesman, M.; Carroll, D.; Gautier, J. Mre11 Protein Complex Prevents Double-Strand Break Accumulation during Chromosomal DNA Replication. *Mol. Cell* **2001**, *8*, 137–147. [[CrossRef](#)]
144. Costanzo, V. Brca2, Rad51 and Mre11: Performing Balancing Acts on Replication Forks. *DNA Repair* **2011**, *10*, 1060–1065. [[CrossRef](#)]
145. Chaudhuri, I.; Stroik, D.R.; Sobek, A. FANCD2-Controlled Chromatin Access of the Fanconi-Associated Nuclease FAN1 Is Crucial for the Recovery of Stalled Replication Forks. *Mol. Cell Biol.* **2014**, *34*, 3939–3954. [[CrossRef](#)]
146. Yeo, J.E.; Lee, E.H.; Hendrickson, E.A.; Sobek, A. CtIP Mediates Replication Fork Recovery in a FANCD2-Regulated Manner. *Hum. Mol. Genet.* **2014**, *23*, 3695–3705. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
147. Zheng, L.; Zhou, M.; Chai, Q.; Parrish, J.; Xue, D.; Patrick, S.M.; Turchi, J.J.; Yannone, S.M.; Chen, D.; Shen, B. Novel Function of the Flap Endonuclease 1 Complex in Processing Stalled DNA Replication Forks. *EMBO Rep.* **2005**, *6*, 83–89. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
148. Dehé, P.-M.; Gaillard, P.-H.L. Control of Structure-Specific Endonucleases to Maintain Genome Stability. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2017**, *18*, 315–330. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
149. Guervilly, J.-H.; Takedachi, A.; Naim, V.; Scaglione, S.; Chawhan, C.; Lovera, Y.; Despras, E.; Kuraoka, I.; Kannouche, P.; Rosselli, F.; et al. The SLX4 Complex Is a SUMO E3 Ligase That Impacts on Replication Stress Outcome and Genome Stability. *Mol. Cell* **2015**, *57*, 123–137. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
150. Ragland, R.L.; Patel, S.; Rivard, R.S.; Smith, K.; Peters, A.A.; Bielinsky, A.-K.; Brown, E.J. RNF4 and PLK1 Are Required for Replication Fork Collapse in ATR-Deficient Cells. *Genes Dev.* **2013**, *27*, 2259–2273. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

151. Malacaria, E.; Franchitto, A.; Pichierri, P. SLX4 Prevents GEN1-Dependent DSBs during DNA Replication Arrest Under Pathological Conditions in Human Cells. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 44464. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
152. Hanada, K.; Budzowska, M.; Davies, S.L.; van Drunen, E.; Onizawa, H.; Beverloo, H.B.; Maas, A.; Essers, J.; Hickson, I.D.; Kanaar, R. The Structure-Specific Endonuclease Mus81 Contributes to Replication Restart by Generating Double-Strand DNA Breaks. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2007**, *14*, 1096–1104. [[CrossRef](#)]
153. Shimura, T.; Torres, M.J.; Martin, M.M.; Rao, V.A.; Pommier, Y.; Katsura, M.; Miyagawa, K.; Aladjem, M.I. Bloom's Syndrome Helicase and Mus81 Are Required to Induce Transient Double-Strand DNA Breaks in Response to DNA Replication Stress. *J. Mol. Biol.* **2008**, *375*, 1152–1164. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
154. Regairaz, M.; Zhang, Y.-W.; Fu, H.; Agama, K.K.; Tata, N.; Agrawal, S.; Aladjem, M.I.; Pommier, Y. Mus81-Mediated DNA Cleavage Resolves Replication Forks Stalled by Topoisomerase I-DNA Complexes. *J. Cell Biol.* **2011**, *195*, 739–749. [[CrossRef](#)]
155. Ying, S.; Minocherhomji, S.; Chan, K.L.; Palmai-Pallag, T.; Chu, W.K.; Wass, T.; Mankouri, H.W.; Liu, Y.; Hickson, I.D. MUS81 Promotes Common Fragile Site Expression. *Nat. Cell Biol.* **2013**, *15*, 1001–1007. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
156. Pepe, A.; West, S.C. MUS81-EME2 Promotes Replication Fork Restart. *Cell Rep.* **2014**, *7*, 1048–1055. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
157. Couch, F.B.; Bansbach, C.E.; Driscoll, R.; Luzwick, J.W.; Glick, G.G.; Bétous, R.; Carroll, C.M.; Jung, S.Y.; Qin, J.; Cimprich, K.A.; et al. ATR Phosphorylates SMARCA1 to Prevent Replication Fork Collapse. *Genes Dev.* **2013**, *27*, 1610–1623. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
158. Fugger, K.; Chu, W.K.; Haahr, P.; Kousholt, A.N.; Beck, H.; Payne, M.J.; Hanada, K.; Hickson, I.D.; Sørensen, C.S. FBH1 Cooperates with MUS81 in Inducing DNA Double-Strand Breaks and Cell Death Following Replication Stress. *Nat. Commun.* **2013**, *4*, 1423. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
159. Sharma, S.; Otterlei, M.; Sommers, J.A.; Driscoll, H.C.; Dianov, G.L.; Kao, H.-I.; Bambara, R.A.; Brosh, R.M. WRN Helicase and FEN-1 Form a Complex upon Replication Arrest and Together Process Branchmigrating DNA Structures Associated with the Replication Fork. *Mol. Biol. Cell* **2004**, *15*, 734–750. [[CrossRef](#)]
160. Sharma, S.; Sommers, J.A.; Gary, R.K.; Friedrich-Heineken, E.; Hübscher, U.; Brosh, R.M. The Interaction Site of Flap Endonuclease-1 with WRN Helicase Suggests a Coordination of WRN and PCNA. *Nucleic Acids Res.* **2005**, *33*, 6769–6781. [[CrossRef](#)]
161. Zhang, R.; Sengupta, S.; Yang, Q.; Linke, S.P.; Yanaiharu, N.; Bradsher, J.; Blais, V.; McGowan, C.H.; Harris, C.C. BLM Helicase Facilitates Mus81 Endonuclease Activity in Human Cells. *Cancer Res.* **2005**, *65*, 2526–2531. [[CrossRef](#)]
162. Thangavel, S.; Berti, M.; Levikova, M.; Pinto, C.; Gomathinayagam, S.; Vujanovic, M.; Zellweger, R.; Moore, H.; Lee, E.H.; Hendrickson, E.A.; et al. DNA2 Drives Processing and Restart of Reversed Replication Forks in Human Cells. *J. Cell Biol.* **2015**, *208*, 545–562. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
163. Duda, H.; Arter, M.; Gloggnitzer, J.; Teloni, F.; Wild, P.; Blanco, M.G.; Altmeyer, M.; Matos, J. A Mechanism for Controlled Breakage of Under-Replicated Chromosomes during Mitosis. *Dev. Cell* **2016**, *39*, 740–755. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
164. Quinet, A.; Tirman, S.; Cybulla, E.; Meroni, A.; Vindigni, A. To Skip or Not to Skip: Choosing Repriming to Tolerate DNA Damage. *Mol. Cell* **2021**. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
165. Sale, J.E.; Lehmann, A.R.; Woodgate, R. Sale Y-Family DNA Polymerases and Their Role in Tolerance of Cellular DNA Damage. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2012**, *13*, 141–152. [[CrossRef](#)]
166. Vaisman, A.; Woodgate, R. Translesion DNA Polymerases in Eukaryotes: What Makes Them Tick? *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **2017**, *52*, 274–303. [[CrossRef](#)]
167. Marians, K.J. Lesion Bypass and the Reactivation of Stalled Replication Forks. *Annu. Rev. Biochem.* **2018**, *87*, 217–238. [[CrossRef](#)]
168. Bianchi, J.; Rudd, S.G.; Jozwiakowski, S.K.; Bailey, L.J.; Soura, V.; Taylor, E.; Stevanovic, I.; Green, A.J.; Stracker, T.H.; Lindsay, H.D.; et al. Short Article PrimPol Bypasses UV Photoproducts during Eukaryotic Chromosomal DNA Replication. *Mol. Cell* **2013**, *52*, 566–573. [[CrossRef](#)]
169. García-Gómez, S.; Reyes, A.; Martínez-Jiménez, M.I.; Chocrón, E.S.; Mourón, S.; Terrados, G.; Powell, C.; Salido, E.; Méndez, J.; Holt, I.J.; et al. PrimPol, an Archaic Primase/Polymerase Operating in Human Cells. *Mol. Cell* **2013**, *52*, 541–553. [[CrossRef](#)]
170. Quinet, A.; Tirman, S.; Jackson, J.; Šviković, S.; Lemaçon, D.; Carvajal-Maldonado, D.; González-Acosta, D.; Vessoni, A.T.; Cybulla, E.; Wood, M.; et al. PRIMPOL-Mediated Adaptive Response Suppresses Replication Fork Reversal in BRCA-Deficient Cells. *Mol. Cell* **2020**, *77*, 461–474.e9. [[CrossRef](#)]
171. Bunting, S.; Callen, E.; Wong, N.; Chen, H.; Polato, F.; Gunn, A.; Bothmer, A.; Feldhahn, N.; Fernandez-Capetillo, O.; Cao, L.; et al. 53BP1 Inhibits Homologous Recombination in Brca1-Deficient Cells by Blocking Resection of DNA Breaks. *Cell* **2010**, *141*, 243–254. [[CrossRef](#)]
172. Bunting, S.F.; Callen, E.; Kozak, M.L.; Kim, J.-M.; Wong, N.; Lopez-Contreras, A.J.; Ludwig, T.; Baer, R.; Faryabi, R.B.; Malhowski, A.; et al. BRCA1 Functions Independently of Homologous Recombination in DNA Interstrand Cross-Link Repair. *Mol. Cell* **2012**, *46*, 125–135. [[CrossRef](#)]
173. Seo, A.; Steinberg-Shemer, O.; Unal, S.; Casadei, S.; Walsh, T.; Gumruk, F.; Shalev, S.; Shimamura, A.; Akarsu, N.A.; Tamary, H.; et al. Mechanism for Survival of Homozygous Nonsense Mutations in the Tumor Suppressor Gene BRCA1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2018**, *115*, 5241–5246. [[CrossRef](#)]
174. Venkitaraman, A.R. Tumour Suppressor Mechanisms in the Control of Chromosome Stability: Insights from BRCA2. *Mol. Cells* **2014**, *37*, 95–99. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
175. Gelot, C.; Guirouilh-Barbat, J.; Le Guen, T.; Dardillac, E.; Chailleux, C.; Canitrot, Y.; Lopez, B.S. The Cohesin Complex Prevents the End Joining of Distant DNA Double-Strand Ends. *Mol. Cell* **2016**, *61*, 15–26. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

176. Gelot, C.; Guirouilh-Barbat, J.; Lopez, B.S. The Cohesin Complex Prevents the End-Joining of Distant DNA Double-Strand Ends in S Phase: Consequences on Genome Stability Maintenance. *Nucl. Austin Tex.* **2016**, *7*, 339–345. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
177. Leman, A.R.; Noguchi, C.; Lee, C.Y.; Noguchi, E. Human Timeless and Tipin Stabilize Replication Forks and Facilitate Sister-Chromatid Cohesion. *J. Cell Sci.* **2010**, *123*, 660–670. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
178. Leman, A.R.; Noguchi, E. Local and Global Functions of Timeless and Tipin in Replication Fork Protection. *Cell Cycle* **2012**, *11*, 3945–3955. [[CrossRef](#)]
179. Setiawati, D.; Durocher, D. Shieldin—The Protector of DNA Ends. *EMBO Rep.* **2019**, *20*. [[CrossRef](#)]
180. Lee, D.-H.; Acharya, S.S.; Kwon, M.; Drane, P.; Guan, Y.; Adelmant, G.; Kalev, P.; Shah, J.; Pellman, D.; Marto, J.A.; et al. Dephosphorylation Enables the Recruitment of 53BP1 to Double-Strand DNA Breaks. *Mol. Cell* **2014**, *54*, 512–525. [[CrossRef](#)]
181. Zheng, X.-F.; Acharya, S.S.; Choe, K.N.; Nikhil, K.; Adelmant, G.; Satapathy, S.R.; Sharma, S.; Viccaro, K.; Rana, S.; Natarajan, A.; et al. A Mitotic CDK5-PP4 Phospho-Signaling Cascade Primes 53BP1 for DNA Repair in G1. *Nat. Commun.* **2019**, *10*, 4252. [[CrossRef](#)]
182. Orthwein, A.; Fradet-Turcotte, A.; Noordermeer, S.; Canny, M.; Brun, C.; Strecker, J.; Escribano-Diaz, C.; Durocher, D. Mitosis Inhibits DNA Double-Strand Break Repair to Guard against Telomere Fusions. *Science* **2014**, *344*, 189–193. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
183. Adamo, A.; Collis, S.J.; Adelman, C.A.; Silva, N.; Horejsi, Z.; Ward, J.D.; Martinez-Perez, E.; Boulton, S.J.; La Volpe, A. Preventing Nonhomologous End Joining Suppresses DNA Repair Defects of Fanconi Anemia. *Mol. Cell* **2010**, *39*, 25–35. [[CrossRef](#)]
184. Pace, P.; Mosedale, G.; Hodkinson, M.R.; Rosado, I.V.; Sivasubramanian, M.; Patel, K.J. Ku70 Corrupts DNA Repair in the Absence of the Fanconi Anemia Pathway. *Science* **2010**, *329*, 219–223. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
185. Xu, Y.; Ning, S.; Wei, Z.; Xu, R.; Xu, X.; Xing, M.; Guo, R.; Xu, D. 53BP1 and BRCA1 Control Pathway Choice for Stalled Replication Restart. *eLife* **2017**, *6*. [[CrossRef](#)]
186. Chen, L.; Nievera, C.; Lee, A.; Wu, X. Cell Cycle-Dependent Complex Formation of BRCA1.CHP.MRN Is Important for DNA Double-Strand Break Repair. *J. Biol. Chem.* **2008**, *283*, 7713–7720. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
187. Huertas, P.; Jackson, S. Human CtIP Mediates Cell Cycle Control of DNA End Resection and Double Strand Break Repair. *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 9558–9565. [[CrossRef](#)]
188. Boveri, T. Concerning the Origin of Malignant Tumours by Theodor Boveri. Translated and Annotated by Henry Harris. *J. Cell Sci.* **2008**, *121* (Suppl. 1), 1–84. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
189. Bertrand, P.; Lambert, S.; Joubert, C.; Lopez, B.S. Overexpression of Mammalian Rad51 Does Not Stimulate Tumorigenesis While a Dominant-Negative Rad51 Affects Centrosome Fragmentation, Ploidy and Stimulates Tumorigenesis, in p53-Defective CHO Cells. *Oncogene* **2003**, *22*, 7587–7592. [[CrossRef](#)]
190. Daboussi, F.; Thacker, J.; Lopez, B. Genetic Interactions between RAD51 and Its Paralogues for Centrosome Fragmentation and Ploidy Control, Independently of the Sensitivity to Genotoxic Stresses. *Oncogene* **2005**, *24*, 3691–3696. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
191. Griffin, C.S.; Simpson, P.J.; Wilson, C.R.; Thacker, J. Mammalian Recombination-Repair Genes XRCC2 and XRCC3 Promote Correct Chromosome Segregation [In Process Citation]. *Nat. Cell Biol.* **2000**, *2*, 757–761. [[CrossRef](#)]
192. Wilhelm, T.; Magdalou, I.; Barascu, A.; Techer, H.; Debatisse, M.; Lopez, B. Spontaneous Slow Replication Fork Progression Elicits Mitosis Alterations in Homologous Recombination-Deficient Mammalian Cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2014**, *111*, 763–768. [[CrossRef](#)]
193. Wilhelm, T.; Olziersky, A.-M.; Harry, D.; De Sousa, F.; Vassal, H.; Eskat, A.; Meraldi, P. Mild Replication Stress Causes Chromosome Mis-Segregation via Premature Centriole Disengagement. *Nat. Commun.* **2019**, *10*, 3585. [[CrossRef](#)]
194. Bergoglio, V.; Boyer, A.; Walsh, E.; Naim, V.; Legube, G.; Lee, M.; Rey, L.; Rosselli, F.; Cazaux, C.; Eckert, K.; et al. DNA Synthesis by Pol Eta Promotes Fragile Site Stability by Preventing under-Replicated DNA in Mitosis. *J. Cell Biol.* **2013**, *201*, 395–408. [[CrossRef](#)]
195. Naim, V.; Wilhelm, T.; Debatisse, M.; Rosselli, F. ERCC1 and MUS81-EME1 Promote Sister Chromatid Separation by Processing Late Replication Intermediates at Common Fragile Sites during Mitosis. *Nat. Cell Biol.* **2013**, *15*, 1008–1015. [[CrossRef](#)]
196. Minocherhomji, S.; Ying, S.; Bjerregaard, V.A.; Bursomanno, S.; Aleliunaite, A.; Wu, W.; Mankouri, H.W.; Shen, H.; Liu, Y.; Hickson, I.D. Replication Stress Activates DNA Repair Synthesis in Mitosis. *Nature* **2015**, *528*, 286–290. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
197. Bhowmick, R.; Minocherhomji, S.; Hickson, I.D. RAD52 Facilitates Mitotic DNA Synthesis Following Replication Stress. *Mol. Cell* **2016**, *64*, 1117–1126. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
198. Min, J.; Wright, W.E.; Shay, J.W. Alternative Lengthening of Telomeres Mediated by Mitotic DNA Synthesis Engages Break-Induced Replication Processes. *Mol. Cell Biol.* **2017**, *37*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
199. Wilhelm, T.; Said, M.; Naim, V. DNA Replication Stress and Chromosomal Instability: Dangerous Liaisons. *Genes* **2020**, *11*, 642. [[CrossRef](#)]
200. Gasser, S.; Zhang, W.Y.L.; Tan, N.Y.J.; Tripathi, S.; Suter, M.A.; Chew, Z.H.; Khatoor, M.; Ngeow, J.; Cheung, F.S.G. Sensing of Dangerous DNA. *Mech. Ageing Dev.* **2017**, *165*, 33–46. [[CrossRef](#)]
201. Dhanwani, R.; Takahashi, M.; Sharma, S. Cytosolic Sensing of Immuno-Stimulatory DNA, the Enemy within. *Curr. Opin. Immunol.* **2018**, *50*, 82–87. [[CrossRef](#)]
202. Vanpouille-Box, C.; Demaria, S.; Formenti, S.C.; Galluzzi, L. Cytosolic DNA Sensing in Organismal Tumor Control. *Cancer Cell* **2018**, *34*, 361–378. [[CrossRef](#)]
203. Barroso-Vilares, M.; Logarinho, E. Chromosomal Instability and pro-Inflammatory Response in Aging. *Mech. Ageing Dev.* **2019**, *182*, 111118. [[CrossRef](#)]

204. Paul, B.D.; Snyder, S.H.; Bohr, V.A. Signaling by cGAS–STING in Neurodegeneration, Neuroinflammation, and Aging. *Trends Neurosci.* **2021**, *44*, 83–96. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
205. Vashi, N.; Bakhoun, S.F. The Evolution of STING Signaling and Its Involvement in Cancer. *Trends Biochem. Sci.* **2021**. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
206. Hartlova, A.; Erttmann, S.; Raffi, F.; Schmalz, A.; Resch, U.; Anugula, S.; Lienenklaus, S.; Nilsson, L.; Kroger, A.; Nilsson, J.; et al. DNA Damage Primes the Type I Interferon System via the Cytosolic DNA Sensor STING to Promote Anti-Microbial Innate Immunity. *Immunity* **2015**, *42*, 332–343. [[CrossRef](#)]
207. Erdal, E.; Haider, S.; Rehwinkel, J.; Harris, A.L.; McHugh, P.J. A Prosurvival DNA Damage-Induced Cytoplasmic Interferon Response Is Mediated by End Resection Factors and Is Limited by Trex1. *Genes Dev.* **2017**, *31*, 353–369. [[CrossRef](#)]
208. Parkes, E.E.; Walker, S.M.; Taggart, L.E.; McCabe, N.; Knight, L.A.; Wilkinson, R.; McCloskey, K.D.; Buckley, N.E.; Savage, K.L.; Salto-Tellez, M.; et al. Activation of STING-Dependent Innate Immune Signaling by S-Phase-Specific DNA Damage in Breast Cancer. *JNCI J. Natl. Cancer Inst.* **2016**, *109*. [[CrossRef](#)]
209. Heijink, A.M.; Talens, F.; Jae, L.T.; van Gijn, S.E.; Fehrmann, R.S.N.; Brummelkamp, T.R.; van Vugt, M.A.T.M. BRCA2 Deficiency Instigates cGAS-Mediated Inflammatory Signaling and Confers Sensitivity to Tumor Necrosis Factor- α -Mediated Cytotoxicity. *Nat. Commun.* **2019**, *10*, 100. [[CrossRef](#)]
210. Reisländer, T.; Groelly, F.J.; Tarsounas, M. DNA Damage and Cancer Immunotherapy: A STING in the Tale. *Mol. Cell* **2020**, *80*, 21–28. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
211. Ho, S.; Zhang, W.; Tan, N.; Khatoor, M.; Suter, M.; Tripathi, S.; Cheung, F.; Lim, W.; Tan, P.; Ngeow, J.; et al. The DNA Structure-Specific Endonuclease MUS81 Mediates DNA Sensor STING-Dependent Host Rejection of Prostate Cancer Cells. *Immunity* **2016**, *44*, 1177–1189. [[CrossRef](#)]
212. Coquel, F.; Silva, M.-J.; Técher, H.; Zadorozhny, K.; Sharma, S.; Nieminszczy, J.; Mettling, C.; Dardillac, E.; Barthe, A.; Schmitz, A.-L.; et al. SAMHD1 Acts at Stalled Replication Forks to Prevent Interferon Induction. *Nature* **2018**, *557*, 57–61. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
213. Yang, H.; Wang, H.; Ren, J.; Chen, Q.; Chen, Z.J. cGAS Is Essential for Cellular Senescence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2017**, *114*, E4612–E4620. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
214. Takahashi, A.; Loo, T.M.; Okada, R.; Kamachi, F.; Watanabe, Y.; Wakita, M.; Watanabe, S.; Kawamoto, S.; Miyata, K.; Barber, G.N.; et al. Downregulation of Cytoplasmic DNases Is Implicated in Cytoplasmic DNA Accumulation and SASP in Senescent Cells. *Nat. Commun.* **2018**, *9*, 1249. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
215. Glück, S.; Ablasser, A. Innate Immunosensing of DNA in Cellular Senescence. *Curr. Opin. Immunol.* **2019**, *56*, 31–36. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
216. Loo, T.M.; Miyata, K.; Tanaka, Y.; Takahashi, A. Cellular Senescence and Senescence-Associated Secretory Phenotype via the cGAS-STING Signaling Pathway in Cancer. *Cancer Sci.* **2020**, *111*, 304–311. [[CrossRef](#)]
217. Rodier, F.; Campisi, J. Four Faces of Cellular Senescence. *J. Cell Biol.* **2011**, *192*, 547–556. [[CrossRef](#)]
218. Moir, R.D.; Montag-Lowy, M.; Goldman, R.D. Dynamic Properties of Nuclear Lamins: Lamin B Is Associated with Sites of DNA Replication. *J. Cell Biol.* **1994**, *125*, 1201–1212. [[CrossRef](#)]
219. Shimi, T.; Pflieger, K.; Kojima, S.; Pack, C.; Solovei, I.; Goldman, A.; Adam, S.; Shumaker, D.; Kinjo, M.; Cremer, T.; et al. The A- and B-Type Nuclear Lamin Networks: Microdomains Involved in Chromatin Organization and Transcription. *Genes Dev.* **2008**, *22*, 3409–3421. [[CrossRef](#)]
220. Naetar, N.; Ferraioli, S.; Foisner, R. Lamins in the Nuclear Interior—Life Outside the Lamina. *J. Cell Sci.* **2017**, *130*, 2087–2096. [[CrossRef](#)]
221. Dechat, T.; Adam, S.A.; Taimen, P.; Shimi, T.; Goldman, R.D. Nuclear Lamins. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2010**, *2*, a000547. [[CrossRef](#)]
222. Gruenbaum, Y.; Foisner, R. Lamins: Nuclear Intermediate Filament Proteins with Fundamental Functions in Nuclear Mechanics and Genome Regulation. *Annu. Rev. Biochem.* **2015**, *84*, 131–164. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
223. Rusiñol, A.E.; Sinensky, M.S. Farnesylated Lamins, Progeroid Syndromes and Farnesyl Transferase Inhibitors. *J. Cell Sci.* **2006**, *119*, 3265–3272. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
224. Schreiber, K.H.; Kennedy, B.K. When Lamins Go Bad: Nuclear Structure and Disease. *Cell* **2013**, *152*, 1365–1375. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
225. Worman, H.J. Nuclear Lamins and Laminopathies. *J. Pathol.* **2012**, *226*, 316–325. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
226. Donnalaja, F.; Carnevali, F.; Jacchetti, E.; Raimondi, M.T. Lamin A/C Mechanotransduction in Laminopathies. *Cells* **2020**, *9*, 1306. [[CrossRef](#)]
227. Brull, A.; Morales Rodriguez, B.; Bonne, G.; Muchir, A.; Bertrand, A.T. The Pathogenesis and Therapies of Striated Muscle Laminopathies. *Front. Physiol.* **2018**, *9*. [[CrossRef](#)]
228. De Sandre-Giovannoli, A.; Bernard, R.; Cau, P.; Navarro, C.; Amiel, J.; Boccaccio, I.; Lyonnet, S.; Stewart, C.; Munnich, A.; Le Merrer, M.; et al. Lamin A Truncation in Hutchinson-Gilford Progeria. *Science* **2003**, *300*, 2055. [[CrossRef](#)]
229. Eriksson, M.; Brown, W.; Gordon, L.; Glynn, M.; Singer, J.; Scott, L.; Erdos, M.; Robbins, C.; Moses, T.; Berglund, P.; et al. Recurrent de Novo Point Mutations in Lamin A Cause Hutchinson-Gilford Progeria Syndrome. *Nature* **2003**, *423*, 293–298. [[CrossRef](#)]
230. Scaffidi, P.; Misteli, T. Lamin A-Dependent Nuclear Defects in Human Aging. *Science* **2006**, *312*, 1059–1063. [[CrossRef](#)]

231. McClintock, D.; Ratner, D.; Lokuge, M.; Owens, D.; Gordon, L.; Collins, F.; Djabali, K. The Mutant Form of Lamin A That Causes Hutchinson-Gilford Progeria Is a Biomarker of Cellular Aging in Human Skin. *PLoS ONE* **2007**, *2*, e1269. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
232. Ragnauth, C.; Warren, D.; Liu, Y.; McNair, R.; Tajsic, T.; Figg, N.; Shroff, R.; Skepper, J.; Shanahan, C. Prelamin A Acts to Accelerate Smooth Muscle Cell Senescence and Is a Novel Biomarker of Human Vascular Aging. *Circulation* **2010**, *121*, 2200–2210. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
233. Olive, M.; Harten, I.; Mitchell, R.; Beers, J.K.; Djabali, K.; Cao, K.; Erdos, M.R.; Blair, C.; Funke, B.; Smoot, L.; et al. Cardiovascular Pathology in Hutchinson-Gilford Progeria: Correlation with the Vascular Pathology of Aging. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **2010**, *30*, 2301–2309. [[CrossRef](#)]
234. Miller, J.D.; Ganat, Y.M.; Kishinevsky, S.; Bowman, R.L.; Liu, B.; Tu, E.Y.; Mandal, P.K.; Vera, E.; Shim, J.-W.; Kriks, S.; et al. Human iPSC-Based Modeling of Late-Onset Disease via Progerin-Induced Aging. *Cell Stem Cell* **2013**, *13*, 691–705. [[CrossRef](#)]
235. Padiath, Q.; Saigoh, K.; Schiffmann, R.; Asahara, H.; Yamada, T.; Koeppen, A.; Hogan, K.; Ptacek, L.; Fu, Y. Lamin B1 Duplications Cause Autosomal Dominant Leukodystrophy. *Nat. Genet.* **2006**, *38*, 1114–1123. [[CrossRef](#)]
236. Padiath, Q.S. Autosomal Dominant Leukodystrophy: A Disease of the Nuclear Lamina. *Front. Cell Dev. Biol.* **2019**, *7*, 41. [[CrossRef](#)]
237. Heng, M.Y.; Lin, S.-T.; Verret, L.; Huang, Y.; Kamiya, S.; Padiath, Q.S.; Tong, Y.; Palop, J.J.; Huang, E.J.; Ptáček, L.J.; et al. Lamin B1 Mediates Cell-Autonomous Neuropathology in a Leukodystrophy Mouse Model. *J. Clin. Invest.* **2013**, *123*, 2719–2729. [[CrossRef](#)]
238. Rolyan, H.; Tyurina, Y.Y.; Hernandez, M.; Amoscatto, A.A.; Sparvero, L.J.; Nmezi, B.C.; Lu, Y.; Estécio, M.R.H.; Lin, K.; Chen, J.; et al. Defects of Lipid Synthesis Are Linked to the Age-Dependent Demyelination Caused by Lamin B1 Overexpression. *J. Neurosci. J. Soc. Neurosci.* **2015**, *35*, 12002–12017. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
239. Barascu, A.; Le Chalony, C.; Pennarun, G.; Genet, D.; Imam, N.; Lopez, B.; Bertrand, P. Oxidative Stress Induces an ATM-Independent Senescence Pathway through p38 MAPK-Mediated Lamin B1 Accumulation. *EMBO J.* **2012**, *31*, 1080–1094. [[CrossRef](#)]
240. Donadille, B.; D'Anella, P.; Auclair, M.; Uhrhammer, N.; Sorel, M.; Grigorescu, R.; Ouzounian, S.; Cambonie, G.; Boulot, P.; Laforet, P.; et al. Partial Lipodystrophy with Severe Insulin Resistance and Adult Progeria Werner Syndrome. *Orphanet J. Rare Dis.* **2013**, *8*, 106. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
241. Parry, D.A.; Martin, C.-A.; Greene, P.; Marsh, J.A.; Genomics England Research Consortium; Blyth, M.; Cox, H.; Donnelly, D.; Greenhalgh, L.; Greville-Heygate, S.; et al. Heterozygous Lamin B1 and Lamin B2 Variants Cause Primary Microcephaly and Define a Novel Laminopathy. *Genet. Med.* **2020**. [[CrossRef](#)]
242. Cristofoli, F.; Moss, T.; Moore, H.W.; Devriendt, K.; Flanagan-Stee, H.; May, M.; Jones, J.; Roelens, F.; Fons, C.; Fernandez, A.; et al. De Novo Variants in LMNB1 Cause Pronounced Syndromic Microcephaly and Disruption of Nuclear Envelope Integrity. *Am. J. Hum. Genet.* **2020**, *107*, 753–762. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
243. Hegele, R.A.; Cao, H.; Liu, D.M.; Costain, G.A.; Charlton-Menys, V.; Rodger, N.W.; Durrington, P.N. Sequencing of the Reannotated LMNB2 Gene Reveals Novel Mutations in Patients with Acquired Partial Lipodystrophy. *Am. J. Hum. Genet.* **2006**, *79*, 383–389. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
244. Damiano, J.A.; Afawi, Z.; Bahlo, M.; Mauermann, M.; Misk, A.; Arsov, T.; Oliver, K.L.; Dahl, H.-H.M.; Shearer, A.E.; Smith, R.J.H.; et al. Mutation of the Nuclear Lamin Gene LMNB2 in Progressive Myoclonus Epilepsy with Early Ataxia. *Hum. Mol. Genet.* **2015**, *24*, 4483–4490. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
245. Frost, B.; Bardai, F.H.; Feany, M.B. Lamin Dysfunction Mediates Neurodegeneration in Tauopathies. *Curr. Biol. CB* **2016**, *26*, 129–136. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
246. Hutchison, C. B-Type Lamins and Their Elusive Roles in Metazoan Cell Proliferation and Senescence. *EMBO J.* **2012**, *31*, 1058–1059. [[CrossRef](#)]
247. Moiseeva, O.; Bourdeau, V.; Vernier, M.; Dabauville, M.-C.; Ferbeyre, G. Retinoblastoma-Independent Regulation of Cell Proliferation and Senescence by the p53–p21 Axis in Lamin A/C-Depleted Cells. *Aging Cell* **2011**, *10*, 789–797. [[CrossRef](#)]
248. Huang, S.; Risques, R.; Martin, G.; Rabinovitch, P.; Oshima, J. Accelerated Telomere Shortening and Replicative Senescence in Human Fibroblasts Overexpressing Mutant and Wild-Type Lamin A. *Exp. Cell Res.* **2008**, *314*, 82–91. [[CrossRef](#)]
249. Candelario, J.; Sudhakar, S.; Navarro, S.; Reddy, S.; Comai, L. Perturbation of Wild-Type Lamin A Metabolism Results in a Progeroid Phenotype. *Aging Cell* **2008**, *7*, 355–367. [[CrossRef](#)]
250. Goldman, R.D.; Shumaker, D.K.; Erdos, M.R.; Eriksson, M.; Goldman, A.E.; Gordon, L.B.; Gruenbaum, Y.; Khuon, S.; Mendez, M.; Varga, R.; et al. Accumulation of Mutant Lamin A Causes Progressive Changes in Nuclear Architecture in Hutchinson-Gilford Progeria Syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 8963–8968. [[CrossRef](#)]
251. Varela, I.; Cadinanos, J.; Pendas, A.M.; Gutierrez-Fernandez, A.; Folgueras, A.R.; Sanchez, L.M.; Zhou, Z.; Rodriguez, F.J.; Stewart, C.L.; Vega, J.A.; et al. Accelerated Ageing in Mice Deficient in Zmpste24 Protease Is Linked to p53 Signalling Activation. *Nature* **2005**, *437*, 564–568. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
252. Osorio, F.; Barcena, C.; Soria-Valles, C.; Ramsay, A.; de Carlos, F.; Cobo, J.; Fueyo, A.; Freije, J.; Lopez-Otin, C. Nuclear Lamina Defects Cause ATM-Dependent NF-kappaB Activation and Link Accelerated Aging to a Systemic Inflammatory Response. *Genes Dev.* **2012**, *26*, 2311–2324. [[CrossRef](#)]
253. Brassard, J.A.; Fekete, N.; Garnier, A.; Hoesli, C.A. Hutchinson-Gilford Progeria Syndrome as a Model for Vascular Aging. *Biogerontology* **2016**, *17*, 129–145. [[CrossRef](#)]

254. Bidault, G.; Garcia, M.; Capeau, J.; Morichon, R.; Vigouroux, C.; Béréziat, V. Progerin Expression Induces Inflammation, Oxidative Stress and Senescence in Human Coronary Endothelial Cells. *Cells* **2020**, *9*, 1201. [CrossRef] [PubMed]
255. Liu, Y.; Drozdov, I.; Shroff, R.; Beltran, L.; Shanahan, C. Prelamin A Accelerates Vascular Calcification via Activation of the DNA Damage Response and Senescence-Associated Secretory Phenotype in Vascular Smooth Muscle Cells. *Circ. Res.* **2013**, *112*, e99–e109. [CrossRef]
256. Vergnes, L.; Peterfy, M.; Bergo, M.; Young, S.; Reue, K. Lamin B1 Is Required for Mouse Development and Nuclear Integrity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 10428–10433. [CrossRef] [PubMed]
257. Lammerding, J.; Fong, L.G.; Ji, J.Y.; Reue, K.; Stewart, C.L.; Young, S.G.; Lee, R.T. Lamins A and C but Not Lamin B1 Regulate Nuclear Mechanics. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 25768–25780. [CrossRef]
258. Shimi, T.; Butin-Israeli, V.; Adam, S.; Hamanaka, R.; Goldman, A.; Lucas, C.; Shumaker, D.; Kosak, S.; Chandel, N.; Goldman, R. The Role of Nuclear Lamin B1 in Cell Proliferation and Senescence. *Genes Dev.* **2011**, *25*, 2579–2593. [CrossRef]
259. Barascu, A.; Le Chalony, C.; Pennarun, G.; Genet, D.; Zaarour, N.; Bertrand, P. Oxidative Stress Alters Nuclear Shape through Lamins Dysregulation: A Route to Senescence. *Nucleus* **2012**, *3*, 411–417. [CrossRef]
260. Sadaie, M.; Salama, R.; Carroll, T.; Tomimatsu, K.; Chandra, T.; Young, A.; Narita, M.; Perez-Mancera, P.; Bennett, D.; Chong, H.; et al. Redistribution of the Lamin B1 Genomic Binding Profile Affects Rearrangement of Heterochromatic Domains and SAHF Formation during Senescence. *Genes Dev.* **2013**, *27*, 1800–1808. [CrossRef] [PubMed]
261. Shah, P.; Donahue, G.; Otte, G.; Capell, B.; Nelson, D.; Cao, K.; Aggarwala, V.; Cruickshanks, H.; Rai, T.; McBryan, T.; et al. Lamin B1 Depletion in Senescent Cells Triggers Large-Scale Changes in Gene Expression and the Chromatin Landscape. *Genes Dev.* **2013**, *27*, 1787–1799. [CrossRef]
262. Freund, A.; Laberge, R.; Demaria, M.; Campisi, J. Lamin B1 Loss Is a Senescence-Associated Biomarker. *Mol. Biol. Cell* **2012**, *23*, 2066–2075. [CrossRef] [PubMed]
263. Dreesen, O.; Chojnowski, A.; Ong, P.; Zhao, T.; Common, J.; Lunny, D.; Lane, E.; Lee, S.; Vardy, L.; Stewart, C.; et al. Lamin B1 Fluctuations Have Differential Effects on Cellular Proliferation and Senescence. *J. Cell Biol.* **2013**, *200*, 605–617. [CrossRef] [PubMed]
264. Lukášová, E.; Kovarík, A.; Bacíková, A.; Falk, M.; Kozubek, S. Loss of Lamin B Receptor Is Necessary to Induce Cellular Senescence. *Biochem. J.* **2017**, *474*, 281–300. [CrossRef]
265. Wang, X.; Bi, X.; Yang, K.; Huang, Y.; Liu, Y.; Zhao, J. ROS/p38MAPK-Induced Lamin B1 Accumulation Promotes Chronic Kidney Disease-Associated Vascular Smooth Muscle Cells Senescence. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2020**, *531*, 187–194. [CrossRef] [PubMed]
266. Bussolati, G.; Marchio, C.; Gaetano, L.; Lupo, R.; Sapino, A. Pleomorphism of the Nuclear Envelope in Breast Cancer: A New Approach to an Old Problem. *J. Cell Mol. Med.* **2008**, *12*, 209–218. [CrossRef]
267. Bussolati, G.; Maletta, F.; Asioli, S.; Annaratone, L.; Sapino, A.; Marchio, C. “To Be or Not to Be in a Good Shape”: Diagnostic and Clinical Value of Nuclear Shape Irregularities in Thyroid and Breast Cancer. In *Cancer Biology and the Nuclear Envelope*; Advances in Experimental Medicine and Biology; Springer: New York, NY, USA, 2014; pp. 101–121. ISBN 978-1-4899-8031-1.
268. De Las Heras, J.I.; Schirmer, E.C. The Nuclear Envelope and Cancer: A Diagnostic Perspective and Historical Overview. *Adv. Exp. Med. Biol.* **2014**, *773*, 5–26. [CrossRef]
269. Sengupta, D.; Mukhopadhyay, A.; Sengupta, K. Emerging Roles of Lamins and DNA Damage Repair Mechanisms in Ovarian Cancer. *Biochem. Soc. Trans.* **2020**, *48*, 2317–2333. [CrossRef]
270. Dubik, N.; Mai, S. Lamin A/C: Function in Normal and Tumor Cells. *Cancers* **2020**, *12*, 3688. [CrossRef]
271. Li, L.; Du, Y.; Kong, X.; Li, Z.; Jia, Z.; Cui, J.; Gao, J.; Wang, G.; Xie, K. Lamin B1 Is a Novel Therapeutic Target of Betulinic Acid in Pancreatic Cancer. *Clin. Cancer Res.* **2013**, *19*, 4651–4661. [CrossRef]
272. Izdebska, M.; Gagat, M.; Grzanka, A. Overexpression of Lamin B1 Induces Mitotic Catastrophe in Colon Cancer LoVo Cells and Is Associated with Worse Clinical Outcomes. *Int. J. Oncol.* **2018**, *52*, 89–102. [CrossRef]
273. Radspieler, M.M.; Schindeldecker, M.; Stenzel, P.; Försch, S.; Tagscherer, K.E.; Herpel, E.; Hohenfellner, M.; Hatiboglu, G.; Roth, W.; Macher-Goeppinger, S. Lamin-B1 Is a Senescence-Associated Biomarker in Clear-Cell Renal Cell Carcinoma. *Oncol. Lett.* **2019**, *18*, 2654–2660. [CrossRef]
274. Zy, Y.; Xy, J.; Rr, Z.; Cj, L.; Yx, R.; Zj, M.; Hl, Y.; Wg, S.; C, W.; Zy, J. Lamin B1 Deficiency Promotes Malignancy and Predicts Poor Prognosis in Gastric Cancer. Available online: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/proxy.insermbiblio.inist.fr/32787434/> (accessed on 4 February 2021).
275. Zhang, M.-Y.; Han, Y.-C.; Han, Q.; Liang, Y.; Luo, Y.; Wei, L.; Yan, T.; Yang, Y.; Liu, S.-L.; Wang, E.-H. Lamin B2 Promotes the Malignant Phenotype of Non-Small Cell Lung Cancer Cells by Upregulating Dimethylation of Histone 3 Lysine 9. *Exp. Cell Res.* **2020**, *393*, 112090. [CrossRef]
276. Zhao, C.-C.; Chen, J.; Zhang, L.-Y.; Liu, H.; Zhang, C.-G.; Liu, Y. Lamin B2 Promotes the Progression of Triple Negative Breast Cancer via Mediating Cell Proliferation and Apoptosis. *Biosci. Rep.* **2021**, *41*. [CrossRef]
277. Hanahan, D.; Weinberg, R.A. Hallmarks of Cancer: The next Generation. *Cell* **2011**, *144*, 646–674. [CrossRef] [PubMed]
278. Stiekema, M.; van Zandvoort, M.A.M.J.; Ramaekers, F.C.S.; Broers, J.L.V. Structural and Mechanical Aberrations of the Nuclear Lamina in Disease. *Cells* **2020**, *9*, 1884. [CrossRef]
279. Shevelyov, Y.Y.; Ulianov, S.V. The Nuclear Lamina as an Organizer of Chromosome Architecture. *Cells* **2019**, *8*, 136. [CrossRef] [PubMed]

306. Karlseder, J.; Broccoli, D.; Dai, Y.; Hardy, S.; De Lange, T. p53- and ATM-Dependent Apoptosis Induced by Telomeres Lacking TRF2. *Science* **1999**, *283*, 1321–1325. [\[CrossRef\]](#)
307. Smogorzewska, A.; de Lange, T. Different Telomere Damage Signaling Pathways in Human and Mouse Cells. *EMBO J.* **2002**, *21*, 4338–4348. [\[CrossRef\]](#)
308. Takai, H.; Smogorzewska, A.; de Lange, T. DNA Damage Foci at Dysfunctional Telomeres. *Curr. Biol.* **2003**, *13*, 1549–1556. [\[CrossRef\]](#)
309. Billaud, T.; Brun, C.; Ancelin, K.; Koering, C.E.; Laroche, T.; Gilson, E. Telomeric Localization of TRF2, a Novel Human Telobox Protein. *Nat. Genet.* **1997**, *17*, 236–239. [\[CrossRef\]](#)
310. Broccoli, D.; Smogorzewska, A.; Chong, L.; de Lange, T. Human Telomeres Contain Two Distinct Myb-related Proteins, TRF1 and TRF2. *Nat. Genet.* **1997**, *17*, 231–235. [\[CrossRef\]](#)
311. Stansel, R.M.; de Lange, T.; Griffith, J.D. T-Loop Assembly in Vitro Involves Binding of TRF2 near the 3' Telomeric Overhang. *EMBO J.* **2001**, *20*, 5532–5540. [\[CrossRef\]](#)
312. Doksani, Y.; Wu, J.Y.; de Lange, T.; Zhuang, X. Super-Resolution Fluorescence Imaging of Telomeres Reveals TRF2-Dependent T-Loop Formation. *Cell* **2013**, *155*, 345–356. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
313. Karlseder, J.; Hoke, K.; Mirzoeva, O.K.; Bakkenist, C.; Kastan, M.B.; Petrini, J.H.J.; de Lange, T. The Telomeric Protein TRF2 Binds the ATM Kinase and Can Inhibit the ATM-Dependent DNA Damage Response. *PLoS Biol.* **2004**, *2*, e240. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
314. Denchi, E.L.; de Lange, T. Protection of Telomeres through Independent Control of ATM and ATR by TRF2 and POT1. *Nature* **2007**, *448*, 1068–1071. [\[CrossRef\]](#)
315. Okamoto, K.; Bartocci, C.; Ouzounov, I.; Diedrich, J.; Yates, J., 3rd; Denchi, E. A Two-Step Mechanism for TRF2-Mediated Chromosome-End Protection. *Nature* **2013**, *494*, 502–505. [\[CrossRef\]](#)
316. Feuerhahn, S.; Chen, L.; Luke, B.; Porro, A. No DDRama at Chromosome Ends: TRF2 Takes Centre Stage. *Trends Biochem. Sci.* **2015**, *40*, 275–285. [\[CrossRef\]](#)
317. de Lange, T. Shelterin-Mediated Telomere Protection. *Annu. Rev. Genet.* **2018**, *52*, 223–247. [\[CrossRef\]](#)
318. Shibuya, H.; Watanabe, Y. The Meiosis-Specific Modification of Mammalian Telomeres. *Cell Cycle Georget. Tex.* **2014**, *13*, 2024–2028. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
319. Crabbe, L.; Cesare, A.; Kasuboski, J.; Fitzpatrick, J.; Karlseder, J. Human Telomeres Are Tethered to the Nuclear Envelope during Postmitotic Nuclear Assembly. *Cell Rep.* **2012**, *2*, 1521–1529. [\[CrossRef\]](#)
320. Sobocki, M.; Souaid, C.; Boulay, J.; Guerinéau, V.; Noordermeer, D.; Crabbe, L. MadID, a Versatile Approach to Map Protein-DNA Interactions, Highlights Telomere-Nuclear Envelope Contact Sites in Human Cells. *Cell Rep.* **2018**, *25*, 2891–2903.e5. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
321. Arnoult, N.; Schluth-Bolard, C.; Letessier, A.; Drascovic, I.; Bouarich-Bourimi, R.; Campisi, J.; Kim, S.; Boussouar, A.; Ottaviani, A.; Magdinier, F.; et al. Replication Timing of Human Telomeres Is Chromosome Arm-Specific, Influenced by Subtelomeric Structures and Connected to Nuclear Localization. *PLoS Genet.* **2010**, *6*, e1000920. [\[CrossRef\]](#)
322. de Lange, T. Human Telomeres Are Attached to the Nuclear Matrix. *EMBO J.* **1992**, *11*, 717–724. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
323. Raz, V.; Vermolen, B.J.; Garini, Y.; Onderwater, J.J.M.; Mommaas-Kienhuis, M.A.; Koster, A.J.; Young, I.T.; Tanke, H.; Dirks, R.W. The Nuclear Lamina Promotes Telomere Aggregation and Centromere Peripheral Localization during Senescence of Human Mesenchymal Stem Cells. *J. Cell Sci.* **2008**, *121*, 4018–4028. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
324. Allsopp, R.; Vaziri, H.; Patterson, C.; Younglai, E.; Futcher, A.; Greider, C.; Harley, C. Telomere Length Predicts Replicative Capacity of Human Fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1992**, *89*, 10114–10118. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
325. Decker, M.; Chavez, E.; Vulto, I.; Lansdorp, P. Telomere Length in Hutchinson-Gilford Progeria Syndrome. *Mech. Ageing Dev.* **2009**, *130*, 377–383. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
326. Benson, E.; Lee, S.; Aaronson, S. Role of Progerin-Induced Telomere Dysfunction in HGPS Premature Cellular Senescence. *J. Cell Sci.* **2010**, *123*, 2605–2612. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
327. Aguado, J.; Sola-Carvajal, A.; Cancila, V.; Revêchon, G.; Ong, P.F.; Jones-Weinert, C.W.; Wallén Arzt, E.; Lattanzi, G.; Dreesen, O.; Tripodo, C.; et al. Inhibition of DNA Damage Response at Telomeres Improves the Detrimental Phenotypes of Hutchinson-Gilford Progeria Syndrome. *Nat. Commun.* **2019**, *10*, 4990. [\[CrossRef\]](#)
328. Wood, A.M.; Rendtlew Danielsen, J.M.; Lucas, C.A.; Rice, E.L.; Scalzo, D.; Shimi, T.; Goldman, R.D.; Smith, E.D.; Le Beau, M.M.; Kosak, S.T. TRF2 and Lamin A/C Interact to Facilitate the Functional Organization of Chromosome Ends. *Nat. Commun.* **2014**, *5*, 5467. [\[CrossRef\]](#)
329. Meier, J.; Campbell, K.H.; Ford, C.C.; Stick, R.; Hutchison, C.J. The Role of Lamin LIII in Nuclear Assembly and DNA Replication, in Cell-Free Extracts of Xenopus Eggs. *J. Cell Sci.* **1991**, *98 Pt 3*, 271–279.
330. Ellis, D.J.; Jenkins, H.; Whitfield, W.G.; Hutchison, C.J. GST-Lamin Fusion Proteins Act as Dominant Negative Mutants in Xenopus Egg Extract and Reveal the Function of the Lamina in DNA Replication. *J. Cell Sci.* **1997**, *110 Pt 20*, 2507–2518.
331. Spann, T.P.; Moir, R.D.; Goldman, A.E.; Stick, R.; Goldman, R.D. Disruption of Nuclear Lamin Organization Alters the Distribution of Replication Factors and Inhibits DNA Synthesis. *J. Cell Biol.* **1997**, *136*, 1201–1212. [\[CrossRef\]](#)
332. Moir, R.D.; Spann, T.P.; Herrmann, H.; Goldman, R.D. Disruption of Nuclear Lamin Organization Blocks the Elongation Phase of DNA Replication. *J. Cell Biol.* **2000**, *149*, 1179–1192. [\[CrossRef\]](#)
333. Kennedy, B.K.; Barbie, D.A.; Classon, M.; Dyson, N.; Harlow, E. Nuclear Organization of DNA Replication in Primary Mammalian Cells. *Genes Dev.* **2000**, *14*, 2855–2868. [\[CrossRef\]](#)

280. Liu, B.; Wang, J.; Chan, K.M.; Tjia, W.M.; Deng, W.; Guan, X.; Huang, J.; Li, K.M.; Chau, P.Y.; Chen, D.J.; et al. Genomic Instability in Laminopathy-Based Premature Aging. *Nat. Med.* **2005**, *11*, 780–785. [\[CrossRef\]](#)
281. Scaffidi, P.; Misteli, T. Reversal of the Cellular Phenotype in the Premature Aging Disease Hutchinson-Gilford Progeria Syndrome. *Nat. Med.* **2005**, *11*, 440–445. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
282. Gibbs-Seymour, I.; Markiewicz, E.; Bekker-Jensen, S.; Mailand, N.; Hutchison, C.J. Lamin A/C-Dependent Interaction with 53BP1 Promotes Cellular Responses to DNA Damage. *Aging Cell* **2015**, *14*, 162–169. [\[CrossRef\]](#)
283. Gonzalez-Suarez, I.; Redwood, A.B.; Perkins, S.M.; Vermolen, B.; Lichtensztejn, D.; Grotsky, D.A.; Morgado-Palacin, L.; Gapud, E.J.; Sleckman, B.P.; Sullivan, T.; et al. Novel Roles for A-Type Lamins in Telomere Biology and the DNA Damage Response Pathway. *EMBO J.* **2009**, *28*, 2414–2427. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
284. Mahen, R.; Hattori, H.; Lee, M.; Sharma, P.; Jeyasekharan, A.D.; Venkitaraman, A.R. A-Type Lamins Maintain the Positional Stability of DNA Damage Repair Foci in Mammalian Nuclei. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e61893. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
285. Shumaker, D.K.; Dechat, T.; Kohlmaier, A.; Adam, S.A.; Bozovsky, M.R.; Erdos, M.R.; Eriksson, M.; Goldman, A.E.; Khuon, S.; Collins, F.S.; et al. Mutant Nuclear Lamin A Leads to Progressive Alterations of Epigenetic Control in Premature Aging. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, *103*, 8703–8708. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
286. Liu, B.; Wang, Z.; Zhang, L.; Ghosh, S.; Zheng, H.; Zhou, Z. Depleting the Methyltransferase Suv39h1 Improves DNA Repair and Extends Lifespan in a Progeria Mouse Model. *Nat. Commun.* **2013**, *4*, 1868. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
287. Zhang, H.; Sun, L.; Wang, K.; Wu, D.; Trappio, M.; Witting, C.; Cao, K. Loss of H3K9me3 Correlates with ATM Activation and Histone H2AX Phosphorylation Deficiencies in Hutchinson-Gilford Progeria Syndrome. *PLoS ONE* **2016**, *11*, e0167454. [\[CrossRef\]](#)
288. Ghosh, S.; Liu, B.; Wang, Y.; Hao, Q.; Zhou, Z. Lamin A Is an Endogenous SIRT6 Activator and Promotes SIRT6-Mediated DNA Repair. *Cell Rep.* **2015**, *13*, 1396–1406. [\[CrossRef\]](#)
289. Kugel, S.; Mostoslavsky, R. Chromatin and Beyond: The Multitasking Roles for SIRT6. *Trends Biochem. Sci.* **2014**, *39*, 72–81. [\[CrossRef\]](#)
290. Mostoslavsky, R.; Chua, K.F.; Lombard, D.B.; Pang, W.W.; Fischer, M.R.; Gellon, L.; Liu, P.; Mostoslavsky, G.; Franco, S.; Murphy, M.M.; et al. Genomic Instability and Aging-like Phenotype in the Absence of Mammalian SIRT6. *Cell* **2006**, *124*, 315–329. [\[CrossRef\]](#)
291. Kanfi, Y.; Naiman, S.; Amir, G.; Peshti, V.; Zinman, G.; Nahum, L.; Bar-Joseph, Z.; Cohen, H.Y. The Sirtuin SIRT6 Regulates Lifespan in Male Mice. *Nature* **2012**, *483*, 218–221. [\[CrossRef\]](#)
292. Redwood, A.B.; Perkins, S.M.; Vanderwaal, R.P.; Feng, Z.; Biehl, K.J.; Gonzalez-Suarez, I.; Morgado-Palacin, L.; Shi, W.; Sage, J.; Roti-Roti, J.L.; et al. A Dual Role for A-Type Lamins in DNA Double-Strand Break Repair. *Cell Cycle* **2011**, *10*, 2549–2560. [\[CrossRef\]](#)
293. di Masi, A.; D'Apice, M.; Ricordy, R.; Tanzarella, C.; Novelli, G. The R527H Mutation in LMNA Gene Causes an Increased Sensitivity to Ionizing Radiation. *Cell Cycle* **2008**, *7*, 2030–2037. [\[CrossRef\]](#)
294. Mayca Pozo, F.; Tang, J.; Bonk, K.W.; Keri, R.A.; Yao, X.; Zhang, Y. Regulatory Cross-Talk Determines the Cellular Levels of 53BP1 Protein, a Critical Factor in DNA Repair. *J. Biol. Chem.* **2017**, *292*, 5992–6003. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
295. Cobb, A.M.; Larrieu, D.; Warren, D.T.; Liu, Y.; Srivastava, S.; Smith, A.J.O.; Bowater, R.P.; Jackson, S.P.; Shanahan, C.M. Prelamin A Impairs 53BP1 Nuclear Entry by Mislocalizing NUP153 and Disrupting the Ran Gradient. *Aging Cell* **2016**, *15*, 1039–1050. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
296. Singh, M.; Hunt, C.R.; Pandita, R.K.; Kumar, R.; Yang, C.-R.; Horikoshi, N.; Bachoo, R.; Serag, S.; Story, M.D.; Shay, J.W.; et al. Lamin A/C Depletion Enhances DNA Damage-Induced Stalled Replication Fork Arrest. *Mol. Cell. Biol.* **2013**, *33*, 1210–1222. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
297. Zhang, C.; Liu, G.; Huang, M. Ribonucleotide Reductase Metallofactor: Assembly, Maintenance and Inhibition. *Front. Biol.* **2014**, *9*, 104–113. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
298. Butin-Israeli, V.; Adam, S.A.; Jain, N.; Otte, G.L.; Neems, D.; Wiesmüller, L.; Berger, S.L.; Goldman, R.D. Role of Lamin B1 in Chromatin Instability. *Mol. Cell. Biol.* **2015**, *35*, 884–898. [\[CrossRef\]](#)
299. Liu, N.; Sun, J.; Kono, K.; Horikoshi, Y.; Ikura, T.; Tong, X.; Haraguchi, T.; Tashiro, S. Regulation of Homologous Recombinational Repair by Lamin B1 in Radiation-Induced DNA Damage. *FASEB J.* **2015**, *29*, 2514–2525. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
300. Maynard, S.; Keijzers, G.; Akbari, M.; Ezra, M.B.; Hall, A.; Morevati, M.; Scheibye-Knudsen, M.; Gonzalo, S.; Bartek, J.; Bohr, V.A. Lamin A/C Promotes DNA Base Excision Repair. *Nucleic Acids Res.* **2019**, gkz912. [\[CrossRef\]](#)
301. Liu, Y.; Wang, Y.; Rusinol, A.E.; Sinensky, M.S.; Liu, J.; Shell, S.M.; Zou, Y. Involvement of Xeroderma Pigmentosum Group A (XPA) in Progeria Arising from Defective Maturation of Prelamin A. *FASEB J.* **2008**, *22*, 603–611. [\[CrossRef\]](#)
302. Butin-Israeli, V.; Adam, S.A.; Goldman, R.D. Regulation of Nucleotide Excision Repair by Nuclear Lamin b1. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e69169. [\[CrossRef\]](#)
303. Cesare, A.J.; Karlseder, J. A Three-State Model of Telomere Control over Human Proliferative Boundaries. *Curr. Opin. Cell Biol.* **2012**, *24*, 731–738. [\[CrossRef\]](#)
304. De Lange, T. Shelterin: The Protein Complex That Shapes and Safeguards Human Telomeres. *Genes Dev.* **2005**, *19*, 2100–2110. [\[CrossRef\]](#)
305. Van Steensel, B.; Smogorzewska, A.; De Lange, T. TRF2 Protects Human Telomeres from End-to-End Fusions. *Cell* **1998**, *92*, 401–413. [\[CrossRef\]](#)

334. Vaara, M.; Itkonen, H.; Hillukkala, T.; Liu, Z.; Nasheuer, H.-P.; Schaarschmidt, D.; Pospiech, H.; Syväoja, J.E. Segregation of Replicative DNA Polymerases during S Phase: DNA Polymerase E, but Not DNA Polymerases α/Δ , Are Associated with Lamins throughout S Phase in Human Cells. *J. Biol. Chem.* **2012**, *287*, 33327–33338. [\[CrossRef\]](#)
335. Shumaker, D.K.; Solimando, L.; Sengupta, K.; Shimi, T.; Adam, S.A.; Grunwald, A.; Strelkov, S.V.; Aebi, U.; Cardoso, M.C.; Goldman, R.D. The Highly Conserved Nuclear Lamin Ig-Fold Binds to PCNA: Its Role in DNA Replication. *J. Cell Biol.* **2008**, *181*, 269–280. [\[CrossRef\]](#)
336. Cobb, A.M.; Murray, T.V.; Warren, D.T.; Liu, Y.; Shanahan, C.M. Disruption of PCNA-Lamins A/C Interactions by Prelamin A Induces DNA Replication Fork Stalling. *Nucl. Austin Tex.* **2016**, *7*, 498–511. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
337. Dittmer, T.A.; Sahni, N.; Kubben, N.; Hill, D.E.; Vidal, M.; Burgess, R.C.; Roukos, V.; Misteli, T. Systematic Identification of Pathological Lamin A Interactors. *Mol. Biol. Cell* **2014**, *25*, 1493–1510. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
338. Kubben, N.; Voncken, J.W.; Demmers, J.; Calis, C.; van Almen, G.; Pinto, Y.; Misteli, T. Identification of Differential Protein Interactors of Lamin A and Progerin. *Nucl. Austin Tex.* **2010**, *1*, 513–525. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
339. Hilton, B.A.; Liu, J.; Cartwright, B.M.; Liu, Y.; Breitman, M.; Wang, Y.; Jones, R.; Tang, H.; Rusinol, A.; Musich, P.R.; et al. Progerin Sequestration of PCNA Promotes Replication Fork Collapse and Mislocalization of XPA in Laminopathy-Related Progeroid Syndromes. *FASEB J.* **2017**, *31*, 3882–3893. [\[CrossRef\]](#)
340. Wheaton, K.; Campuzano, D.; Ma, W.; Sheinis, M.; Ho, B.; Brown, G.W.; Benchimol, S. Progerin-Induced Replication Stress Facilitates Premature Senescence in Hutchinson-Gilford Progeria Syndrome. *Mol. Cell Biol.* **2017**, *37*. [\[CrossRef\]](#)
341. Johnson, B.R.; Nitta, R.T.; Frock, R.L.; Mounkes, L.; Barbie, D.A.; Stewart, C.L.; Harlow, E.; Kennedy, B.K. A-Type Lamins Regulate Retinoblastoma Protein Function by Promoting Subnuclear Localization and Preventing Proteasomal Degradation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 9677–9682. [\[CrossRef\]](#)
342. Kreienkamp, R.; Graziano, S.; Coll-Bonfill, N.; Bedia-Diaz, G.; Cybulla, E.; Vindigni, A.; Dorsett, D.; Kubben, N.; Batista, L.F.Z.; Gonzalo, S. A Cell-Intrinsic Interferon-like Response Links Replication Stress to Cellular Aging Caused by Progerin. *Cell Rep.* **2018**, *22*, 2006–2015. [\[CrossRef\]](#)
343. Camps, J.; Wangsa, D.; Falke, M.; Brown, M.; Case, C.M.; Erdos, M.R.; Ried, T. Loss of Lamin B1 Results in Prolongation of S Phase and Decondensation of Chromosome Territories. *FASEB J.* **2014**, *28*, 3423–3434. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
344. Marchal, C.; Sima, J.; Gilbert, D.M. Control of DNA Replication Timing in the 3D Genome. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2019**, *20*, 721–737. [\[CrossRef\]](#)
345. Hansen, R.S.; Thomas, S.; Sandstrom, R.; Canfield, T.K.; Thurman, R.E.; Weaver, M.; Dorschner, M.O.; Gartler, S.M.; Stamatoyannopoulos, J.A. Sequencing Newly Replicated DNA Reveals Widespread Plasticity in Human Replication Timing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2010**, *107*, 139–144. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
346. Peric-Hupkes, D.; Meuleman, W.; Pagie, L.; Bruggeman, S.W.M.; Solovei, I.; Brugman, W.; Gräf, S.; Flicke, P.; Kerkhoven, R.M.; van Lohuizen, M.; et al. Molecular Maps of the Reorganization of Genome-Nuclear Lamina Interactions during Differentiation. *Mol. Cell* **2010**, *38*, 603–613. [\[CrossRef\]](#)
347. Duriez, B.; Chilaka, S.; Bercher, J.-F.; Hercul, E.; Prioleau, M.-N. Replication Dynamics of Individual Loci in Single Living Cells Reveal Changes in the Degree of Replication Stochasticity through S Phase. *Nucleic Acids Res.* **2019**, *47*, 5155–5169. [\[CrossRef\]](#)
348. Foti, R.; Gnan, S.; Cornacchia, D.; Dileep, V.; Bulut-Karslioglu, A.; Diehl, S.; Bunes, A.; Klein, F.A.; Huber, W.; Johnstone, E.; et al. Nuclear Architecture Organized by Rif1 Underpins the Replication-Timing Program. *Mol. Cell* **2016**, *61*, 260–273. [\[CrossRef\]](#)
349. Rivera-Mulia, J.C.; Desprat, R.; Trevilla-Garcia, C.; Cornacchia, D.; Schwerer, H.; Sasaki, T.; Sima, J.; Fells, T.; Studer, L.; Lemaitre, J.-M.; et al. DNA Replication Timing Alterations Identify Common Markers between Distinct Progeroid Diseases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2017**, *114*, E10972–E10980. [\[CrossRef\]](#)
350. Li, B.X.; Chen, J.; Chao, B.; Zheng, Y.; Xiao, X. A Lamin-Binding Ligand Inhibits Homologous Recombination Repair of DNA Double-Strand Breaks. *ACS Cent. Sci.* **2018**, *4*, 1201–1210. [\[CrossRef\]](#)
351. Stratigi, K.; Chatzidoukaki, O.; Garinis, G.A. DNA Damage-Induced Inflammation and Nuclear Architecture. *Mech. Ageing Dev.* **2017**, *165*, 17–26. [\[CrossRef\]](#)
352. Kristiani, L.; Kim, M.; Kim, Y. Role of the Nuclear Lamina in Age-Associated Nuclear Reorganization and Inflammation. *Cells* **2020**, *9*, 718. [\[CrossRef\]](#)
353. Mu, X.; Tseng, C.; Hambright, W.S.; Matre, P.; Lin, C.-Y.; Chanda, P.; Chen, W.; Gu, J.; Ravuri, S.; Cui, Y.; et al. Cytoskeleton Stiffness Regulates Cellular Senescence and Innate Immune Response in Hutchinson-Gilford Progeria Syndrome. *Ageing Cell* **2020**. [\[CrossRef\]](#)
354. Di Micco, A.; Frera, G.; Lugin, J.; Jamilloux, Y.; Hsu, E.-T.; Tardivel, A.; De Gassart, A.; Zaffalon, L.; Bujisic, B.; Siegert, S.; et al. AIM2 Inflammasome Is Activated by Pharmacological Disruption of Nuclear Envelope Integrity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2016**, *113*, E4671–E4680. [\[CrossRef\]](#)
355. Ashapkin, V.V.; Kutueva, L.I.; Kurchashova, S.Y.; Kireev, I.I. Are There Common Mechanisms Between the Hutchinson-Gilford Progeria Syndrome and Natural Aging? *Front. Genet.* **2019**, *10*, 455. [\[CrossRef\]](#)
356. Coll-Bonfill, N.; Cancado de Faria, R.; Bhoopatiraju, S.; Gonzalo, S. Calcitriol Prevents RAD51 Loss and cGAS-STING-IFN Response Triggered by Progerin. *Proteomics* **2019**, e1800406. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
357. Crasta, K.; Ganem, N.J.; Dagher, R.; Lantermann, A.B.; Ivanova, E.V.; Pan, Y.; Nezi, L.; Protopopov, A.; Chowdhury, D.; Pellman, D. DNA Breaks and Chromosome Pulverization from Errors in Mitosis. *Nature* **2012**, *482*, 53–58. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

358. Mackenzie, K.J.; Carroll, P.; Martin, C.-A.; Murina, O.; Fluteau, A.; Simpson, D.J.; Olova, N.; Sutcliffe, H.; Rainger, J.K.; Leitch, A.; et al. cGAS Surveillance of Micronuclei Links Genome Instability to Innate Immunity. *Nature* **2017**, *548*, 461–465. [CrossRef]
359. Dou, Z.; Ghosh, K.; Vizioli, M.G.; Zhu, J.; Sen, P.; Wangenstein, K.J.; Simithy, J.; Lan, Y.; Lin, Y.; Zhou, Z.; et al. Cytoplasmic Chromatin Triggers Inflammation in Senescence and Cancer. *Nature* **2017**, *550*, 402–406. [CrossRef]
360. Hatch, E.M.; Fischer, A.H.; Deerinck, T.J.; Hetzer, M.W. Catastrophic Nuclear Envelope Collapse in Cancer Cell Micronuclei. *Cell* **2013**, *154*, 47–60. [CrossRef] [PubMed]
361. Lohard, S.; Bourgeois, N.; Maillet, L.; Gautier, F.; Fétiveau, A.; Lasla, H.; Nguyen, F.; Vuillier, C.; Dumont, A.; Moreau-Aubry, A.; et al. STING-Dependent Paracrine Shapes Apoptotic Priming of Breast Tumors in Response to Anti-Mitotic Treatment. *Nat. Commun.* **2020**, *11*, 259. [CrossRef] [PubMed]
362. Larrieu, D.; Britton, S.; Demir, M.; Rodriguez, R.; Jackson, S. Chemical Inhibition of NAT10 Corrects Defects of Laminopathic Cells. *Science* **2014**, *344*, 527–532. [CrossRef] [PubMed]
363. Balmus, G.; Larrieu, D.; Barros, A.C.; Collins, C.; Abrudan, M.; Demir, M.; Geisler, N.J.; Lelliott, C.J.; White, J.K.; Karp, N.A.; et al. Targeting of NAT10 Enhances Healthspan in a Mouse Model of Human Accelerated Aging Syndrome. *Nat. Commun.* **2018**, *9*, 1700. [CrossRef] [PubMed]
364. Cao, Y.; Yao, M.; Wu, Y.; Ma, N.; Liu, H.; Zhang, B. N-Acetyltransferase 10 Promotes Micronuclei Formation to Activate the Senescence-Associated Secretory Phenotype Machinery in Colorectal Cancer Cells. *Transl. Oncol.* **2020**, *13*, 100783. [CrossRef]
365. Bryant, H.E.; Schultz, N.; Thomas, H.D.; Parker, K.M.; Flower, D.; Lopez, E.; Kyle, S.; Meuth, M.; Curtin, N.J.; Helleday, T. Specific Killing of BRCA2-Deficient Tumours with Inhibitors of poly(ADP-Ribose) Polymerase. *Nature* **2005**, *434*, 913–917. [CrossRef]
366. Farmer, H.; McCabe, N.; Lord, C.; Tutt, A.; Johnson, D.; Richardson, T.; Santarosa, M.; Dillon, K.; Hickson, I.; Knights, C.; et al. Targeting the DNA Repair Defect in BRCA Mutant Cells as a Therapeutic Strategy. *Nature* **2005**, *434*, 917–921. [CrossRef]
367. Lord, C.J.; Ashworth, A. PARP Inhibitors: The First Synthetic Lethal Targeted Therapy. *Science* **2017**, *355*, 1152–1158. [CrossRef] [PubMed]
368. D'Andrea, A.D. Mechanisms of PARP Inhibitor Sensitivity and Resistance. *DNA Repair* **2018**, *71*, 172–176. [CrossRef] [PubMed]
369. Mateo, J.; Lord, C.J.; Serra, V.; Tutt, A.; Balmaña, J.; Castroviejo-Bermejo, M.; Cruz, C.; Oaknin, A.; Kaye, S.B.; de Bono, J.S. A Decade of Clinical Development of PARP Inhibitors in Perspective. *Ann. Oncol.* **2019**, *30*, 1437–1447. [CrossRef]
370. Deng, L.; Liang, H.; Xu, M.; Yang, X.; Burnette, B.; Arina, A.; Li, X.-D.; Mauceri, H.; Beckett, M.; Darga, T.; et al. STING-Dependent Cytosolic DNA Sensing Promotes Radiation-Induced Type I Interferon-Dependent Antitumor Immunity in Immunogenic Tumors. *Immunity* **2014**, *41*, 843–852. [CrossRef]
371. Liang, Y.; Peng, H. STING-Cytosolic DNA Sensing: The Backbone for an Effective Tumor Radiation Therapy. *Ann. Transl. Med.* **2016**, *4*, 60. [CrossRef]
372. Vanpouille-Box, C.; Alard, A.; Aryankalayil, M.J.; Sarfraz, Y.; Diamond, J.M.; Schneider, R.J.; Inghirami, G.; Coleman, C.N.; Formenti, S.C.; Demaria, S. DNA Exonuclease Trex1 Regulates Radiotherapy-Induced Tumour Immunogenicity. *Nat. Commun.* **2017**, *8*, 15618. [CrossRef]
373. Wang, H.; Hu, S.; Chen, X.; Shi, H.; Chen, C.; Sun, L.; Chen, Z.J. cGAS Is Essential for the Antitumor Effect of Immune Checkpoint Blockade. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2017**, *114*, 1637–1642. [CrossRef] [PubMed]
374. Jiang, M.; Chen, P.; Wang, L.; Li, W.; Chen, B.; Liu, Y.; Wang, H.; Zhao, S.; Ye, L.; He, Y.; et al. cGAS-STING, an Important Pathway in Cancer Immunotherapy. *J. Hematol. Oncol.* **2020**, *13*. [CrossRef] [PubMed]
375. Mateescu, B.; Batista, L.; Cardon, M.; Gruosso, T.; de Feraudy, Y.; Mariani, O.; Nicolas, A.; Meyniel, J.; Cottu, P.; Sastre-Garau, X.; et al. miR-141 and miR-200a Act on Ovarian Tumorigenesis by Controlling Oxidative Stress Response. *Nat. Med.* **2011**, *17*, 1627–1635. [CrossRef]
376. Costa, A.; Scholer-Dahirel, A.; Mechta-Grigoriou, F. The Role of Reactive Oxygen Species and Metabolism on Cancer Cells and Their Microenvironment. *Semin. Cancer Biol.* **2014**, *25*, 23–32. [CrossRef] [PubMed]
377. Raab, M.; Gentili, M.; de Belly, H.; Thiam, H.-R.; Vargas, P.; Jimenez, A.J.; Lautenschlaeger, F.; Voituriez, R.; Lennon-Duménil, A.-M.; Manel, N.; et al. ESCRT III Repairs Nuclear Envelope Ruptures during Cell Migration to Limit DNA Damage and Cell Death. *Science* **2016**, *352*, 359–362. [CrossRef]
378. Laberge, R.; Awad, P.; Campisi, J.; Desprez, P. Epithelial-Mesenchymal Transition Induced by Senescent Fibroblasts. *Cancer Microenviron.* **2012**, *5*, 39–44. [CrossRef]
379. Zhang, C.-Z.; Spektor, A.; Cornils, H.; Francis, J.M.; Jackson, E.K.; Liu, S.; Meyerson, M.; Pellman, D. Chromothripsis from DNA damage in Micronuclei. *Nature* **2015**, *522*, 179–184. [CrossRef]
380. Liu, S.; Kwon, M.; Mannino, M.; Yang, N.; Renda, F.; Khodjakov, A.; Pellman, D. Nuclear Envelope Assembly Defects Link Mitotic Errors to Chromothripsis. *Nature* **2018**, *561*, 551–555. [CrossRef] [PubMed]
381. Kerur, N.; Fukuda, S.; Banerjee, D.; Kim, Y.; Fu, D.; Apicella, I.; Varshney, A.; Yasuma, R.; Fowler, B.J.; Baghdasaryan, E.; et al. cGAS Drives Non-Canonical Inflammation Activation in Age-Related Macular Degeneration. *Nat. Med.* **2018**, *24*, 50–61. [CrossRef]
382. Li, T.; Chen, Z.J. The cGAS–cGAMP–STING Pathway Connects DNA Damage to Inflammation, Senescence, and Cancer. *J. Exp. Med.* **2018**, *215*, 1287–1299. [CrossRef] [PubMed]

Le vieillissement Une histoire de dommages de l'ADN d'enveloppe nucléaire altérée et d'inflammation ?



médecine/sciences 2020 ; 36 : 1118-28

► Le vieillissement est associé à une accumulation de cellules sénescentes produisant un environnement cellulaire inflammatoire qui pourrait expliquer différentes maladies liées à l'âge. Diverses situations menant à la sénescence sont liées à la présence de dommages de l'ADN. De plus, de nombreux syndromes progéroïdes sont associés à une instabilité du génome ou de la structure nucléaire. Nous discuterons du lien étroit existant entre l'altération des lamines, composants de l'enveloppe nucléaire, et le vieillissement cellulaire. Nous verrons que l'altération de l'enveloppe nucléaire, comme celle observée dans la Progéria, est aussi associée à des défauts de réparation de l'ADN, à une persistance de dommages de l'ADN et à un phénotype inflammatoire. ◀

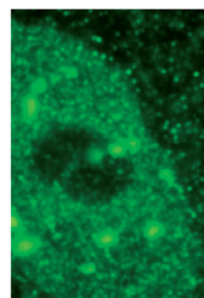
Le vieillissement s'accompagne d'un nombre croissant de cellules sénescentes dans l'organisme. Ce processus participe à l'accumulation d'altérations fonctionnelles dans les tissus, menant à l'apparition de multiples maladies liées à l'âge [1]. Le phénomène de sénescence cellulaire a été décrit par Hayflick et Moorhead en 1961 comme étant un arrêt de la division cellulaire normale. Ces auteurs mirent en effet en évidence le caractère limité de la capacité mitotique des cellules normales humaines, introduisant ainsi le concept de sénescence répliquative. Depuis ces premières observations, la caractérisation de ce phénotype et de ses mécanismes d'induction par divers stress cellulaires a été largement précisée et nourrie par de nouvelles connaissances. La majorité des syndromes de vieillissement accéléré sont des maladies majoritairement associées à un défaut de signalisation ou de réparation des lésions à l'ADN ou à des défauts de structure de l'enveloppe nucléaire (Figure 1A). Nous verrons qu'une caractéristique récurrente d'un grand nombre de situations d'induction de sénescence est la présence de dommages de l'ADN. En outre, la découverte du processus

Vignette (Photo © Inserm – Foray Nicolas).

Mécanismes cellulaires et physiopathologie du vieillissement

Le vieillissement Une histoire de dommages de l'ADN, d'enveloppe nucléaire altérée et d'inflammation ?

Paula Fontanilla*, Simon Willaume*, Benoit Thézé*, Angela Moussa, Gaëlle Pennarun, Pascale Bertrand



Laboratoire Réparation et Vieillescence, Institut de radiobiologie cellulaire et moléculaire, Institut de biologie François Jacob, Direction de la recherche fondamentale du CEA, Unité 1274, Stabilité génétique, cellules souches et radiations CEA-Inserm-Universités Paris Diderot – Paris Saclay, 18 route du Panorama, 92265 Fontenay-aux-Roses, France.

pascale.bertrand@cea.fr

*Contribution équivalente

de sécrétion pro-inflammatoire des cellules sénescences a permis d'établir un lien clair entre sénescence et vieillissement au niveau de l'organisme entier et d'appréhender les liens communs des maladies liées à l'âge.

Nous décrivons dans cette revue les caractéristiques et les mécanismes d'induction de la sénescence, ainsi que le phénotype sécrétoire et inflammatoire qui lui est associé. Nous discuterons du lien étroit existant entre l'altération des lamines, composants essentiels de l'enveloppe nucléaire et le vieillissement cellulaire. Nous verrons que l'altération de l'enveloppe nucléaire, comme celle observée dans la Progéria, est aussi associée à des défauts de réparation de l'ADN, à une persistance accrue de dommages de l'ADN et à un phénotype inflammatoire.

Caractéristiques des cellules sénescences et rôle dans le vieillissement de l'organisme

L'existence de plusieurs programmes d'induction de la sénescence, selon le type cellulaire et les stimulus de stress subis, mène à une complexité du phénotype sénescence. Encore actuellement, les marqueurs permettant sa détection restent largement non spécifiques et ce n'est que l'observation conjointe de plusieurs caractéristiques associées à ce phénotype qui permet de conclure à un état de sénescence. Ainsi, la cellule sénescence est généralement caractérisée par une activation persistante de la réponse aux dommages de l'ADN. Cette dernière peut être mise en évidence par l'accumulation de cicatrices non résolues au niveau de l'ADN (DNA scars) révélées par les marqueurs de cassures d'ADN double-brin (CDB) sous forme de foyers de réparation γ -H2AX et 53BP1 [2]. Toutefois, la persistance de dommages n'est pas spécifique de la sénescence. Cette

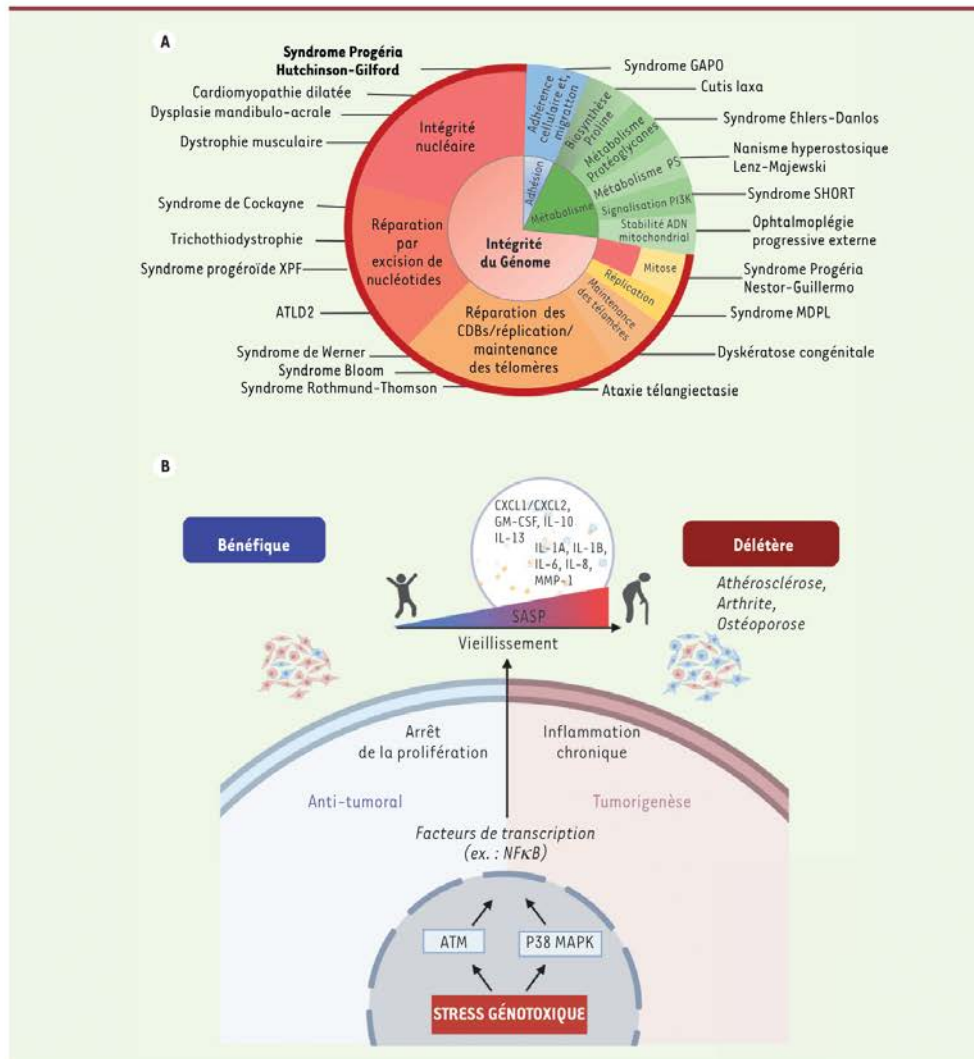


Figure 1. A. Pathologies de vieillissement accéléré. Une majorité des syndromes progéroïdes est associée à des mutations génétiques menant à une instabilité chromosomique (gènes impliqués dans la réparation de l'ADN, la réplication, la mitose ou la stabilité télomérique, etc.) ou à une altération de l'intégrité de la structure nucléaire (lamines, etc.) (modifiée d'après [62]). **B. La sénescence et le SASP : des armes à double tranchant.** Au cours de la vie, la sénescence aurait un rôle bénéfique et même anti-tumoral en bloquant la prolifération de cellules porteuses de dommages, et en recrutant des cellules immunitaires pour éliminer ces cellules « anormales ». Cependant au cours du vieillissement normal, l'accumulation de cellules sénescents (visualisées ici par des cellules bleues), associée à l'affaiblissement de la réparation de l'ADN et du système immunitaire engendrerait une inflammation chronique, liée au phénotype sécrétoire associé à la sénescence (SASP). Ceci pourrait rendre compte de nombreuses maladies liées à l'âge, dont l'athérosclérose, l'arthrite, l'ostéoporose et le cancer. Cette opposition fonctionnelle de la sénescence au cours de la vie de l'organisme est en accord avec le concept de pléiotropie antagoniste. La persistance des dommages et les voies de signalisation NF-κB et p38 MAPK sont impliquées dans l'induction du SASP.



dernière se caractérise principalement par le blocage persistant du cycle cellulaire, initié par la réponse aux dommages de l'ADN et contrôlé par la modulation d'inhibiteurs de kinases dépendantes des cyclines (CDKi). En particulier, la régulation des CDKi p16^{INK4a} et p21^{Cip1}, l'activation des gènes suppresseurs de tumeurs p53 et pRb (*retinoblastoma protein*), le contrôle des voies mTOR (*mechanistic target of rapamycin*) et p38 MAPK (*mitogen-activated protein kinase*) participent à la mise en place du programme de sénescence [3] (→).

(→) Voir la Synthèse de J.M. Brondello et al., m/s n° 3, mars 2012, page 288

L'analyse de l'expression de ces protéines, mais aussi l'incapacité de la cellule à incorporer les analogues de bases BrdU/EdU¹ au niveau de l'ADN, permet de déterminer l'arrêt « permanent » du cycle cellulaire associé à l'état de sénescence. Les cellules sénescents développent également des capacités de résistance à l'apoptose, notamment en augmentant la quantité de protéines anti-apoptotique Bcl(B-*cell lymphoma*)-2, Bcl-w et Bcl-xL [4]. Cependant, leur niveau d'expression a rarement été utilisé comme marqueur.

Par ailleurs, la cellule en sénescence est caractérisée par une sécrétion accrue (nommée SASP pour *senescence-associated secretory phenotype*) de facteurs inflammatoires et de remodelage tissulaire, tels que des cytokines, des chimiokines et des protéinases. Ce profil sécrétoire est très hétérogène et régulé par le facteur de transcription NF-κB (*nuclear factor-kappa B*) et la kinase p38 MAPK, eux-mêmes contrôlés par la réponse aux dommages à l'ADN, ainsi que par la voie de détection d'ADN dans le cytoplasme des cellules via le senseur cGAS. Les composants principaux du SASP (IL[interleukine]-1α, IL-1β, IL-6, IL-8, MMP-1 [*matrix metalloproteinase-1*]) sont pro-inflammatoires, bien que d'autres médiateurs exprimés soient immunosuppresseurs (CXCL[C-X-C motif chemokine ligand] 1 et 2, GM-CSF [*granulocyte macrophage colony-stimulating factor*], M-CSF, IL-10, IL-13) [5]. La constitution du SASP est par ailleurs soumise à un contrôle spatial et temporel [6]. Le SASP confère à la sénescence un rôle parfois bénéfique dans la réparation et le remodelage tissulaire et parfois délétère dans de nombreuses pathologies inflammatoires et dans le développement du cancer. Il est ainsi proposé que la sénescence puisse avoir un rôle anti-tumoral, d'une part en bloquant la prolifération de cellules portant des dommages de l'ADN, potentiellement tumorigènes, et, d'autre part, en déclenchant l'immunité innée contre celles-ci. Cependant, au cours du vieillissement normal, l'accumulation de cellules sénescents, associée à l'affaiblissement de la réparation de l'ADN et du système immunitaire engendrerait une inflammation chronique liée au SASP, qui pourrait rendre compte de la plupart des pathologies liées à l'âge, dont l'athérosclérose, l'arthrite, l'ostéoporose et le cancer (Figure 1B). Cette opposition fonctionnelle de la sénescence au cours de la vie de l'organisme est en accord avec l'hypothèse de pléiotropie antagoniste décrite par George C. Williams en 1957 [7]. Le lien direct entre accumulation de cellules sénescents et vieillissement de l'organisme a été proposé ou discuté par différentes équipes [3, 8]. Enfin, plus récemment, les travaux de Baker et al. ont apporté la preuve de concept dans un modèle murin que l'élimination des cellules

sénescents induisait une diminution de différentes pathologies liées à l'âge [9]. Ces travaux justifient les recherches actives actuellement menées sur les mécanismes moléculaires associés à la sénescence et celles ayant pour but de découvrir des molécules sénolytiques, qui permettraient d'éliminer les cellules sénescents au niveau de l'organisme [10].

Ces dernières années, il a été montré que les cellules sénescents sont la cible de l'immuno-surveillance dans différents contextes physiologiques. Par ce mécanisme, le système immunitaire détecte et élimine les cellules sénescents ainsi que les cellules (pré-) malignes, réduisant ainsi le risque de développer un cancer. La dérégulation de ce processus contribue à l'accumulation de cellules sénescents dans l'organisme vieillissant. Récemment, il a été montré que la perforine-1 joue un rôle essentiel pour limiter la charge tissulaire en cellules sénescents tout au long du processus de vieillissement. Ainsi, une carence en perforine-1 est accompagnée d'une inflammation chronique et d'un vieillissement accéléré. La déficience en perforine-1 dans un modèle murin de la Progeria (LMNA^{+/G66EG})², accélère le vieillissement prématuré et, remarquablement, le traitement par le sénolytique ABT-737 (mimétique BH3) réduit l'impact du vieillissement prématuré dans ce modèle [11]. Quelles sont les cibles reconnues par les cellules immunitaires exprimant la perforine-1 ? Quel est le mécanisme exact d'action du sénolytique ABT-737 dans le modèle Progeria ? Autant de questions qui nécessitent des recherches actives dans ce domaine de l'immunosurveillance [12]. L'immunosurveillance de la sénescence apparaît donc comme un facteur limitant du vieillissement ainsi que du développement tumoral. Les cellules sénescents présentent des modifications métaboliques, des aberrations structurales et morphologiques (élargissement de la cellule), des changements de la composition de la membrane plasmique et une accumulation de mitochondries ainsi que de lysosomes. Cette augmentation d'activité lysosomale n'est pas nécessaire à l'induction de la sénescence, mais est facilement décelable par la quantification de la SA-β-galactosidase, un test classiquement utilisé pour mettre en évidence un phénotype sénescents. Des changements importants de l'organisation nucléaire sont également observés au cours de la sénescence, caractérisés par la présence de foyers d'hétérochromatine (SAHF) et, comme nous le verrons, par la dérégulation de la lamina nucléaire.

¹ 5-bromo-2'-deoxyuridine/5-éthynyl-2'-deoxyuridine

² Gène codant la lamine A.



Mécanismes d'induction de la sénescence : le rôle pivot des dommages de l'ADN

Sénescence répllicative : rôle des télomères

La sénescence répllicative, observée par Hayflick en 1961, est liée au problème de réplication au niveau des extrémités des chromosomes. En effet, les ADN polymérases synthétisent l'ADN dans la direction 5' vers 3' et nécessitent une amorce afin de générer un brin néoformé à partir de la séquence de référence. Au niveau des extrémités télomériques, à chaque cycle réplcatif de la cellule, la partie terminale du brin dit *retard* ne pourra donc pas être copiée par l'ADN polymérase. Il en résulte un raccourcissement progressif des télomères à chaque cycle de division cellulaire. À partir d'un certain degré de raccourcissement des chromosomes, le complexe multi-protéiques appelé « Shelterin » peine alors à se former autour des télomères et la réponse aux dommages à l'ADN s'en trouve alors durablement activée. Ce complexe est en effet capital pour former la structure en boucle T (*T-loop*) des télomères et aussi pour empêcher les protéines de la réponse aux dommages de l'ADN de reconnaître l'extrémité des télomères comme une cassure double-brin. Le raccourcissement télomérique conduit à un arrêt du cycle cellulaire, à l'activation de mécanismes de réparation, mais aussi au déclenchement de la sénescence et des voies de mort cellulaire.

Sénescence induite par l'expression d'oncogènes

D'autres stimulus peuvent être responsables de l'induction de la sénescence, comme cela fut initialement montré par les travaux de Scott Lowe [13]. En effet, une activation chronique d'oncogènes (Ras, BRAF, etc.) ou encore l'inactivation de protéines suppresseurs de tumeurs (PTEN, RB, etc.) peuvent induire l'entrée en sénescence. La sénescence induite par l'expression d'oncogènes (OIS) a été décrite dans un premier temps comme ayant un rôle anti-tumoral.

L'OIS peut notamment être causée par des variants constitutivement actifs de la voie RAS/MAPK (H-RAS^{G12V}, N-RAS^{Q61R}, B-RAF^{V600E}), ainsi que par des variants de la voie PI3K (phosphoinositide 3-kinase)/AKT (protéine kinase B) (PIK3CA^{H1047R}, AKT1^{E17K}, délétions ou mutations de PTEN) [14]. Dans le cas de la RIS (*RAS-induced senescence*), l'hyperprolifération engendrée par la dérégulation de ces voies de signalisation contribue à générer un stress réplcatif (associé potentiellement à l'induction d'espèces réactives de l'oxygène) et à activer la réponse aux dommages de l'ADN [15]. Il en résulte l'activation des protéines ATM/ATR (*ataxia telangiectasia mutated/ataxia telangiectasia and Rad3-related protein*), la surexpression des protéines p21^{Cip1} et p16^{INK4a} (dont dépend le maintien de ce phénotype sénescence), et l'inhibition de la phosphorylation de pRb. L'activation des protéines p21^{Cip1} et p16^{INK4a} réprime respectivement les complexes CDK1/2-cyclines A/E et CDK4/6-cycline D. Cela permet l'activation de la protéine pRb dont la forme non phosphorylée séquestre les facteurs de transcription de la famille E2F et réprime les gènes contrôlant la division cellulaire. Or dans de nombreux cancers, les kinases de contrôle du cycle (telles que la cycline E) et Rb sont fréquemment dérégulées. Cela ouvre un rationnel pour le développement de thérapies pro-sénescence, qui

pourraient constituer une approche efficace dans le traitement de nombreux cancers [10].

En dépit de ce schéma général, selon l'oncogène exprimé ou le modèle cellulaire utilisé, la sénescence peut-être induite sans implication de la réponse aux dommages de l'ADN ou de l'attrition des télomères [16, 17]. À titre d'exemple, Jeanblanc *et al.* ont montré qu'une sénescence induite par C-RAF pouvait s'établir malgré l'inhibition de la signalisation des dommages à l'ADN, suggérant ainsi l'existence d'une voie de déclenchement de la RIS indépendante de la DDR [18]. De même, Michaloglou *et al.* ont souligné les différences de réponses cellulaires et de sénescence, suite à l'expression de B-RAF^{V600E}, selon le type de tumeurs bénignes et malignes [19]. De plus, la sénescence induite par la voie AKT est dépendante de mTOR et ne semble pas nécessiter de réponse aux dommages à l'ADN et dans ce cas, la protéine p16^{INK4a} reste à des niveaux modestes. En effet, l'hyperactivation d'AKT induit la sénescence en activant la synthèse de p53 via mTORC1 [20]. D'autres travaux proposent que l'interaction entre MDM2 (*murine double minute 2*) et p53 serait inhibée (par séquestration de MDM2 dans un complexe comportant des protéines nucléolaires) (pour revue voir [14]). Ainsi p53 s'accumule, ce qui active à son tour p21^{Cip1}, dont dépend l'arrêt prolongé du cycle cellulaire. De nombreux autres acteurs à potentiel oncogénique (tels que c-Myc) peuvent être impliqués dans l'OIS et les études sur ce type de sénescence présentent un certain nombre de particularités selon le variant d'oncogène étudié et le modèle cellulaire utilisé [17].

Malgré tout, différentes situations de sénescence induite par des oncogènes sont associées à la persistance de dommages qui participent directement ou indirectement à la mise en place de la sénescence.

Le stress oxydant

Des agents oxydants (tels que l'H₂O₂, ou les espèces réactives de l'oxygène générées par le métabolisme cellulaire, ROS) sont capables d'induire la sénescence, comme cela a été suggéré par Denham Hartman voici plus de 60 ans dans sa « théorie radicalaire du vieillissement ». Ce stress oxydant va notamment induire des lésions à l'ADN (en plus de l'oxydation des protéines) et potentiellement, selon le dommage oxydatif, un blocage ou un ralentissement des fourches de réplication. Une anomalie de fonctionnement des mitochondries génère une augmentation de radicaux libres dans la cellule et peut induire une sénescence associée à la dysfonction mitochondriale [21]. Des voies de signalisation vont également pouvoir être activées, telles que p38 MAPK [22] ou NRF2 (*nuclear factor erythroid-*



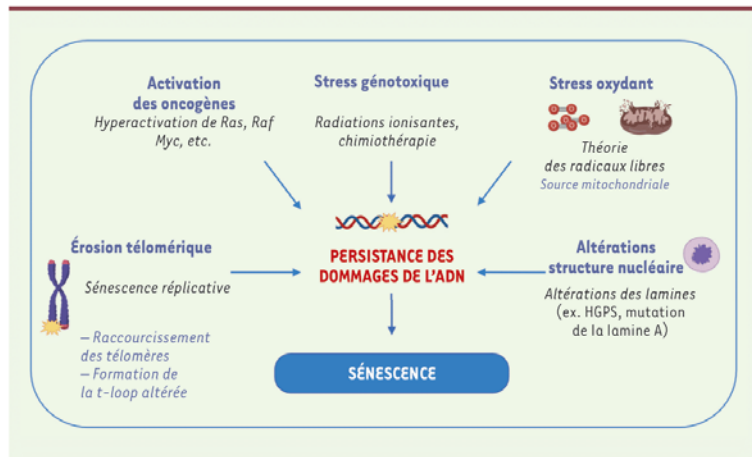


Figure 2. Des dommages de l'ADN : un élément commun entre différentes situations de sénescence. Différentes situations menant à l'induction de la sénescence sont associées à l'accumulation de dommages de l'ADN : érosion télomérique (sénescence répllicative), hyperactivation d'oncogènes (OIS), exposition (thérapeutique ou accidentelle) à des agents génotoxiques, stress oxydant et altérations de la structure nucléaire (altération du niveau des lamines, comme dans la Progéria).

2-related factor 2) [23]. L'ensemble de ces observations place ainsi la sénescence au cœur des théories sur les liens entre radicaux libres et vieillissement cellulaire.

Les agents génotoxiques

Selon leurs mécanismes d'actions, de nombreux agents génotoxiques, tels que les radiations ionisantes ou les molécules chimio-thérapeutiques, vont générer des dommages à l'ADN, une perturbation du cycle cellulaire ou un stress oxydant, et donc potentiellement induire la sénescence. Les inhibiteurs de méthylases de l'ADN ou de déacétylases d'histones peuvent également déclencher la sénescence, en perturbant l'organisation chromatinienne et en dérégulant le suppresseur de tumeur p16^{INK4a} [24].

Induction paracrine par les médiateurs du SASP

Une dernière forme d'induction de la sénescence est paracrine. Le SASP d'une cellule primaire en sénescence va en effet être capable d'induire la sénescence au niveau de cellules secondaires voisines. La sénescence paracrine va ainsi favoriser l'amplification du phénotype [25]. Le SASP, dont le mécanisme sera précisé ci-dessous, est lui aussi associé à la présence ou à la persistance de dommages [26].

Au sein des divers programmes de sénescence que nous avons mentionnés (attrition des télomères, OIS, stress oxydant, etc.), la réponse aux dommages de l'ADN est souvent une étape centrale dans le contrôle de l'entrée en sénescence (Figure 2). La présence de cassures doubles brins non résolues au niveau de l'ADN induit en effet le recrutement de la kinase ATM dont l'activation permet la phosphorylation des histones H2AX autour de la cassure ainsi que l'induction de nombreux effecteurs, parmi lesquels, les kinases CHK1 et CHK2, et p53, qui à leur tour activent l'expression de nombreux gènes, notamment ceux permettant la mise en place de la sénescence lorsque l'activation de ces voies de signalisation persiste durablement.

Domages à l'ADN, ADN cytosoliques, SASP et inflammation

L'un des éléments clés du vieillissement est la sécrétion par les cellules sénescents de cytokines inflammatoires, facteurs de croissance et autres protéines. Comme nous l'avons décrit précédemment, le SASP a un rôle majeur dans de nombreux désordres associés à la sénescence. Le lien moléculaire entre dommages de l'ADN et ce phénotype pro-inflammatoire a été récemment éclairci. Dans la cellule, l'inflammation est majoritairement initiée via des récepteurs du système immunitaire inné, tels que les nombreux PRR (*pattern recognition receptors*) permettant d'identifier des pathogènes. Un senseur de l'ADN, comme le cGAS est capable de détecter de l'ADN présent dans le cytosol, de produire du c-GAMP et d'activer la protéine STING. Cette dernière phosphoryle TBK1 (*TANK binding kinase 1*) qui à son tour, induit la phosphorylation du facteur de transcription IRF3 (*interferon regulatory factor 3*) permettant l'activation des gènes codant les interférons de type 1 et la réponse immunitaire innée. Lors de dommages à l'ADN, la présence de fragments d'ADN augmente dans le cytoplasme (probablement produits par les mécanismes de réparation de l'ADN ou le blocage de fourches de réplication) et déclenche une réponse inflammatoire innée via la voie cGAS-STING [27-29] (→).

(→) Voir la Synthèse de R. Chanut et V. Pettrilli, *m/s* n° 6-7, juin-juillet 2019, page 527

Dans le cas des cellules sénescents, il est possible d'observer la présence de fragments de chromatine cytoplasmique (CCF) [30]. cGAS se localise alors avec

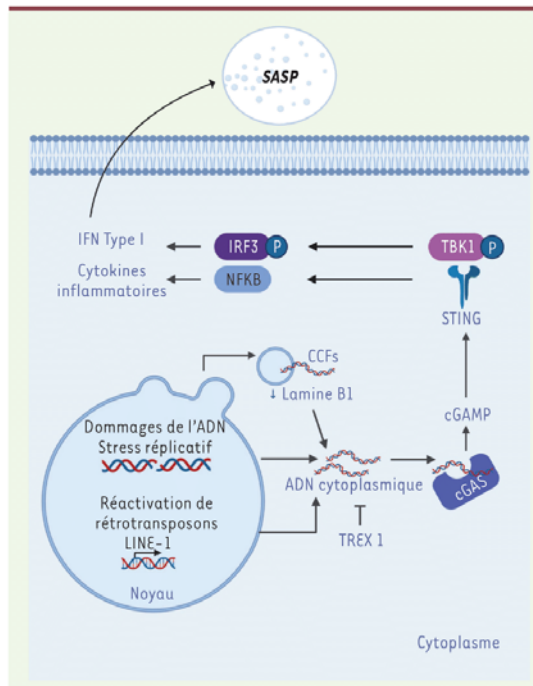


Figure 3. Rôle de cGAS dans la sénescence et l'inflammation associée. Récemment, il a été montré que la voie cGAS-STING était impliquée dans l'induction du SASP. En cas de dommages de l'ADN (ou réactivation de transposon), des fragments d'ADN s'accumulent dans le cytoplasme (notamment dans des micro-noyaux). Ces ADN cytosoliques sont reconnus par le senseur cGAS, qui en produisant un dinucléotide cyclique c-GAMP, va activer STING et ainsi induire la production d'interféron de type I, via la phosphorylation de TBK1 et d'IRF3, ainsi que la sécrétion de cytokines inflammatoires, via l'activation de la voie NF- κ B. La diminution de la lamine B1 observée au cours de la sénescence peut aboutir à une fragilité de l'enveloppe des micro-noyaux, favorisant ainsi l'accès des fragments de chromatine (CCF) à cGAS.

les CCF, ce qui mène à la production de cytokines inflammatoires et participe ainsi au SASP (Figure 3). La délétion de cGAS inhibe la sénescence induite par un stress oxydant [31] ou par des radiations [30]. L'ensemble de ces données démontrent que cGAS est essentiel à la production du SASP et à l'induction de la sénescence cellulaire elle-même [32]. Une réactivation de rétrotransposons de type LINE-1 a également été mise en évidence lors de la sénescence. Ces éléments mobiles sont aussi l'une des sources d'ADN cytosoliques participant à la mise en place du SASP [33] et au micro-environnement pro-inflammatoire des cellules sénescents.

Le déclenchement de l'immunité innée, permet le recrutement de cellules immunitaires pour détruire les cellules sénescents potentiellement porteuses de dommages de l'ADN. Ce phénomène pourrait

donc être considéré comme anti-tumoral. Cependant un environnement inflammatoire peut aussi accroître l'agressivité de cellules tumorales par le déclenchement, par exemple, d'une transition épithélio-mésenchymateuse (EMT). L'accumulation de cellules sénescents au cours du vieillissement normal de l'organisme engendre donc une inflammation chronique et serait à l'origine de nombreuses pathologies liées à l'âge (cancé, athérosclérose, ostéoporose, cataracte, cancer, etc.).

Lamines et sénescence

Un des syndromes de vieillissement prématuré les plus sévères, la Progeria, a été décrit par Jonathan Hutchinson en 1886 et par Hasting Gilford en 1887 : il a été nommé syndrome Hutchinson Gilford Progeria (HGPS). La mutation dans le gène de la lamine A, responsable de cette pathologie, a été identifiée en 2003 par les groupes de Francis Collins et de Nicolas Levy [34, 35]. Cette découverte a permis de mettre en évidence un lien entre les lamines, l'altération de l'enveloppe nucléaire et le vieillissement.

Les lamines

Les lamines sont des filaments intermédiaires de type V, constituants essentiels de la lamina nucléaire, un réseau fibreux bordant la face interne de l'enveloppe nucléaire. La lamina joue un rôle prépondérant dans le maintien de la forme du noyau de la cellule, dans l'organisation du génome et ses fonctions. La famille des lamines est composée de plusieurs protéines : les lamines de types A/C et les lamines de type B. Les lamines A et C codées par le même gène *LMNA* sont issues d'un épissage alternatif et sont présentes principalement dans les cellules différenciées. La lamine B1 est codée par le gène *LMNB1*. Les lamines B2 et B3 sont issues du même gène *LMNB2* par épissage alternatif. Les lamines B1 et B2 sont présentes dans tous les types cellulaires. La lamine B3 est spécifique des cellules germinales. Il existe de nombreuses maladies, appelées laminopathies, associées à des dérégulations des lamines A et C. L'une des plus emblématiques est la Progeria, une forme sévère de vieillissement accéléré.

Dérégulation de la lamine A, cas des HGPS

La Progeria est une maladie génétique très rare (1 cas pour 4 à 8 millions de naissances) dont la caractéristique principale est un vieillissement accéléré. Les enfants atteints développent les premiers symptômes pendant leurs premiers mois de vie (défaut de développement, peau avec une apparence de sclérodémie).

Habituellement, autour de 18-24 mois après la naissance, il est possible d'observer une alopecie ainsi qu'une apparence caractéristique (petit visage avec une mâchoire en retrait, nez pincé) et un délai de sortie des dents primaires. Plus tard, d'autres symptômes apparaissent : sclérodémie, insuffisance rénale, diminution de la vision et problèmes cardiovasculaires. De plus, une dégénérescence musculo-squelettique entraîne une perte de graisse corporelle et de muscles, des articulations raides, des dislocations de la hanche et d'autres symptômes généralement absents chez les personnes non âgées. Par contre, les individus conservent un développement mental et moteur normal, dû à l'expression d'un micro ARN (miR-9) qui inhibe l'expression de la pré-lamine A dans le cerveau [36]. La majorité des patients meurent, durant l'adolescence, d'artériosclérose et de maladies cardiovasculaires. La Progeria est due à une mutation de la lamine A et à l'accumulation d'une forme immature de la protéine. En effet, la pré-lamine A codée par le gène *LMNA* subit une série de maturations post-transcriptionnelles, dont une carboxyméthylation suivie d'une farnésylation et d'un clivage des 15 derniers acides aminés par l'endoprotéase ZMPSTE24, éliminant ainsi la farnésylation dans la forme mature de la lamine A. La mutation la plus fréquente chez les patients atteints de HGPS est une mutation dans l'exon 11 de la lamine A. Cette mutation entraîne l'utilisation d'un site cryptique d'épissage des ARN messagers, aboutissant à la délétion de 50 acides aminés incluant le site de clivage par la ZMPSTE24. Cela conduit à la production d'une protéine immature mutée et farnésylée appelée progérine (Figure 4A). Au cours du vieillissement normal ou physiologique, les cellules expriment une forme immature de lamine A [37], ce qui renforce l'idée que la lamine A immature joue un rôle dans le vieillissement cellulaire, même physiologique.

Lamine A, Progeria, réparation de l'ADN et stabilité télomérique

En plus des déformations de l'enveloppe nucléaire, les cellules déficientes en lamine A montrent des signes d'instabilité génétique, tels que des niveaux élevés de cassures d'ADN (révélées par le marqueur γ -H2AX), une augmentation des cassures chromosomiques, ainsi que des défauts au niveau des télomères. Cette instabilité serait en partie due à la déstabilisation d'une protéine clef du mécanisme de religature d'extrémités d'ADN non-homologues (NHEJ), la protéine 53BP1 [38]. Une diminution d'expression de gènes codant des acteurs essentiels de la recombinaison homologue (RH), autre mécanisme de réparation des cassures double-brin, a aussi été rapportée dans ces cellules [38]. Par ailleurs, l'expression de pré-lamine A entraîne une dérégulation de la nucléoporine Nup153, menant à une mauvaise localisation de 53BP1 et ainsi, à une diminution de l'efficacité de réparation [39]. En ce qui concerne les cellules de patients souffrant d'HGPS (cellules HGPS), l'accumulation de la progérine altère la forme du noyau des cellules, l'expression génique, la régulation épigénétique et cause une instabilité génétique générale. Ainsi, des fibroblastes de patients présentent une accumulation de dommages de l'ADN, une instabilité chromosomique, une sensibilité accrue aux agents génotoxiques, ainsi qu'une réponse aux dommages activée en permanence [40]. Par ailleurs, les cellules HGPS présenteraient un défaut de recrutement de RAD51 et BRCA1 aux dommages, associé à une

diminution d'expression de ces protéines. Ces dernières sont essentielles à la réparation des CDB par recombinaison homologue [38, 40]. De plus, des données de la littérature suggèrent l'existence de liens étroits entre les lamines et le maintien des télomères. Ainsi, les cellules déficientes en lamine A ou exprimant la progérine présentent une altération de la localisation et de la mobilité des télomères, ainsi que des dommages télomériques et un raccourcissement de ces derniers [41]. Une interaction entre la lamine A et la protéine du shelterin, TRF2, a été mise en évidence et jouerait un rôle dans la protection des télomères [42]. L'expression de la progérine induit la transcription d'ARN non-codants au niveau des télomères. Ces ARN participent à l'activation de la réponse aux dommages et seraient ainsi responsables de différents phénotypes télomériques, de la baisse de prolifération et de l'induction de sénescence des cellules HGPS [43]. L'activation de la réponse aux dommages de l'ADN aux télomères aurait donc un rôle majeur dans l'étiologie de la pathologie.

Progeria, lamine A et stress oxydant

L'une des sources endogènes d'instabilité génétique est le stress oxydant produit par le métabolisme des mitochondries. Les cellules HGPS présentent des phénotypes caractéristiques de dysfonctions mitochondriales, notamment une augmentation de la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS), ainsi qu'une sensibilité accrue à ces derniers. Des études ont montré qu'un traitement par la N-acétyl-cystéine (NAC), qui diminue les ROS dans des cellules HGPS, provoquait une diminution du niveau basal de dommages de l'ADN ainsi qu'une augmentation de la prolifération cellulaire. Les ROS seraient donc un élément majeur contribuant à l'instabilité dans les cellules HGPS [44]. De plus, l'expression de la progérine altère la voie NRF2 de détoxification des ROS [45]. L'enveloppe nucléaire, comportant une concentration élevée d'enzymes de détoxification, pourrait servir de bouclier contre les ROS [46]. Ainsi, au cours de la sénescence, l'érosion ou la rupture de l'enveloppe nucléaire, induite par l'altération des lamines, pourrait perturber ce bouclier, modifier la détoxification des ROS et les échanges nucléo-cytoplasmiques (aboutissant à la translocation nucléaire de composants tels que des nucléases ou encore des mitochondries) et ainsi aboutir à l'augmentation du stress oxydant nucléaire, ainsi qu'à des dommages de l'ADN et à une instabilité génétique.

Progeria, lamine A, stress répliatif et inflammation

Les lamines jouent un rôle important dans les mécanismes de réplication de l'ADN. La lamine A stabilise

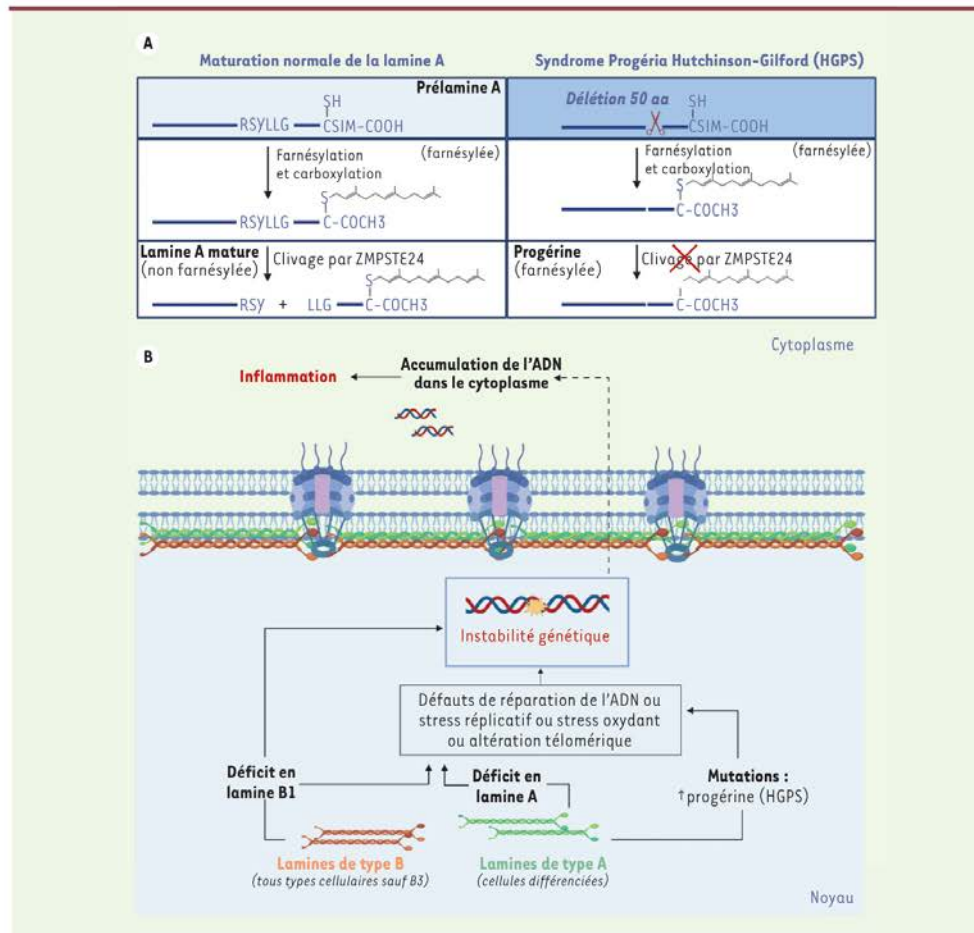


Figure 4. Lamines, sénescence et vieillissement prématuré. A. Maturation de la lamine A et production de la progérine (mutation des cellules HGPS). La pré-lamine A codée par le gène LMNA va subir une série de modifications post-traductionnelles (carboxyméthylation, farnésylation et clivage) pour devenir la lamine A mature. Dans le syndrome HGPS, une mutation va aboutir à l'usage d'un site d'épissage alternatif, menant à la délétion de 50 acides aminés dans la région du clivage par l'endoprotéase ZMPSTE24. Cette forme mutée de la lamine A ne peut pas être clivée et reste farnésylée. C'est l'accumulation au niveau de l'enveloppe nucléaire de cette forme mutée, non mature et farnésylée de la lamine A qui est responsable de la maladie Progéria. B. Un modèle décrivant le potentiel rôle des lamines dans l'inflammation au cours de la sénescence. Différentes altérations des lamines (par mutations, comme dans le cas de la Progéria, ou une altération du niveau de protéines) aboutissent à des défauts de réparation de l'ADN, à un stress réplcatif, à des altérations télomériques ou encore à des défauts dans le contrôle du stress oxydant. Ces altérations peuvent être associées à l'apparition de lésions de l'ADN, à l'activation de la réponse aux dommages de l'ADN, à l'induction de la sénescence et ainsi à l'induction d'une inflammation liée au SASP.

les fourches de réplication bloquées et sa déplétion empêche leur redémarrage [47]. Dans le cas des cellules HGPS, l'accumulation de progérine induit un effondrement des fourches de réplication en

séquestrant le facteur de la réplication, PCNA [48]. Il a été également proposé que le stress réplcatif induit par la progérine était associé à une diminution de RAD51,



nécessaire à la protection et au redémarrage des fourches de réplication. Le stress réplicatif mène à la production de cytokines inflammatoires et d'interférons via la voie cGAS-STING [49]. Des modèles murins d'accumulation de la prélamine A farnésylée présentent aussi une inflammation accrue dépendante de NF- κ B [50]. L'accumulation de la lamine A immature farnésylée au cours du vieillissement physiologique pourrait donc peut-être contribuer aux pathologies inflammatoires liées à l'âge.

Lamine B1 et sénescence : altération des télomères, stress oxydant et défaut de réparation des dommages de l'ADN

Freund *et al.* ont montré que la sénescence rélicative ou induite par l'expression d'oncogènes ou l'irradiation à forte dose (10 Gy) est associée à une diminution de la lamine B1 [51]. Shimi *et al.* ont, quant à eux, montré que la diminution de la lamine B1 induit une sénescence dépendante de p53 [52]. Une diminution de lamine B1 a été observée après induction de l'autophagie, et l'inhibition de cette autophagie atténuerait l'OIS [53]. Ceci contribuerait aux liens existant entre autophagie et sénescence. Notre équipe a mis en évidence que des cellules de patients atteints d'ataxie télangiectasie (AT) (mutées dans le gène *ATM* de signalisation des CDB) présentaient une déformation de l'enveloppe nucléaire et un niveau élevé de lamine B1. L'accumulation de cette protéine est en partie responsable de la sénescence prématurée des cellules AT en culture. Dans ces cellules, le niveau élevé de ROS et l'activation de la p38 MAPK sont responsables de l'accumulation de la lamine B1 [54]. L'équipe de Dreesen a confirmé qu'un niveau élevé de lamine B1 induit un arrêt de prolifération (encore plus sévère si la surexpression de la lamine B1 est associée à un défaut de la lamine A) et une sénescence prématurée. L'expression de la télomérase hTERT dans les cellules surexprimant la lamine B1 restaure partiellement la prolifération, suggérant que la surexpression de la lamine B1 induit des altérations télomériques [55]. Ces altérations, dont la cause moléculaire n'est pas encore élucidée, pourraient contribuer à l'établissement de la sénescence observée. Bien que l'induction de sénescence par l'extinction de la lamine B1 soit désormais confirmée par différentes équipes, dont la nôtre, les travaux de l'équipe de Dreesen suggèrent que la diminution de la lamine B1 induirait la sénescence seulement dans des conditions de stress cellulaire (telles qu'une faible densité cellulaire).

L'ensemble de ces données suggèrent donc que la dérégulation des lamines est un élément clé du contrôle de la sénescence. Le ratio lamine B1/lamine A ainsi que l'intégrité de la structure de l'enveloppe et de la matrice nucléaire pourraient être importants dans ce contrôle. Aujourd'hui, la dérégulation de la lamine B1 est considérée comme une des caractéristiques du phénotype sénescence aux côtés d'un signal persistant de réponse aux dommages de l'ADN, d'une augmentation d'expression des inhibiteurs de cyclines p21^{Cip1}/p16^{INK4a} et de l'augmentation de sécrétion des facteurs associés à la sénescence (SASP), entre autres. Il est important de noter ici que la seule diminution de la lamine B1 n'est pas spécifique de la sénescence. En effet, elle peut être également associée à la mort cellulaire par apoptose, la lamine B1 étant aussi une cible des caspases.

Certains auteurs s'interrogent pour savoir s'il convient de considérer les perturbations de la lamine B1 comme une cause ou une conséquence de la sénescence. L'analyse des domaines d'ADN associés aux lamines (LAD) a permis de démontrer que la dérégulation de la lamine B1 dans les cellules sénescences est associée à des modifications de la chromatine, dont la marque d'histone répressive H3K27me3, liée au contrôle de l'expression des gènes du SASP [56]. La lamine B1 semble être aussi impliquée dans la réponse au stress oxydant, via notamment son interaction avec le facteur de transcription ubiquitaire OCT1 [57]. La déplétion de la lamine B1 pourrait en effet déréguler l'expression des gènes de détoxification des ROS sous contrôle d'OCT1 et modifier ainsi la réponse au stress oxydant. Il en résulte que les cellules déficientes en lamine B1 sont plus sensibles à ces stress oxydants. En accord avec ces données, notre équipe a proposé que la surexpression transitoire de la lamine B1 fait partie de la réponse endogène au stress oxydant, de façon dépendante de l'activation de la p38 MAPK [54]. Une relocalisation d'OCT 1 vers l'enveloppe nucléaire [58] ainsi qu'une résistance accrue à un stress oxydant induit [54] ont d'ailleurs été observées en condition de surexpression de la lamine B1. Différents travaux suggèrent, de plus, qu'une dérégulation de la lamine B1 aboutit également à des défauts de réparation de l'ADN, et ainsi, potentiellement, à une instabilité génétique ou à une persistance de dommages. Butin-Israeli *et al.* ont montré que la diminution de la lamine B1 induit une dérégulation de l'expression de différents gènes impliqués dans la réparation des CDB [59]. La lamine B1 participerait aussi à la stabilité de la protéine RAD51, impliquée dans la réparation des CDB par recombinaison homologue. Une interaction entre la lamine B1 et la protéine RAD51 a été décrite [60]. Un défaut de réparation par excision de nucléotide (NER), impliquée dans la prise en charge des dommages induits par les rayons ultra-violet ou par des agents induisant des pontages de l'ADN, a aussi été rapporté [61]. Cependant, la conséquence de ces altérations, ayant pour origine la diminution de l'expression de la lamine B1, sur l'induction potentielle de la sénescence n'est toutefois pas clairement élucidée. Enfin, l'induction de la voie cGAS par la présence d'ADN dans le cytosol semble être associée, dans différentes conditions, à la présence de micro-noyaux. Le niveau de la lamine B1 ou de la lamine B2 participe à la stabilité de l'enveloppe des micro-noyaux et pourrait ainsi indirectement réguler l'activation de cGAS, de NF- κ B, du SASP et l'inflammation. Les perturbations de l'architecture nucléaire et du réseau de lamines pourraient donc activer des signaux capables de faire rentrer les cellules en sénescence,

en altérant leur cycle cellulaire, leur potentiel rédox (oxydo-réduction), et potentiellement, leur stabilité télomérique, ou plus généralement chromosomique, ainsi que leur environnement inflammatoire (Figure 4B). Elles participeraient ainsi au vieillissement de l'organisme.

Conclusions

Nous avons vu que différentes situations de sénescence ou de vieillissement accéléré ont en commun l'activation de la réponse aux dommages de l'ADN, associée ou non à la persistance de dommages télomériques, le stress oxydant, des perturbations de l'enveloppe nucléaire, en particulier une altération des lamines, ainsi que l'induction d'un phénotype inflammatoire. L'ensemble de ces facettes de la sénescence, que l'on pensait potentiellement indépendantes sont en fait toutes associées les unes aux autres. Des recherches fondamentales pour mieux comprendre les mécanismes d'induction de la sénescence sont nécessaires. Il est peu probable que l'on puisse s'opposer un jour totalement au vieillissement au niveau de l'organisme, mais il n'est pas invraisemblable, à l'avenir, de vivre beaucoup plus âgé en meilleure, voire en très bonne santé. De telles recherches permettront de proposer des traitements pour certaines maladies de vieillissement accéléré, telles que la Progeria, et offriront aussi la possibilité de prévenir ou de soulager les différentes maladies liées à l'âge. Cela représente un enjeu sociétal et économique majeur. La découverte, entre autres, de nouveaux sénolytiques permettant d'éliminer les cellules sénescents, ou de nouveaux modulateurs du SASP, constituent un grand espoir. Toutefois, il convient de ne pas oublier la théorie de la pléiotropie antagoniste et l'action anti-tumorale de la sénescence et du SASP, afin de gérer les potentiels effets indésirables de ce genre d'approches thérapeutiques. Des recherches actives sont donc capitales dans le domaine du vieillissement, mais toujours en lien également avec celui de l'oncologie. ♦

SUMMARY

Aging : A matter of DNA damage, nuclear envelope alterations and inflammation?

The accumulation of senescent cells accompanies organismal aging. Senescent cells produce an inflammatory microenvironment that is conducive to the development of many age-related diseases. Here we describe the different situations leading to cellular senescence and show that these situations are frequently associated with DNA damage. We also discuss the intimate link between cell aging and perturbations in the nuclear envelope, namely in nuclear lamins, as seen in progeroid syndromes. Finally, we present evidence that these alterations are associated with DNA repair defects, the persistence of DNA damage, and an inflammatory phenotype. ♦

REMERCIEMENTS

Nous tenons à remercier l'ensemble de l'équipe LREV, en particulier Dr Emilie Rass pour ses commentaires sur cette synthèse. L'équipe est soutenue par l'Inserm, le comité régional Île-de-France de la Ligue contre le Cancer, AT Europe, le Cancéropôle IDF (AAP Emergence) l'INCA, l'EDF et le programme Radiobiologie du CEA. PF est financée par l'Université Paris Saclay et la Ligue Nationale contre le Cancer et SW est financé par un financement de Thèse CEA DRF « Phare » et la Fondation ARC. AM a été financée par un financement de thèse CEA Irtelis et la Fondation ARC. Les Figures ont été créés avec Biorender.com.

LIENS D'INTÉRÊT

Les auteurs déclarent n'avoir aucun lien d'intérêt concernant les données publiées dans cet article.

RÉFÉRENCES

- Hernandez-Segura A, Nehme J, Demaria M. Hallmarks of cellular senescence. *Trends Cell Biol* 2018 ; 28 : 436-53.
- Rodier F, Munoz D, Teachenor R, et al. DNA-SCARS: distinct nuclear structures that sustain damage-induced senescence growth arrest and inflammatory cytokine secretion. *J Cell Sci* 2011 ; 124 : 68-81.
- Brondello JM, Prieur A, Philipot D, et al. La sénescence cellulaire : un nouveau mythe de Janus ? *Med Sci (Paris)* 2012 ; 28 : 288-96.
- Childs BG, Baker DJ, Kirkland JL, et al. Senescence and apoptosis: dueling or complementary cell fates? *EMBO Rep* 2014 ; 15 : 1139-53.
- Coppé JP, Desprez PY, Krtolica A, et al. The senescence-associated secretory phenotype: the dark side of tumor suppression. *Annu Rev Pathol* 2010 ; 5 : 99-118.
- Ito Y, Hoare M, Narita M. Spatial and temporal control of senescence. *Trends Cell Biol* 2017 ; 27 : 820-32.
- Williams GC. Pleiotropy, natural selection, and the evolution of senescence. *Evolution* 1957 ; 398.
- Rodier F, Campisi J. Four faces of cellular senescence. *J Cell Biol* 2011 ; 192 : 547-56.
- Baker D, Wijshake T, Tchikonia T, et al. Clearance of p16Ink4a-positive senescent cells delays ageing-associated disorders. *Nature* 2011 ; 479 : 232-6.
- Paez-Ribes M, González-Gualda E, Doherty GJ, et al. Targeting senescent cells in translational medicine. *EMBO Mol Med* 2019 ; 11 : e10234.
- Odady J, Landsberger T, Leins H, et al. Impaired immune surveillance accelerates accumulation of senescent cells and aging. *Nat Commun* 2018 ; 9.
- Perez-Lanzon M, Zitvogel L, Kroemer G. Failure of immunosurveillance accelerates aging. *Oncimmunology* 2019 ; 8 : e1575117.
- Serrano M, Lin AW, McCurrach ME, et al. Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a. *Cell* 1997 ; 88 : 593-602.
- Zhu H, Blake S, Kusuma FK, et al. Oncogene-induced senescence: from biology to therapy. *Mech Ageing Dev* 2020 ; 187 : 111229.
- Bartkova J, Rezaei N, Liontos M, et al. Oncogene-induced senescence is part of the tumorigenesis barrier imposed by DNA damage checkpoints. *Nature* 2006 ; 444 : 633-7.
- Kuilman T, Michaloglou C, Mooi WJ, et al. The essence of senescence. *Genes Dev* 2010 ; 24 : 2463-79.
- Bianchi-Smiraglia A, Nikiforov MA. Controversial aspects of oncogene-induced senescence. *Cell Cycle* 2012 ; 11 : 4147-51.
- Jeanblanc M, Ragu S, Gey C, et al. Parallel pathways in RAF-induced senescence and conditions for its reversion. *Oncogene* 2012 ; 31 : 3072-85.
- Michaloglou C, Vredeveld LCH, Mooi WJ, et al. BRAF E600 in benign and malignant human tumours. *Oncogene* 2008 ; 27 : 877-95.
- Astle MV, Hannan KM, Ng PY, et al. AKT induces senescence in human cells via mTORC1 and p53 in the absence of DNA damage: implications for targeting mTOR during malignancy. *Oncogene* 2012 ; 31 : 1949-62.
- Wiley CD, Velarde MC, Lecot P, et al. Mitochondrial dysfunction induces senescence with a distinct secretory phenotype. *Cell Metabol* 2016 ; 23 : 303-14.
- Freund A, Patil CK, Campisi J. p38MAPK is a novel DNA damage response-independent regulator of the senescence-associated secretory phenotype. *EMBO J* 2011 ; 30 : 1536-48.
- Hiebert P, Wietecha MS, Cangkrana M, et al. Nrf2-mediated fibroblast reprogramming drives cellular senescence by targeting the matrixome. *Developmental Cell* 2018 ; 46 : 145-61.e10.
- Campisi J. Aging, cellular senescence, and cancer. *Annu Rev Physiol* 2013 ; 75 : 685-705.
- Acosta JC, Banito A, Wuestefeld T, et al. A complex secretory program orchestrated by the inflammasome controls paracrine senescence. *Nat Cell Biol* 2013 ; 15 : 978-90.
- Rodier F, Coppe J, Patil C, et al. Persistent DNA damage signalling triggers senescence-associated inflammatory cytokine secretion. *Nat Cell Biol* 2009 ; 11 : 973-9.
- Härtlova A, Erttmann SF, Raffi FA, et al. DNA damage primes the type I interferon system via the cytosolic DNA sensor sting to promote antimicrobial innate immunity. *Immunity* 2015 ; 42 : 332-43.



RÉFÉRENCES

28. Coquel F, Neumoyer C, Lin YL, et al. SAMHD1 and the innate immune response to cytosolic DNA during DNA replication. *Curr Opin Immunol* 2019 ; 56 : 24-30.
29. Chanut R, Petrilli V. Détection de l'ADN cytosolique par la voie cGAS-STING : de l'immunité innée vers le contrôle de la tumorigénèse. *Med Sci (Paris)* 2019 ; 35 : 527-34.
30. Dou Z, Ghosh K, Vizioli MG, et al. Cytoplasmic chromatin triggers inflammation in senescence and cancer. *Nature* 2017 ; 550 : 402-6.
31. Glück S, Guey B, Gulen MF, et al. Innate immune sensing of cytosolic chromatin fragments through cGAS promotes senescence. *Nat Cell Biol* 2017 ; 19 : 1061-70.
32. Yang H, Wang H, Ren J, et al. cGAS is essential for cellular senescence. *Proc Natl Acad Sci USA* 2017 ; 114 : E4612-20.
33. De Cecco M, Ito T, Petraschen AP, et al. L1 drives IFN in senescent cells and promotes age-associated inflammation. *Nature* 2019 ; 566 : 75-8.
34. Eriksson N, Brown WT, Gordon LB, et al. Recurrent de novo point mutations in lamin A cause Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Nature* 2003 ; 423 : 293-8.
35. De Sandre-Giovannoli A, Bernard R, Cau P, et al. Lamin A truncation in Hutchinson-Gilford progeria. *Science* 2003 ; 300 : 2055.
36. Nissan X, Blondel S, Navarro C, et al. Unique preservation of neural cells in Hutchinson-Gilford progeria syndrome is due to the expression of the neural-specific miR-9 microRNA. *Cell Rep* 2012 ; 2 : 1-9.
37. Scaffidi P, Misteli T. Lamin A-dependent nuclear defects in human aging. *Science* 2006 ; 312 : 1059-63.
38. Redwood AB, Perkins SM, Vanderwaal RP, et al. A dual role for A-type lamins in DNA double-strand break repair. *Cell Cycle* 2011 ; 10 : 2549-60.
39. Cobb AM, Larrieu D, Warren DT, et al. Prelamin A impairs 53BP1 nuclear entry by mislocalizing NUP153 and disrupting the Ran gradient. *Aging Cell* 2016 ; 15 : 1039-50.
40. Liu B, Wang J, Chan KM, et al. Genomic instability in laminopathy-based premature aging. *Nat Med* 2005 ; 11 : 780-5.
41. Burla R, La Torre M, Saggio I. Mammalian telomeres and their partnership with lamins. *Nucleus* 2016 ; 7 : 187-202.
42. Wood AM, Rendtlew Danielsen JM, Lucas CA, et al. TRF2 and lamin A/C interact to facilitate the functional organization of chromosome ends. *Nat Commun* 2014 ; 5 : 5467.
43. Aguado J, Sola-Carvajal A, Cancila V, et al. Inhibition of DNA damage response at telomeres improves the detrimental phenotypes of Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Nat Commun* 2019 ; 10 : 4590.
44. Richards S, Muter J, Ritchie P, et al. The accumulation of un-repairable DNA damage in laminopathy progeria fibroblasts is caused by ROS generation and is prevented by treatment with N-acetyl cysteine. *Hum Mol Genet* 2011 ; 20 : 3997-4004.
45. Kubben N, Zhang W, Wang L, et al. Repression of the antioxidant NRF2 pathway in premature aging. *Cell* 2016 ; 165 : 1361-74.
46. Fabrizi R, Bocedi A, Pallottini V, et al. Nuclear Shield: a multi-enzyme task-force for nucleus protection. *PLoS One* 2010 ; 5 : e14125.
47. Singh M, Hunt CR, Pandita RK, et al. Lamin A/C depletion enhances dna damage-induced stalled replication fork arrest. *Mol Cell Biol* 2013 ; 33 : 1210-22.
48. Hilton BA, Liu J, Cartwright BM, et al. Progerin sequestration of PCNA promotes replication fork collapse and mislocalization of XPA in laminopathy-related progeroid syndromes. *FASEB J* 2017 ; 31 : 3882-93.
49. Coll-Bonfil N, Cancado de Faria R, Bhoopatiraju S, et al. Calcitriol prevents RAD51 loss and cGAS-STING-IFN response triggered by progerin. *Proteomics* 2019 ; e1800406.
50. Osorio F, Barcena C, Soria-Valles C, et al. Nuclear lamina defects cause ATM-dependent NF-kappaB activation and link accelerated aging to a systemic inflammatory response. *Genes Dev* 2012 ; 26 : 2311-24.
51. Freund A, Laberge R, Demaria M, et al. Lamin B1 loss is a senescence-associated biomarker. *Mol Biol Cell* 2012 ; 23 : 2066-75.
52. Shimi T, Butin-Israeli V, Adam S, et al. The role of nuclear lamin B1 in cell proliferation and senescence. *Genes Dev* 2011 ; 25 : 2579-93.
53. Dou Z, Xu C, Donahue G, et al. Autophagy mediates degradation of nuclear lamina. *Nature* 2015 ; 527 : 105-9.
54. Barasca A, Le Chalony C, Pennarun G, et al. Oxidative stress induces an ATM-independent senescence pathway through p38 MAPK-mediated lamin B1 accumulation. *EMBO J* 2012 ; 31 : 1080-94.
55. Dreesen O, Chojnowski A, Ong P, et al. Lamin B1 fluctuations have differential effects on cellular proliferation and senescence. *J Cell Biol* 2013 ; 200 : 605-17.
56. Shah PP, Donahue G, Otte GL, et al. Lamin B1 depletion in senescent cells triggers large-scale changes in gene expression and the chromatin landscape. *Genes Dev* 2013 ; 27 : 1787-99.
57. Malhas AN, Lee CF, Vaux DJ. Lamin B1 controls oxidative stress responses via Oct-1. *J Cell Biol* 2009 ; 184 : 45-55.
58. Columbaro M, Mattioli E, Maraldi NM, et al. Oct-1 recruitment to the nuclear envelope in adult-onset autosomal dominant leukodystrophy. *Biochim Biophys Acta* 2013 ; 1832 : 411-20.
59. Butin-Israeli V, Adam S, Jain N, et al. Role of lamin b1 in chromatin instability. *Mol Cell Biol* 2015 ; 35 : 884-98.
60. Liu H, Sun J, Kono K, et al. Regulation of homologous recombinational repair by lamin B1 in radiation-induced DNA damage. *FASEB J* 2015 ; 29 : 2514-25.
61. Butin-Israeli V, Adam SA, Goldman RD. Regulation of nucleotide excision repair by nuclear lamin b1. *PLoS One* 2013 ; 8 : e69169.
62. Vermeij WP, Hoeyjmakers JHJ, Pathof J. Genome integrity in aging: human syndromes, mouse models, and therapeutic options. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2016 ; 56 : 427-45.

TIRÉS À PART
P. Bertrand



m/s
médecine/sciences

Avec **m/s**, vivez en direct
les progrès et débats
de la biologie et de la médecine

CHAQUE MOIS / AVEC LES ARTICLES DE RÉFÉRENCE DE M/S
CHAQUE JOUR / SUR WWW.MEDECINESCIENCES.ORG

Abonnez-vous sur
www.medecinesciences.org

Lamin B1 sequesters 53BP1 to control its recruitment to DNA damage

53BP1 est une protéine clef de la réparation qui favorise le C-NHEJ au détriment de la RH. Le C-NHEJ est l'une des voies de réparation des CDB et son défaut entraîne des réarrangements génétiques ainsi qu'une sensibilité accrue à des agents génotoxiques. Néanmoins son action doit aussi se voir limitée à certaines phases du cycle. Par exemple si 53BP1 est recrutée durant la mitose, la réparation par le NHEJ de DSB peut mener à des fusions chromosomiques. C'est pourquoi, le recrutement de 53BP1 qui joue un rôle important dans le choix du mécanisme de réparation, doit être finement contrôlé.

Cette étude montre que la surexpression de la lamine B1, une protéine de l'enveloppe nucléaire, induit un défaut de recrutement de 53BP1. Contrairement à ce qui a été montré en cas de déficience pour la lamine A ou l'expression de la pré-lamine A, ni les niveaux de 53BP1 ni sa localisation n'étaient altérés. La surexpression de la lamine B1 entraîne une sensibilité accrue à des stress génotoxiques, une accumulation de CDB et un défaut de réparation par le NHEJ. Cette étude montre une interaction directe entre 53BP1 et la lamine B1. L'interaction 53BP1-Lamine B1 se fait sur le domaine IRIF de 53BP1, incluant les domaines TUDOR et UDR, nécessaires à 53BP1 pour interagir avec la chromatine endommagée et contrôler de son recrutement. Après dommages à l'ADN, 53BP1 se dissocie de la lamine B1 et est recrutée au niveau des CDB. En cas de surexpression de la lamine B1, 53BP1 est séquestrée par la lamine B1. Le recrutement de 53BP1 aux dommages, en plus d'être régulé de manière stricte, est contrôlé à distance par son interaction avec la Lamine B1.

Au final, l'ensemble de ces résultats suggère que dans les cellules normales en absence de dommages, la Lamine B1 interagit avec 53BP1 et joue le rôle de « réservoir » de 53BP1. Cette réserve de 53BP1 est située à distance mais est rapidement disponible en cas de stress génotoxique. Après dommages à l'ADN, 53BP1 se dissocie de la Lamine B1 permettant ainsi son recrutement rapide à la chromatine endommagée. En cas de surexpression (comme retrouvée dans différentes tumeurs), la Lamine B1 séquestre 53BP1, empêchant son recrutement, contribuant ainsi à une instabilité génétique.

MOLECULAR BIOLOGY

Lamin B1 sequesters 53BP1 to control its recruitment to DNA damage

Laure Etourneau^{1,2†}, Angela Moussa^{1,2†}, Emilie Rass^{1,2†}, Diane Genet^{1,2†}, Simon Willaume^{1,2}, Caroline Chabance-Okumura^{1,2}, Paul Wanschoor^{1,2}, Julien Picotto^{1,2}, Benoît Thézé^{1,2}, Jordane Dépaigne³, Xavier Veaute³, Eléa Dizet³, Didier Busso³, Aurélie Barascu^{1,2}, Lamya Irbah^{1,4}, Thierry Kortulewski^{1,5}, Anna Campalans⁶, Catherine Le Chalony^{1,2}, Sophie Zinn-Justin⁷, Ralph Scully⁸, Gaëlle Pennarun^{1,2}, Pascale Bertrand^{1,2*}

Double-strand breaks (DSBs) are harmful lesions and a major cause of genome instability. Studies have suggested a link between the nuclear envelope and the DNA damage response. Here, we show that lamin B1, a major component of the nuclear envelope, interacts directly with 53BP1 protein, which plays a pivotal role in the DSB repair. This interaction is dissociated after DNA damage. Lamin B1 overexpression impedes 53BP1 recruitment to DNA damage sites and leads to a persistence of DNA damage, a defect in nonhomologous end joining and an increased sensitivity to DSBs. The identification of interactions domains between lamin B1 and 53BP1 allows us to demonstrate that the defect of 53BP1 recruitment and the DSB persistence upon lamin B1 overexpression are due to sequestration of 53BP1 by lamin B1. This study highlights lamin B1 as a factor controlling the recruitment of 53BP1 to DNA damage sites upon injury.

INTRODUCTION

Genome stability is ensured by the coordination of cell cycle control, DNA repair, apoptosis, and senescence. Double-strand breaks (DSBs) are very harmful lesions that can be generated by endogenous and exogenous stresses (1). DSB repair defects lead to cellular death, senescence, and genome instability. In mammalian cells, nonhomologous end joining (NHEJ) plays a pivotal role in DSB repair, and consistently, its defect leads to high sensitivity to DSB-inducing agents and genome rearrangements. However, while NHEJ is essential for the maintenance of genome stability, it can also generate genetic instability through chromosomal sequence capture or translocations (2–4). Moreover, NHEJ has been suggested to contribute to triggering chromothripsis observed in tumors (5).

The tumor suppressor p53-binding protein (53BP1) protein, in association with telomere-associated protein RIF1 (RIF1), PAX-interacting protein 1 (PTIP), Bloom syndrome protein (BLM) proteins, favors NHEJ DSB repair by protecting DNA extremities from resection through the 53BP1-RIF1-dependent recruitment of the shielding complex (6–10), a required step for competitor pathways, such as homologous recombination or alternative end-joining (11–16). 53BP1 deficiency leads to radiosensitivity, and 53BP1-deficient mice are prone to tumor development (17). However, uncontrolled 53BP1 recruitment increases genetic instability in mitosis (18, 19). Together, these observations indicate the need to tightly control

NHEJ and 53BP1 recruitment to DNA damage. Various sophisticated mechanisms controlling 53BP1 binding to damaged chromatin have been reported. Several modifications of chromatin and of associated proteins that surround DSBs modulate the accessibility of 53BP1 to DNA damage sites. In addition, post-translational modifications of 53BP1 itself tightly control its recruitment to damaged DNA and its subsequent role in DNA damage response (DDR) (18–22).

Different studies have suggested a link between nuclear envelope proteins and the DDR. In mammalian cells, the integrity and plasticity of the nuclear envelope are ensured by the two types of nuclear lamins, A-type and B-type, and their associated proteins (23). While lamin B1, a major component of the nuclear lamina, encoded by the *LMNB1* gene, is present throughout the organism's lifespan, lamin A encoded by the *LMNA* gene is mainly expressed in differentiated cells (23). Various degenerative pathologies are associated with *LMNA* gene mutations, among which the severe premature aging Hutchinson-Gilford progeria syndrome (HGPS). In this case, a deficient processing of the precursor pre-lamin A leads to the expression of a mutated, immature, and farnesylated lamin A protein named progerin (24, 25). Beyond the impact of lamins on nuclear integrity, on gene expression regulation and possibly on DNA replication, a role for lamins, especially for lamin A, in DNA damage signaling and repair has been also reported. The persistence of DNA damage, as visualized by the presence of the DSB marker γ H2AX foci, has been observed in progeria cells, after pre-lamin A overexpression and in a mouse model with defective ZMPSTE24 protease, which is involved in pre-lamin A processing to generate mature lamin A (26–29). The persistence of DNA damage has been proposed to participate in the aging phenotypes of HGPS (26, 27). Moreover, a decrease in 53BP1 stability was reported in mouse embryonic fibroblasts lacking lamin A gene expression (30). It has been also shown that lamin A can coimmunoprecipitate with 53BP1 (31) and that pre-lamin A overexpression leads to a mislocalization of 53BP1 into the cytoplasm (32). Lamin B1 decrease, a situation that can be observed upon senescence induction, leads to misregulation of DNA repair factors expression, especially those involved in DSB repair, and may lead to DNA repair defect (33, 34).

¹Université de Paris and Université Paris Saclay, INSERM, IRCM/IBFJ, CEA, UMR Stabilité Génétique, Cellules Souches et Radiations, F-92265 Fontenay-aux-Roses, France. ²"DNA Repair and Ageing" Team, IRCM/IBFJ, DRF, CEA, France. ³Genetic Engineering and Expression Platform (CIGEX), IRCM, DRF, CEA, Fontenay-aux-Roses, France. ⁴Imaging platform, IRCM, DRF, CEA, F-92265 Fontenay-aux-Roses, France. ⁵"Radiopathology" Team, IRCM/IBFJ, DRF, CEA, France. ⁶Université de Paris and Université Paris Saclay, IRCM/IBFJ, CEA, UMR Stabilité Génétique Cellules Souches et Radiations, "Genetic Instability Research" Team, F-92265 Fontenay-aux-Roses, France. ⁷Laboratory of Structural Biology and Radiobiology, Institute for Integrative Biology of the Cell (I2BC), CEA, CNRS, Université Paris-Saclay, F-91190 Gif-sur-Yvette, France. ⁸Department of Medicine, Beth Israel Deaconess Medical Center and Harvard Medical School, Boston, MA, USA. *Corresponding author. Email: pascale.bertrand@cea.fr †These authors contributed equally to this work.

However, to date, no genetic disease associated with a decrease of lamin B1 level has been reported. Recently, it has been reported identification of de novo mutations in *LMNB1* that result in a dominant and damaging effect on nuclear envelope formation and that cause microcephaly in humans (35, 36). In contrast, various pathological situations have been associated with lamin B1 overexpression. A duplication of the *LMNB1* gene, resulting in lamin B1 overexpression, is responsible for adult-onset autosomal dominant leukodystrophy (ADLD) (37). Overexpression of lamin B1 was also reported in two repair syndromes, namely, ataxia telangiectasia (A-T) and Werner syndromes, caused respectively by mutations in *ATM* and *WRN* genes, and which are associated with genetic instability, cancer predisposition, and premature aging (38, 39). We have previously identified lamin B1 accumulation in A-T cells. We showed that normalizing lamin B1 rescued the nuclear shape alteration (NSA) and decreased the premature senescence observed in these cells (38). Last, NSA is one of the characteristics of tumor cells, and for decades, it has been used by cytologists to classify tumors in relation with their aggressiveness. In several tumors, a high level of lamin B1 has been found (40–44). However, the impact of NSA and especially of lamin B1 accumulation on genome stability or on DSB repair has not been studied yet.

Here, we determine the effect of lamin B1 overexpression on DSB repair. In contrast to what has been reported for lamin A deficiency or mutant pre-lamin A accumulation (30–32), we find that neither the 53BP1 level nor its nuclear localization is altered upon lamin B1 overexpression. However, lamin B1 overexpression impedes 53BP1 recruitment to DNA damage. We identify a direct interaction between endogenous lamin B1 and 53BP1 proteins. In cells, this interaction is dissociated after exposure to ionizing radiation (IR), allowing rapid 53BP1 recruitment to DNA damage. Together, these data highlight a previously unidentified mechanism that modulates 53BP1 recruitment after DNA injury and unveil another link between the nuclear envelope, DSB repair, and genome stability.

RESULTS

Lamin B1 overexpression leads to DSB accumulation and to a higher sensitivity to genotoxic stress

Lamin B1 was overexpressed in human transformed fibroblasts, and 48 hours after, cell survival was measured upon exposure to genotoxic stress. Cloning efficiency assay, performed after irradiation exposure, highlights an elevated sensitivity of lamin B1-overexpressing cells compared to control cells (Fig. 1A). Consistently, upon IR, the metaphases of lamin B1-overexpressing cells show a significantly higher level of chromosome abnormalities including chromatid breaks (Fig. 1B). In unchallenged lamin B1-overexpressing cells, the presence of an elevated number of chromosomal DSBs (Fig. 1B) was confirmed by the quantification of γ H2AX foci (Fig. 1C). The γ H2AX foci increased upon a two- to fivefold lamin B1 overexpression, a level comparable to what is observed in ADLD or in tumor cells (Fig. 1C). An increase of γ H2AX level was also detected and quantified by Western blotting (Fig. 1C). A slower kinetics of IR-induced γ H2AX foci disappearance in lamin B1-overexpressing cells versus control cells is consistent with a DSB repair defect. Three hours after irradiation, 65 and 80% of γ H2AX foci persist in lamin B1-overexpressing-cells (for a 2- to 5-fold overexpression and for >5-fold overexpression, respectively), while less than 25% of γ H2AX foci persist in control cells (Fig. 1D). Quantification of breaks on

metaphases (in unchallenged cells and upon IR) and analysis of γ H2AX foci 3 hours after irradiation showed that lamin A overexpression also triggers DNA damage persistence (fig. S1, A and B). The MDC1 protein, which is involved in the first steps of the DDR, binds to DSBs through γ H2AX and is required for 53BP1 recruitment (45, 46). A decrease in the disappearance of IR-induced MDC1 foci was also observed in lamin B1-overexpressing cells compared to control cells (fig. S2). These data suggest a DSB repair defect triggered by lamin B1 dysregulation downstream of γ H2AX and MDC1 recruitments.

Lamin B1 overexpression alters the NHEJ efficiency

We then determined whether the sensitivity to genotoxic agents and the persistence of DSBs after irradiation could result from a defect in DSB repair by NHEJ. For this purpose, cells containing an intrachromosomal substrate, which allows the measurement of NHEJ events, were cotransfected with vectors encoding the meganuclease I-SceI and lamin B1 (Fig. 2A). The measurement of CD4 expression by flow cytometry monitors the repair frequency of I-SceI-induced DSBs by NHEJ, as previously described (2, 16, 47–49). Lamin B1 overexpression resulted in a twofold decrease in the frequency of CD4-positive cells following I-SceI expression (Fig. 2B). The I-SceI level after lamin B1 overexpression is comparable with level found in cells transfected with an empty vector (Fig. 2A, right). These data show that lamin B1 overexpression represses NHEJ. As lamins may have a role in gene expression (23), the expression levels of the essential proteins of the NHEJ pathway (KU70, KU80, DNA-PKcs, XRCC4, and ligase IV) were examined by Western blot after lamin B1 overexpression. No changes in the levels of these proteins were observed in lamin B1-overexpressing cells (fig. S3A).

Lamin B1 overexpression alters 53BP1 recruitment to the damage sites

The 53BP1 protein plays an important role in controlling DSB repair and favors NHEJ by repressing resection at the double-strand DNA ends. Lamin B1 overexpression triggers a decrease in 53BP1 IR-induced foci (IRIF) formation in a dose-dependent manner (Fig. 3A). The 53BP1-dependent recruitment to DNA damage of the downstream RIF1 protein, which plays a key role with shelterin complex to protect DSB from resection, was analyzed. Consistent with a defect of 53BP1 recruitment, Fig. 3B shows a defect in RIF1 foci formation after irradiation.

To decipher whether lamin B1 overexpression might affect 53BP1 expression or stability, we measured the 53BP1 protein expression level by Western blot. Lamin B1 overexpression did not affect the protein level of 53BP1 (fig. S3B); thus, the defects in DSB repair and in 53BP1 foci formation observed here are not due to a defect in 53BP1 protein expression or stability, in contrast to what is observed in *LMNA*^{-/-} cells (30, 31). Nevertheless, to exclude a potential alteration of lamin A level, we measured the level of lamin A/C after lamin B1 dysregulation and we did not observe any difference (fig. S3C). These data show that the impaired 53BP1 recruitment to DNA damage induced by lamin B1 is not associated with a change of lamin A and lamin C proteins. Differences in 53BP1 nuclear import that account for defective recruitment to DNA damage sites and for a NHEJ defect have been reported after depletion of the nuclear pore protein NUP153 (50). However, no difference in the cellular localization of 53BP1 was observed after lamin B1 dysregulation (fig. S3D), in contrast to what was recently reported for

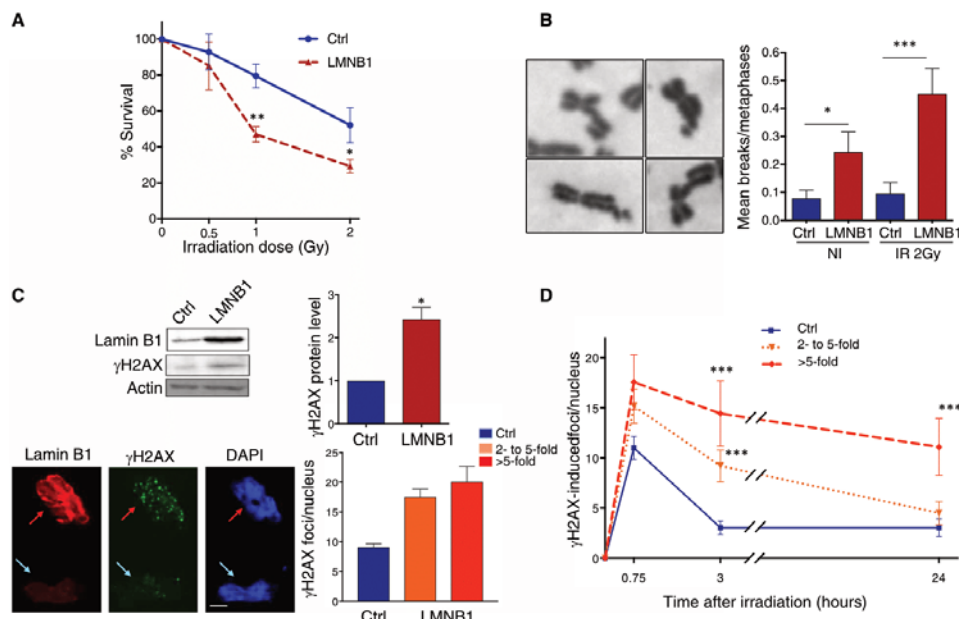


Fig. 1. Enhanced genotoxic stress sensitivity and increased DSB formation in lamin B1-overexpressing cells. (A) Clonogenic survival curves of control (Ctrl) and lamin B1-overexpressing cells (LMNB1) after γ -irradiation. Forty-eight hours after transfection, cells are plated (100, 500, 1000, or 2000 cells per well of six-well plate) and irradiated (Cs137, 0.5, 1, or 2 Gy at 1.77 Gy/min; iBL637 irradiator). Eight to 11 days later, cell colonies were stained by gentian violet and counted. Multiple *t* test *P* values $^{*}P < 0.05$; $^{**}P < 0.005$. (B) Chromosomal aberrations were scored in metaphase spreads prepared from lamin B1-overexpressing cells or control cells, under basal conditions (NI) or irradiation (2 Gy) 24 hours before cell harvest. Histogram shows the mean number of chromatid breaks scored per metaphase [$n = 89$ (Ctrl, NI); $n = 98$ (LMNB1, NI); $n = 94$ (Ctrl, IR); and $n = 94$ (LMNB1, IR)]. Example of chromosomes with chromatid breaks found in lamin B1-overexpressing cells are shown in the left. (C) Analysis of basal γ H2AX foci and protein levels in control and lamin B1-overexpressing cells 48 hours after transfection. γ H2AX protein levels were analyzed by Western blot (left, top) and quantified from three independent experiments with ImageJ (right, top). Representative images and quantification of γ H2AX foci by immunofluorescent staining are shown in the left and right bottom panels, respectively. Scale bar, 10 μ m. (D) Analysis of IR-induced γ H2AX foci kinetics after irradiation (0.5 Gy), in control (Ctrl) and lamin B1-overexpressing (LMNB1) cells. γ H2AX foci were counted with Metamorph software from four independent experiments. For (C) and (D), lamin B1-overexpressing cells were divided into two categories: cells expressing moderate (up to fivefold) or higher (more than fivefold) levels of lamin B1. For (B), (C), and (D), unpaired *t* test *P* values $^{*}P < 0.05$; $^{**}P < 0.005$; $^{***}P < 0.0001$. Error bars, SEM.

pre-lamin A overexpression (32). Together, these observations show that lamin B1 overexpression leads to a defect in 53BP1 foci formation, which is neither due to a defect in 53BP1 protein expression/stability nor to a defect in its import into the nucleus.

We next analyzed 53BP1 recruitment to damaged DNA by time-lapse video microscopy after microirradiation. Green fluorescent protein (GFP)-53BP1 and DsRed-lamin B1 were coexpressed in U2OS cells. Forty-eight hours later, the cells were microirradiated and monitored using live microscopy. Then, GFP-53BP1 recruitment to the laser track was analyzed. A lower GFP level was measured in DsRed-lamin B1-positive cells compared to control cells (Fig. 3C), confirming that lamin B1 overexpression induces a defect in 53BP1 recruitment to the DNA damage sites. Note here that neither lamin B1 staining/presence was shown to the laser track, suggesting that lamin B1 is not recruited to DNA damage after DNA damage.

Together, these observations demonstrate that lamin B1 overexpression leads to a defect in 53BP1 recruitment to damage sites. However, in contrast to data published for expression of pre-lamin

A, the alteration of 53BP1 recruitment to DNA damage triggered by lamin B1 expression is not due to a defect in 53BP1 protein expression/stability or import into the nucleus, suggesting that the involved molecular mechanism is different from the one induced by lamin A dysregulation.

Lamin B1 interacts with the 53BP1 protein

Lamins have been shown to modulate the activity of proteins, such as transcription factors, by sequestering them (51). Since no defect in 53BP1 expression or nuclear import was observed upon lamin B1 overexpression, we hypothesized that lamin B1 might interact with 53BP1 and thus regulate its activity/recruitment after DNA injury. Immunoprecipitation assay showed that endogenous lamin B1 coprecipitates with endogenous 53BP1 (Fig. 4A). This interaction was not affected (Fig. 4A and fig. S4A) by a benzonase treatment (whose efficiency was verified; fig. S4B), thus indicating that the lamin B1 and 53BP1 proteins did not coprecipitate through DNA bridging. The lamin B1-53BP1 interaction was further confirmed by proximity

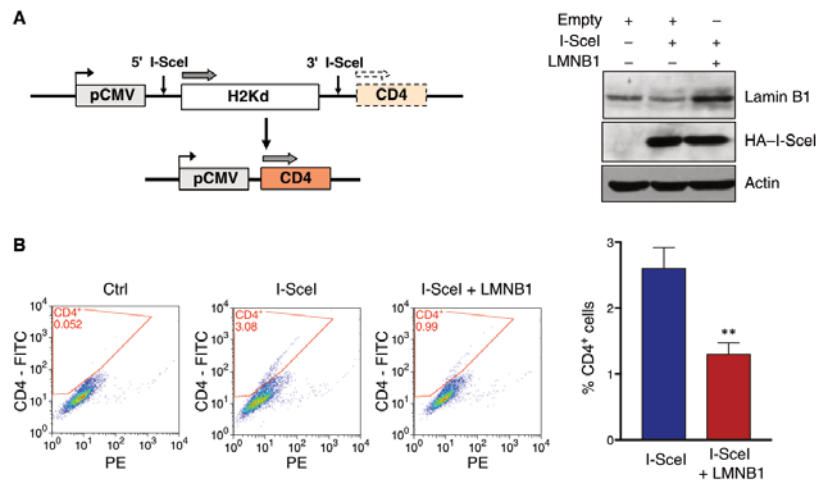


Fig. 2. Lamin B1 overexpression decreases NHEJ efficiency. (A) The intrachromosomal substrate (left): The reporter genes encode for the membrane antigens H2Kd and CD4. Before expression of the meganuclease I-SceI, CD4 is too far away from CMV promoter to be expressed. I-SceI sites flank a fragment containing the H2Kd gene. After cleavage by I-SceI meganuclease, rejoining of the DNA ends can lead to direct ligation of the CMV promoter with the CD4 fragment leading to the expression of CD4, monitored by flow cytometry. Western blot analysis (right) shows lamin B1 overexpression and the equivalent level of I-SceI expression between I-SceI and I-SceI + LMNB1 conditions. (B) NHEJ event frequency in control and lamin B1-overexpressing cells. An example of CD4-positive cell fluorescence-activated cell sorting quantification (NHEJ event) is shown in control and lamin B1-overexpressing cells (left). Frequencies of NHEJ events (CD4⁺) in lamin B1-overexpressing cells (I-SceI + LMNB1) relative to control cells (I-SceI) are shown in the right (two tailed Mann-Whitney test, ** $P < 0.005$). The values correspond to 14 independent experiments. FITC, fluorescein isothiocyanate; PE: phycoerythrin.

ligation assay (PLA), which allows the visualization and quantification of in situ interactions (between proteins that are in close vicinity). The red dots in Fig. 4B correspond to in situ endogenous interactions between lamin B1 and 53BP1. The extinction of 53BP1 or lamin B1 by small interfering RNAs (siRNAs) strongly affects the frequency of PLA dots attesting to the specificity of the detected signal (Fig. 4B and fig. S4C). In contrast, after lamin B1 overexpression, a higher number of PLA dots was observed, reflecting an increase in interactions (Fig. 4C). Next, the localization of the interaction was investigated. Figure 4D and fig. S5A show that PLA dots are localized both in nucleus interior and at the nuclear periphery. However, according to the level of lamin B1 overexpression, the number of PLA dots is significantly increased at the periphery (50 to 65% compared to 30% without overexpression). This suggests that 53BP1 (at least a part) could be sequestered at nuclear envelop (NE) upon lamin B1 overexpression.

Coimmunoprecipitation between lamin A and 53BP1 has been previously reported (31); however, there is no indication whether this interaction is direct. We confirmed that these proteins interact, at least in close vicinity, by PLA. This interaction between lamin A and 53BP1 is affected by lamin B1 depletion and is increased by lamin B1 overexpression (fig. S5, B and C), which may suggest a role for lamin B1 in this interaction. Localization of interaction between lamin A and 53BP1 was analyzed. The PLA dots localized either to nucleoplasm or nuclear periphery in endogenous conditions and are not relocated to the periphery upon lamin A overexpression (at a level of overexpression comparable to that of lamin B1 (2- to 5-fold or >5-fold) (fig. S5D). Thus, in contrast with lamin B1

overexpression condition, 53BP1 does not seem to be relocated or sequestered to the NE upon lamin A overexpression.

Lamin B1 and 53BP1 are dissociated after DNA damages

The interaction between endogenous lamin B1 and 53BP1 proteins was observed in unchallenged cells (Fig. 4, A and B), suggesting a physiological role for this interaction. We next studied the fate of this interaction in the presence of DNA damage. For this purpose, the interaction between lamin B1 and 53BP1 was monitored by PLA at various times after 2-Gy irradiation. A decrease in PLA dots was detected in control cells 30 min after irradiation (Fig. 5A, left). Notably, this timing corresponds to the time of maximal 53BP1 foci assembly in these cells (compare Figs. 5A and 3A). These data suggest that an interaction between lamin B1 and 53BP1 preexists under basal conditions but is disrupted after irradiation when the presence of 53BP1 is required at the damaged sites. Upon lamin B1 overexpression, dissociation of lamin B1–53BP1 interaction was no longer observed at 30 min (Fig. 5A, right). In addition, fig. S6A shows that there is no colocalization between (remaining) lamin B1–53BP1 PLA dots and 53BP1 foci, suggesting that the interaction between lamin B1 and 53BP1 is not colocalized at DNA breaks and the lamin B1 regulates 53BP1 recruitment at distance of damage. Thus, these data strongly suggest that the basal interaction between lamin B1 and 53BP1 must be inhibited after irradiation to enable 53BP1 to be recruited to sites of DNA damage. However, a higher level of lamin B1 impedes the dissociation of 53BP1 from lamin B1 and subsequently should impair the recruitment of 53BP1 to DNA damage sites. This hypothesis is highly consistent with the observed

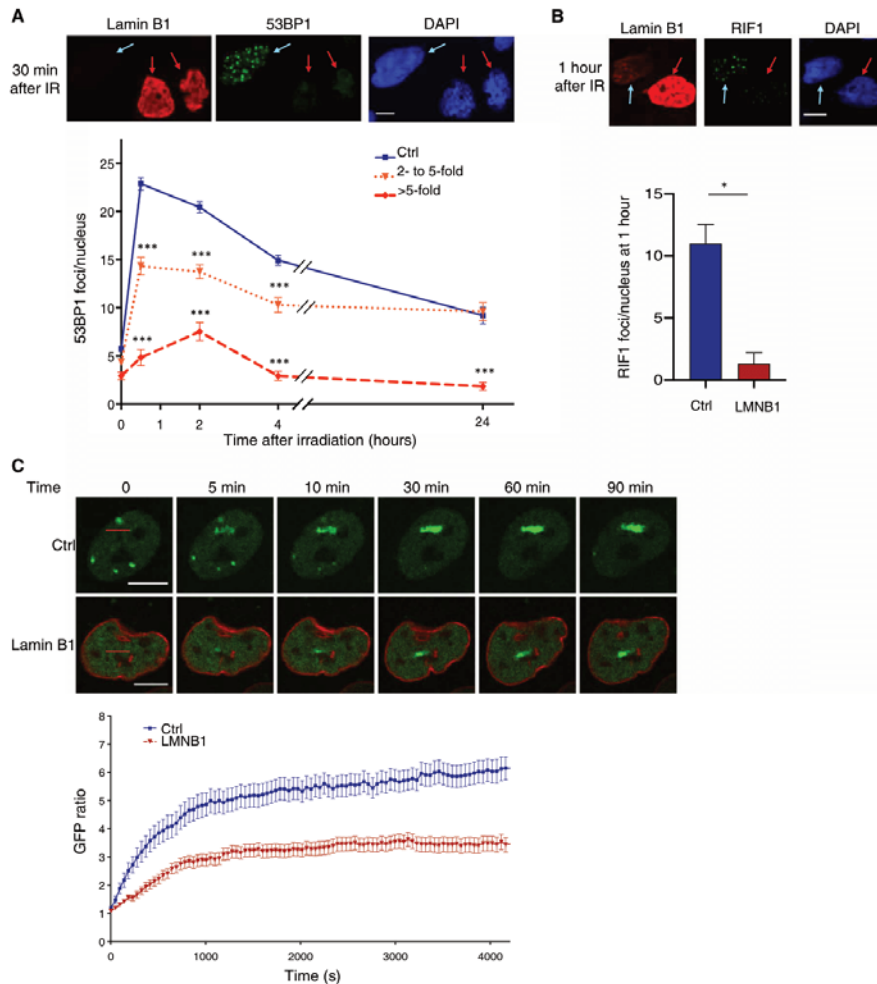


Fig. 3. Lamin B1 overexpression impedes 53BP1 recruitment to DNA damage sites. (A) Postirradiation kinetics of 53BP1 foci in transfected cells with empty (Ctrl) or lamin B1-expressing vectors. Representative images of 53BP1 foci at 30 min after irradiation (2 Gy), visualized by immunofluorescence staining, are shown in the top panel. 53BP1 foci were counted from three independent experiments with Metamorph software in control cells (Ctrl) and in lamin B1-overexpressing cells and were divided into two categories: those with moderate staining (up to fivefold lamin B1 level) or those with higher staining (more than fivefold) lamin B1 level (bottom). DAPI, 4',6-diamidino-2-phenylindole. (B) Postirradiation formation of RIF1 foci in transfected cells with empty (Ctrl) or lamin B1-expressing vectors. Representative images of RIF1 foci at 1 hour after irradiation (5 Gy), visualized by immunofluorescence staining, are shown in the top. RIF1 foci were counted with Cell Profiler and KNIME software from three independent experiments in control cells (Ctrl) and in lamin B1-overexpressing cells with two- to fivefold lamin B1 level (bottom). (C) Recruitment kinetic of 53BP1 after laser microirradiation in U2OS cells transfected with either a 53BP1-GFP-expressing vector only (Ctrl) or both 53BP1-GFP-expressing and Ds-Red-lamin B1 expressing vectors (LMNB1). Cells were microirradiated with a 405-nm laser, and images were collected during a 75-min period to follow 53BP1 recruitment (top). GFP intensity at the breaks was then measured using NIS-Elements software (bottom). The values correspond to three independent experiments. Red line: region of irradiation; white line: scale bar. Unpaired *t* test *P* values **P* < 0.05; ****P* < 0.0001. Error bars, SEM. Scale bars, 10 μ m.

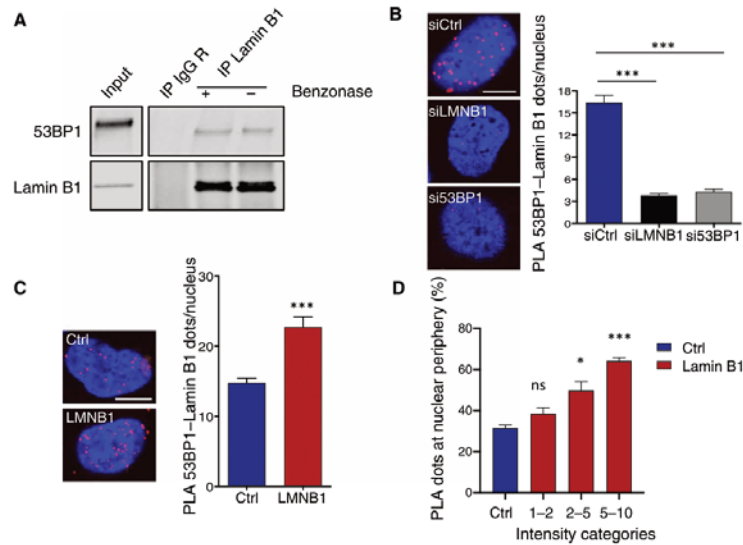


Fig. 4. 53BP1 interacts with lamin B1. (A) Coimmunoprecipitation of endogenous lamin B1 and 53BP1. Proteins from cellular lysates were subjected, before (–) or after (+) benzonase treatment, to immunoprecipitation with rabbit antibodies against lamin B1 or IgG as control. Coimmunoprecipitated proteins were revealed with mouse anti-53BP1 and rabbit anti-lamin B1 antibodies. Coimmunoprecipitation of lamin B1 and 53BP1 was confirmed in four independent experiments. (B) In situ interaction between endogenous 53BP1 and lamin B1. Cells were transfected with control siRNA (siCtrl), siRNA directed against lamin B1 mRNA specifically (siLMNB1) or against 53BP1 mRNA specifically (si53BP1), and subjected to PLA using anti-53BP1 and lamin B1 antibodies. Example of an in situ interaction between endogenous 53BP1 and lamin B1 visualized as red fluorescent dots (left). Quantification of PLA dots per nucleus is shown ($n > 100$ nuclei analyzed per condition) (right). (C) In situ interaction between 53BP1 and lamin B1 proteins after lamin B1 overexpression. Cells transfected with empty vector (Ctrl) or with lamin B1–expressing vector (LMNB1) were subjected to PLA using anti-53BP1 and lamin B1 antibodies. Example of in situ interaction between 53BP1 and lamin B1 visualized as red fluorescent dots (left). Quantification of PLA dots per nucleus is shown ($n > 400$ nuclei analyzed per condition) (right). (D) In situ localization of the interaction between 53BP1 and lamin B1. Cells transfected with empty vector (Ctrl) or with lamin B1–expressing vector (LMNB1) were subjected to PLA using anti-53BP1 and lamin B1 antibodies. PLA dots at the nuclear membrane or in the nucleus interior were counted and expressed as a percentage of total PLA dots per cells from three to four independent experiments. Level of Lamin B1 overexpression was categorized in three classes as a fold increase compared to endogenous level: 1- to 2-fold, 2- to 5-fold, or 5- to 10-fold (respectively, intensity categories: 1 to 2, 2 to 5, or 5 to 10). Error bars, SEM. Scale bar, 10 μ m. Unpaired *t* test *P* values **P* < 0.05; ****P* < 0.0001. ns, not significant.

defects in the kinetics of 53BP1 foci formation and in the recruitment of 53BP1 to DNA damage sites as demonstrated in the above data (Fig. 3).

Lamin A–53BP1 interaction also dissociates after damage, as it has been previously reported (31). However, the overexpression of lamin A does not impede its dissociation from 53BP1 (fig. S6B). This also suggests that lamin A overexpression impedes 53BP1 recruitment to DNA damage (fig. S6C) by different mechanism(s) than those triggered by lamin B1 overexpression.

Since interaction between lamin B1 and 53BP1 is decreased shortly after exposure to IR, this suggests that the DDR could be involved in the disruption of this interaction. Thus, we analyzed the impact of ATM activation on the dissociation between these proteins. Coimmunoprecipitation assays confirm a decrease of interaction between lamin B1 and 53BP1 upon irradiation (Fig. 5B and fig. S7A). Although a decrease was observed of 53BP1 coimmunoprecipitated with lamin B1 upon ATM inhibitor without irradiation (fig. S7A), the level of interaction between lamin B1 and 53BP1 in the presence of ATM inhibitor is still higher after IR (compared after radiation without ATM inhibitor). No difference of interaction was observed before and after radiation (Fig. 5B and fig. S7A) in the

presence of ATM inhibitor, suggesting that ATM signaling may play a role in dissociation of the interaction.

Furthermore, 53BP1 is phosphorylated by ATM in response to DSB, and its N-terminal region contains 28 Ser/Thr–Gln (S/T–Q) residues that are known target sites for ATM (52, 53). Under unchallenged condition, 53BP1–lamin B1 interaction was confirmed in 53BP1-deficient cells expressing either a wild-type (WT) 53BP1 or a 28A unphosphorylatable mutant 53BP1 (Fig. 3G). PLA experiments were performed allowing to analyze cells with comparable expression level of WT 53BP1 and 28A mutant 53BP1. The WT 53BP1–lamin B1 PLA dots are importantly decreased after IR, confirming the dissociation between lamin B1 and 53BP1 (Fig. 5C and fig. S7B). Unexpectedly, a decrease of 28A mutant 53BP1–lamin B1 PLA dots was observed without irradiation compared to WT 53BP1–lamin B1 (fig. S7B). However, after irradiation, the number of lamin B1 PLA dots with the 28A mutant 53BP1 is still more elevated than those obtained with WT 53BP1. No difference of interaction between lamin B1 with mutant 53BP1 was observed before or after radiation (Fig. 5C and fig. S7B). These data may suggest that 53BP1 phosphorylation could be required for its efficient dissociation after IR.

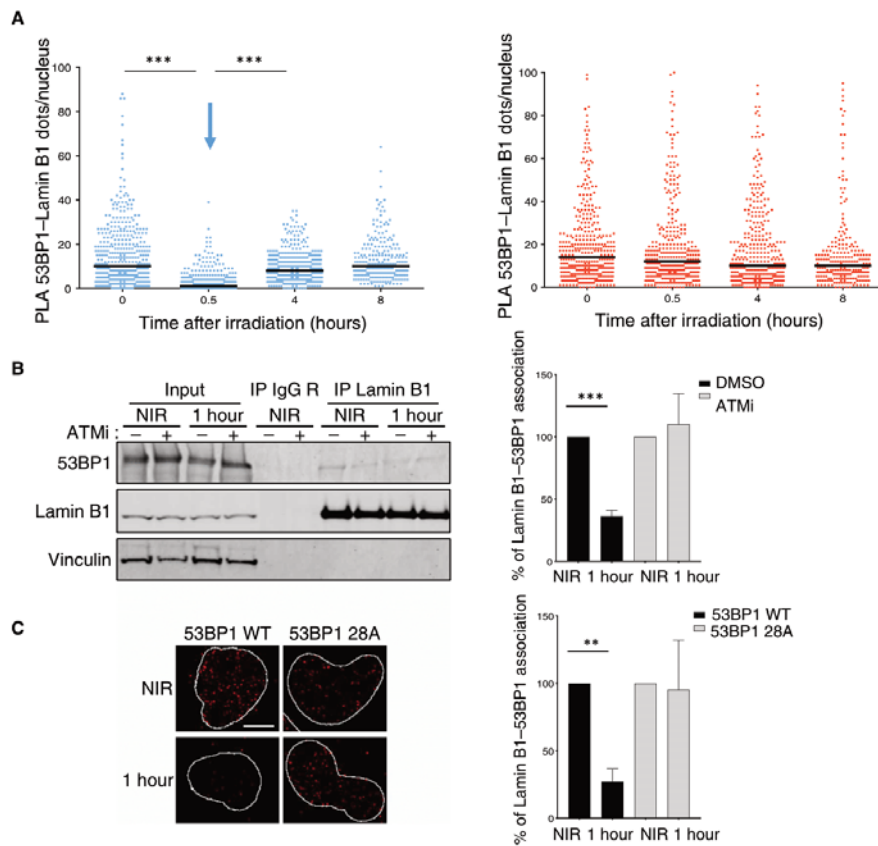


Fig. 5. 53BP1–lamin B1 interaction is dissociated after irradiation. (A) Fate of the lamin B1–53BP1 interaction after DNA damage. Quantification of PLA kinetics of the endogenous interaction after irradiation (2 Gy) from three independent experiments (left). Quantification of PLA kinetics upon lamin B1 overexpression after irradiation (2 Gy) from three independent experiments (right). (B) Impact of ATM activity inhibition on 53BP1–Lamin B1 dissociation after IR induced DNA damages. Proteins from cellular lysates treated with ATM inhibitor (ATMi, +) or vehicle (–) were subjected to immunoprecipitation before (NIR) or 1 hour after irradiation (2 Gy) with rabbit antibodies against lamin B1 or IgG as control with DNase treatment. Coimmunoprecipitated proteins were revealed by Western blot with mouse anti-53BP1 and rabbit anti-lamin B1 antibodies (left) and quantified from four independent experiments (right). (C) Impact of 53BP1 N-terminal phosphorylation on the dissociation between lamin B1 and 53BP1 after IR. 53BP1 knockout cells transfected with WT 53BP1 vector (53BP1 WT) or with 28A mutant 53BP1 vector (53BP1 28A) were subjected to PLA using anti-53BP1 and lamin B1 antibodies, before (NIR) or 1 hour after irradiation (2 Gy). Example of in situ interaction between 53BP1 constructs and lamin B1 visualized as red fluorescent dots (left). Quantification of PLA dots per nucleus from three independent experiments is shown (right). For (B) and (C), percentage of lamin B1–53BP1 association after irradiation was normalized to corresponding nonirradiated conditions. Error bars, SEM. Scale bar, 10 μ m. Unpaired *t* test *P* values ***P* < 0.005; ****P* < 0.0001.

Lamin B1 interacts directly with the minimal region of 53BP1 required for its recruitment to DNA damage

As lamin B1 could affect the recruitment of 53BP1 to damaged chromatin through its interaction, we aimed at further characterizing this latter by first identifying the domain of 53BP1 involved in its interaction with lamin B1. Glutathione *S*-transferase (GST) pull-down assays, using different purified truncated 53BP1 constructions, showed that lamin B1 directly interacts with a 53BP1 fragment (ranging from amino acids 1222 to 1659) (Fig. 6A). This corresponds to the

minimal region of 53BP1 required for its recruitment to DNA damage (the IRIF domain) (54), including the Tudor and ubiquitination-dependent recruitment (UDR) domains, key domains that allow 53BP1 to bind to histone modifications. At damaged chromatin, 53BP1 interacts with dimethylated lysine 20 of histone H4 (H4K20me2) and ubiquitinated lysine 15 of histone H2A (H2AK15ub) through its Tudor and UDR domains, respectively (46, 55, 56). Therefore, we expressed the IRIF domain of 53BP1 in human fibroblasts. Figure 6B shows that this domain coimmunoprecipitates with endogenous

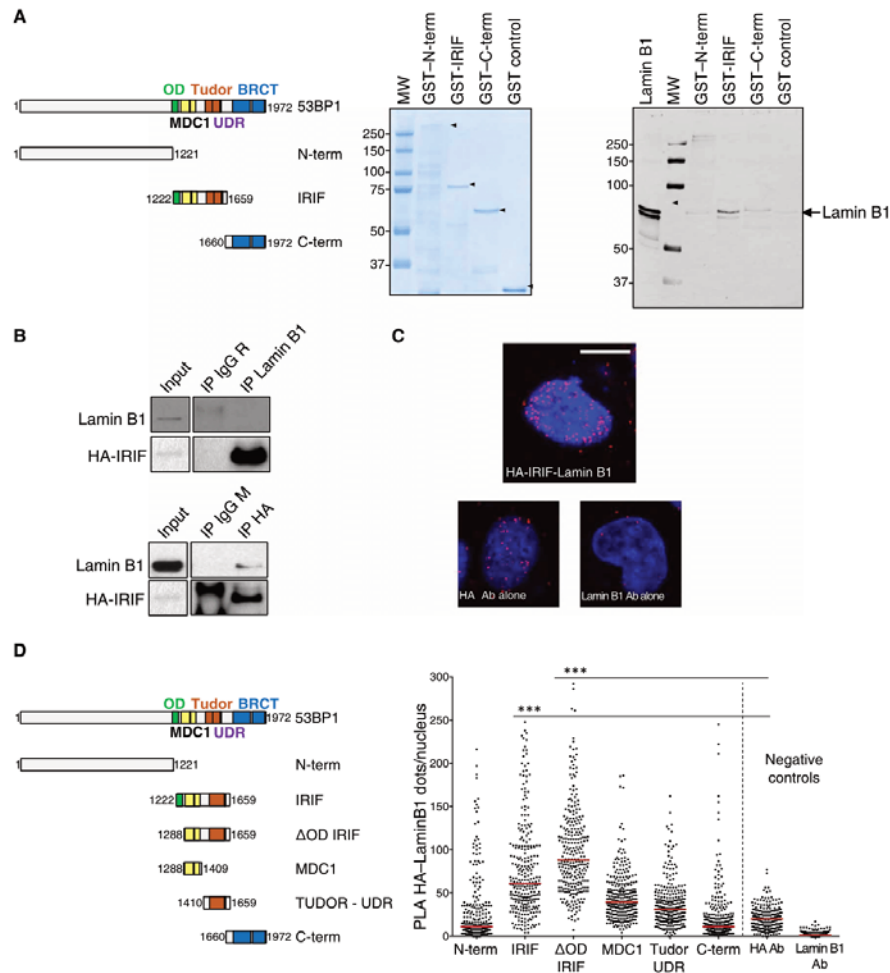


Fig. 6. 53BP1 directly interacts with lamin B1. (A) Scheme of GST-tagged 53BP1 constructs (left) and Coomassie-stained samples of purified recombinant proteins (GST-53BP1 N-term, GST-53BP1 IRIF; GST-53BP1 C-terminal; GST) used for interaction studies (middle). Interaction between Lamin B1 and IRIF domain of 53BP1 detected by GST pull-down experiment. Full-length lamin B1 was incubated with GST or GST-53BP1 fragments. The formed protein complexes were separated by 10% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) and analyzed by Western blot using anti-lamin B1 antibody. The left lane corresponds to 100 ng of purified full-length lamin B1 used in these pull-down experiments (right). (B) Coimmunoprecipitation of 53BP1 IRIF and endogenous lamin B1 from SV40-fibroblasts transfected with HA-53BP1 IRIF. Top: Proteins from cellular lysates were subjected to immunoprecipitation with rabbit antibodies against lamin B1 or IgG as control and were immunoblotted with mouse anti-HA and rabbit anti-lamin B1 antibodies. Bottom: Proteins from cellular lysates were subjected to immunoprecipitation with mouse antibodies against HA or IgG as control and were immunoblotted with mouse anti-HA and rabbit anti-lamin B1 antibodies. Same input (same extract used for coimmunoprecipitation) was loaded for top and bottom panels. (C) Representative PLA between HA-IRIF 53BP1 and lamin B1, with negative controls using either one of the two antibodies. Scale bar, 10 μ m. (D) Scheme of HA-tagged 53BP1 constructs (left) and PLA between endogenous lamin B1 and 53BP1 constructs (right). Cells transfected with vectors expressing different HA-53BP1 domains were fixed after 48 hours. PLA was then performed using antibodies directed against lamin B1 and HA. Unpaired t test value *** $P < 0.0001$. Ab, antibody.

lamin B1. This interaction has also been detected *in situ* by PLA (Fig. 6C). The localization of PLA dots can be clearly visualized at nuclear periphery. In agreement with the GST pull-down assay and coimmunoprecipitation results, a significantly and statistically higher number of PLA dots per nucleus is observed with the IRIF domain of 53BP1 compared to other transfected 53BP1 fragments (Fig. 6D and fig. S8A). Together, these results validate an interaction between endogenous lamin B1 and the IRIF domain of 53BP1 in cells. Cells transfected with a 53BP1 fragment (Δ OD-IRIF) corresponding to the same region but lacking its oligomerization domain (deletion between residues 1222 to 1289) present an equivalent number of dots per nucleus, showing the specific involvement of the IRIF domain in the interaction, and not of another domain through dimerization with the endogenous 53BP1. Notably, the integrity of this IRIF region seems to be required for this interaction. This interaction is highly altered when only the MDC1 domain (residues 1288 to 1409) or the Tudor-UDR region (residues 1410 to 1659) is expressed in fibroblasts. Together, our data suggest that the sequestration of 53BP1 by lamin B1 requires the 53BP1 IRIF domain, which is involved in the recognition of the damaged chromatin.

The interaction of 53BP1 with lamin B1 controls its recruitment to damaged DNA

To assess whether the defect of 53BP1 recruitment upon lamin B1 overexpression is due to 53BP1 sequestration, we identified the region of lamin B1 involved in the interaction with 53BP1.

In vitro GST pull-down, using various purified truncated lamin B1 constructions (Fig. 7A), shows that the N-terminal part of lamin B1, and more precisely the Head Coil 1 domain (amino acids 1 to 243), interacts directly with the IRIF domain of 53BP1 (Fig. 7B). In contrast, the Coil 2 domain (amino acids 244 to 424) and the C-terminal part (amino acids 398 to 586) of lamin B1 do not reproducibly interact with the 53BP1 IRIF domain.

We aimed to confirm *in cellulo* and by another approach which lamin B1 region interacts with 53BP1. For this purpose, vectors expressing different lamin B1 fragments were first expressed in human fibroblasts (Fig. 7A and fig. S8B), and their *in situ* interaction with endogenous 53BP1 was tested by PLA. A higher number of PLA dots per nucleus was observed in cells transfected with the N-terminal region of lamin B1 (amino acids 1 to 424) and with the Head Coil1 domain (amino acids 1 to 243) compared to cells transfected with the Coil 2 domain of lamin B1 (amino acids 244 to 424) and to PLA-negative controls (Fig. 7C). We next expressed Flag-Head-Coil 1 domain or Flag-lamin B1 devoid of this interaction domain. Endogenous 53BP1 is revealed by Western blot in Immunoprecipitation of Flag-Head-Coil1. In contrast, 53BP1 is almost undetectable in Delta-Head-coil1 lamin B1 immunoprecipitation (Fig. 7D). PLA experiments confirmed this result. PLA dot numbers corresponding to 53BP1-delta Head-Coil1 are very low compared to 53BP1-HeadCoil1 domain dots (fig. S8C). These results confirm the data obtained by GST pull-down and show that the region encompassing the Head and Coil 1 domains of lamin B1 is sufficient for the interaction with 53BP1 *in cellulo*.

Then, to further confirm that lamin B1–53BP1 interaction is key in the decrease of 53BP1 foci observed upon lamin B1 overexpression, we analyzed both 53BP1 foci formation upon expression of the minimal interaction domain of lamin B1 (Head-Coil1) and upon expression of lamin B1 lacking its interaction domain (Δ -Head-Coil1). We observed that the expression of the interaction domain of lamin B1

(Head-Coil1) mimics the effect of overexpressed full-length lamin B1 protein and leads to a decrease in 53BP1 foci (Fig. 8A and fig. S9). In contrast, the expression of lamin B1 protein lacking the interaction domain (Δ -Head-Coil1) has no impact on 53BP1 foci formation. We verified that the relative expression of full protein, Head-Coil1 domain, and lamin B1 lacking this region are equivalent by Western blot (fig. S8B), and the number of 53BP1 foci was quantified in cells with comparable expression (measured by immunofluorescence) of the different lamin B1 constructions (fig. S9). Together, our data demonstrate that lamin B1 directly interacts with the 53BP1 IRIF domain, involved in the recognition of damaged chromatin, and suggest that lamin B1 overexpression affects the recruitment of 53BP1 to damage through the trapping of 53BP1. To investigate the impact of 53BP1 sequestration by lamin B1 on DNA damage persistence, we analyzed the γ H2AX foci persistence after IR and the number of breaks on metaphases upon expression of either the interaction domain of lamin B1 or the lamin B1 lacking its interaction domain with 53BP1 (Fig. 8, B and C). The expression of the interaction domain mimics the impact of the expression of full lamin B1: persistence of γ H2AX foci and elevated number of DNA breaks on metaphase. In contrast, the lamin B1 lacking the interaction domain does not trigger a significant DNA damage persistence observed either by measurement of γ H2AX foci (Fig. 8B) or number of breaks per metaphase (Fig. 8C). These data show that the sequestration of 53BP1 by lamin B1 is the key in DNA damage persistence upon lamin B1 dysregulation.

DISCUSSION

53BP1 recruitment at DSB sites is essential for its function in the DDR and must be finely controlled. 53BP1 plays a critical role in the DSB repair pathway choice; however, uncontrolled 53BP1 binding or recruitment to damage sites leads to genetic instability (18, 19). Several sophisticated mechanisms have been described for the binding of 53BP1 to damaged chromatin (20). The minimal region of 53BP1 required for this interaction includes its Tudor domains and UDR motif. Once the chromatin is damaged, 53BP1 binds to H4K20me2 through its Tudor domains and to H2AK15Ub through its UDR motif (46, 55, 56). After DSB induction, the RNF8 and RNF168 proteins play essential roles in 53BP1 recruitment to damaged chromatin by unmasking H4K20me2 through the ubiquitination and subsequent proteasomal degradation of JMJD2A and L3MBTL1 proteins (57–59). In addition, various posttranslational modifications are involved in the regulation of 53BP1 recruitment to DNA damages. UDR motif phosphorylation has been shown to impede the binding of 53BP1 to H2AUB in the mitotic chromatin, thus avoiding genetic instability during chromosome segregation (18, 19). However, there are emerging data suggesting that mechanisms are also in place to control 53BP1 at distance from damaged chromatin.

Our results unveil that the lamin B1 protein directly interacts with the 53BP1 region encompassing the Tudor and UDR domains (IRIF domain), which are required for 53BP1 to interact with damaged chromatin and for the control of its recruitment (46, 55, 56). These data suggest that, in addition to sequestering 53BP1, lamin B1 could also mask the region of 53BP1 required for its recruitment to damaged chromatin. However, we were not able to detect any recruitment of lamin B1 at DNA damage, and lamin B1–53BP1 PLA dots seem not be colocalized with 53BP1 foci, suggesting a

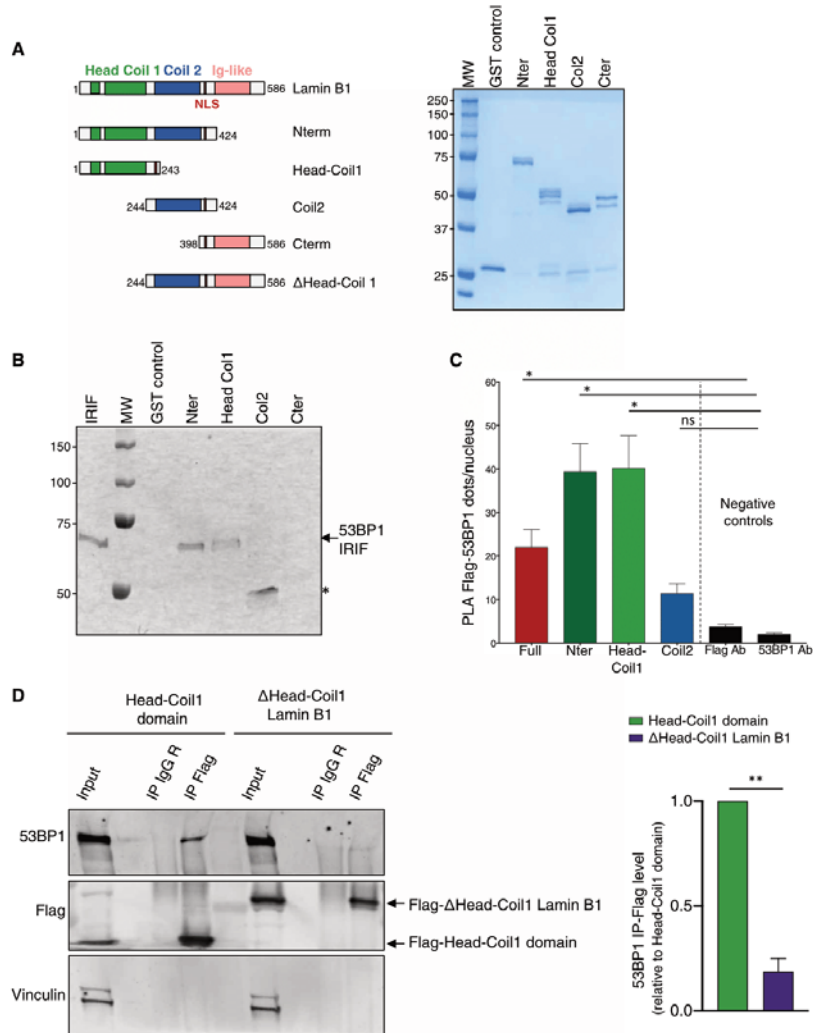


Fig. 7. Identification of the lamin B1-interacting domain with 53BP1. (A) Scheme of lamin B1 constructions used for GST pull-down experiment (left) and Coomassie-stained samples of purified recombinant proteins used for interaction studies (right). (B) Interaction between Head Coil 1 domain of Lamin B1 with IRIF domain of 53BP1 detected by GST pull-down experiment. IRIF 53BP1 was incubated with GST or GST-lamin B1 constructions in the presence of Benzamide and the protein complexes that formed were separated by 10% SDS-PAGE and analyzed by Western blot using anti-53BP1 antibody. The left lane corresponds to 100 ng of purified IRIF 53BP1 used in these pull-down experiments. Asterisk corresponds to an unspecific trapping of antibody to GST-Coil2. (C) PLA between endogenous 53BP1 and Flag-lamin B1 constructs: PLA spots were counted in Flag-expressing cells using Cell Profiler and KNIME software in five independent experiments. One-way analysis of variance (ANOVA) test: * $P < 0.05$ (D) Coimmunoprecipitation of Flag-Head Coil 1 domain of Lamin B1 and endogenous 53BP1. Proteins from cellular lysates of SV40-fibroblasts transfected with Flag-Lamin B1 constructions were subjected to immunoprecipitation with rabbit antibodies against Flag tag or IgG as control and were immunoblotted with mouse anti-53BP1 and rabbit anti-Flag tag antibodies (left). Quantification of from three independent experiments (right). Unpaired t test value ** $P < 0.005$. Error bars, SEM.

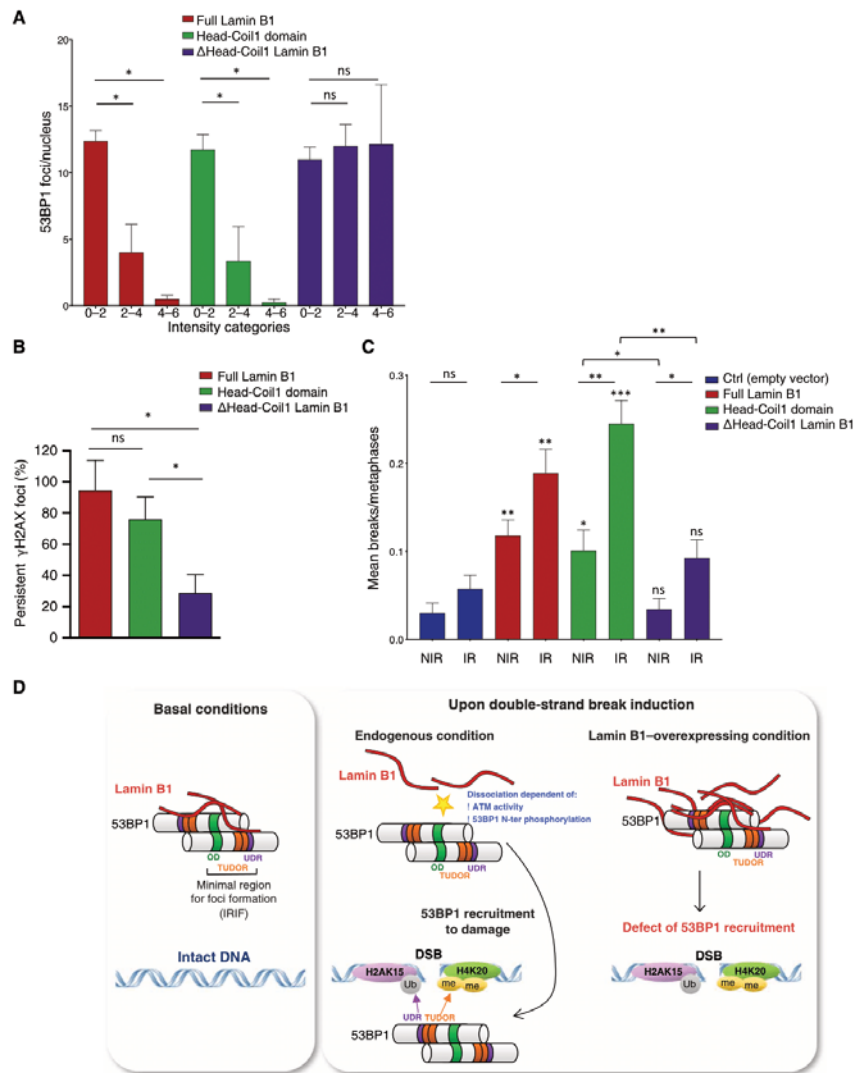


Fig. 8. Lamin B1–53BP1 interaction is key for the 53BP1 recruitment defect observed upon lamin B1 overexpression. (A) Impact of the lamin B1 interaction domain on radiation-induced 53BP1 foci, 30 min after irradiation (2 Gy). 53BP1 foci were counted in Flag-expressing cells using ImageJ software and foci per nuclei plotted in three classes according to the Flag-expression level of the nuclei (right) in four independent experiments. One-way ANOVA test: * $P < 0.05$. (B) Analysis of persistent γ H2AX foci kinetics after expression of the lamin B1 interaction domain. γ H2AX foci were counted in Flag-expressing cells using ImageJ software and plotted for cells with similar Flag-expression level. Histograms show the percentage of radio-induced foci persisting 3 hours after irradiation (0.5 Gy) from three to four independent experiments. (C) Chromosomal aberrations were scored in metaphase spreads prepared from Flag–Lamin B1 constructions expressing cells or control cells, under basal conditions (NI) or irradiation (2 Gy) 24 hours before cell harvest. Histogram shows the mean number of chromatid breaks scored per metaphase ($n = 199$ to 425). P value above bar compare to matching NIR or IR “empty vector” datasets. (D) Model of 53BP1 recruitment control by lamin B1. In unchallenged cells, 53BP1 interacts with lamin B1 via its minimal region of foci formation including the Tudor domains and the UDR domain. Our data suggest an ATM activity–dependent dissociation between these proteins occurs upon DNA damage, thus enabling 53BP1 to be recruited to damaged chromatin. However, in the case of lamin B1 overexpression, 53BP1 is sequestered and its recruitment to damaged chromatin is precluded. For (B) and (C), unpaired t test P values * $P < 0.05$; ** $P < 0.005$; *** $P < 0.0001$. Error bars, SEM.

control of 53BP1 recruitment by lamin B1 at distance from damage. Recent reports suggested that the TIRR protein binds to the IRIF domain of 53BP1 and controls the 53BP1 recruitment to DNA damage (also at distance of DNA damage) (60, 61). These data, along with our results, highlight again the key role of the IRIF domain for 53BP1 regulation after induction of DNA damage. This domain, by being masked by proteins, such as lamins or TIRR proteins (and likely by other proteins remaining to be discovered), controls the arrival of 53BP1 to the damage. The IRIF domain is also responsible for the direct binding to damaged chromatin. In addition, 53BP1 binding to DNA damage at G₂/M is also regulated by posttranslational modifications of the IRIF domain (18, 19). Recently, it has been shown that the nucleoskeleton NuMA protein, which is proposed to be structurally related to nuclear lamins, also controls 53BP1 recruitment at distance of DNA damage, through its interaction with 53BP1 protein (62). Interactions between 53BP1 and TIRR, NuMA, or lamin B1 are severed after IR induced DNA damages (18, 19). TIRR protein has been recently reported to be an important inhibitor of the 53BP1-P53 complex and therefore controls p53-mediated cell fate program (63). Recent studies indicated that 53BP1 nuclear compartments show features of liquid-liquid phase separation (64, 65). Modulation of phase separation is also a way to modulate 53BP1 function. Recent reports showed that AHNAK, a scaffold protein, which interact with 53BP1 in G₁, can also modulate the p53-dependent cell fate, by limiting the accumulation of 53BP1 on chromatin and by restraining 53BP1 oligomerization and phase separation (66). In the presence of DNA damage, in contrast with lamin B1, the interaction between AHNAK and 53BP1 on chromatin is enhanced and probably limiting p53-P21 response. The potential relationship, competition, or cross-talk between lamins and TIRR, NuMA, and AHNAK is not known yet and should be very interesting to further explore.

The dissociation of TIRR proteins from 53BP1 is controlled by an ATM-dependent DDR and requires 53BP1 phosphorylation. NuMA phosphorylation by ATM has been also proposed for the release of its 53BP1 interaction after DNA damage, since 53BP1 recruitment on laser track is abolished after expression of a nonphosphorylatable NuMA mutant (62). Our data also suggest that ATM could also regulate the association/dissociation of 53BP1 from lamin B1, likely through phosphorylation of 53BP1. This regulation by ATM strongly reinforces the physiological importance of these interactions.

Although our data suggest that the 53BP1 phosphorylation could control the dissociation between lamin B1 and 53BP1 upon IR, we do not exclude that other mechanisms could be participate in the regulation of the interaction between these proteins. Therefore, it would be interesting to investigate whether some posttranslational modifications of lamin B1 could regulate the association-dissociation with 53BP1. Many different posttranslational modifications (such as phosphorylation, ubiquitination, acetylation...) of lamin B1 have been described. In the course of the revision of this manuscript, it has been published and proposed that acetylation of lamin B1 may participate to localization of 53BP1 at NE, and the authors suggested that it could play a role on the balance between DSB repair (DSBR) mechanisms (67). The impact of the acetyltransferase or deacetylase potentially responsible for lamin B1 acetylation could be further investigated on 53BP1 interaction and on DNA damage persistence or on genome (in)stability.

While lamin A defect has been reported to affect 53BP1 stability (30), we did not observe any change in the 53BP1 level after lamin

B1 overexpression. Moreover, we showed that the impaired 53BP1 recruitment to DNA damage induced by lamin B1 is not associated with a change of lamin A and lamin C proteins. In our study, we identified a direct interaction between lamin B1 and 53BP1 proteins and we identified the interaction domains. The expression of lamin B1 lacking its interacting domain does not affect either 53BP1 recruitment or persistent γ H2AX foci after IR or number of breaks observed on metaphases. Together, these observations suggest that the defect of 53BP1 recruitment and subsequent DNA damage persistence after lamin B1 overexpression is mainly due to the direct sequestration of 53BP1 by lamin B1.

A previous study revealed that the lamin A and 53BP1 proteins could coimmunoprecipitate (31). Here, we confirmed a close vicinity between both proteins by PLA. It has not yet been reported whether the lamin A could interact directly with 53BP1. The interaction between lamin A and 53BP1 seems to require the presence of lamin B1 (or a properly organized lamin B1 meshwork), as we found that lamin B1 depletion decreases the number of dots when the PLA was performed to analyze the in situ interaction between endogenous lamin A and 53BP1 proteins (fig. S5B).

We show here that pre-lamin A overexpression leads to defect of 53BP1 recruitment and persistence of DNA damage revealed by γ H2AX and an increase of breaks on metaphase. However, the mechanism(s) involved appear to be different from the mechanism that we have described here after overexpression of lamin B1. The overexpression of pre-lamin A has no impact on localization of its interaction with 53BP1 (no relocation to NE) and does not prevent either its dissociation from 53BP1 after DNA damages. These data suggest that lamin A overexpression, in contrast to lamin B1 overexpression, does not impede 53BP1 recruitment by a sequestration mechanism, but likely due to defect in 53BP1 transport to nucleus as it has been reported (32). Different links between lamin A and DNA repair have been established (68), thus many other consequences of lamin A dysregulation could also account for the persistence of DNA damage (68). It has been also proposed that lamin A affects foci stability and could interact with γ H2AX (69), the overexpression of lamin A may lead to a prolonged γ H2AX signal. This may also explain the apparent γ H2AX persistence in the case of overexpression of lamin A.

Upon lamin B1 depletion, dysregulated expression of different DNA repair genes has been reported (33). These transcriptional alterations also seem to lead to a defect in DNA damage handling. In contrast, upon lamin B1 overexpression, we found no difference in the expression of proteins involved in NHEJ. Our data show that lamin B1 overexpression affects DSB repair not by altering key DNA/NHEJ repair gene expression but directly by sequestering the 53BP1 protein. This association is physiologically and tightly regulated since genotoxic treatment leads to a dissociation of endogenous 53BP1 from endogenous lamin B1. Together, these data reinforce the idea that the control of lamin B1 levels is of particular importance for genome stability, not only in the course of tumorigenesis but also during senescence or in pathology such as HGPS.

Persistence of DNA damage has been proposed to participate in the deleterious effects of progerin expression in HGPS. It would be interesting to investigate whether progerin could also interact with 53BP1 to characterize this potential interaction. Our data also raise the question of the potential role of the decrease in lamin B1 observed in progeria (70) on DNA damage persistence. We report here that the interaction between lamin A and 53BP1 is affected by the

depletion of lamin B1. Decreased level of lamin B1 may potentially have an importance for the persistence of the DNA damage observed in the HGPS pathology. Therefore, the role of lamin B1 decrease and of potential 53BP1 defect in progeria should be more investigated in future.

Altered nuclear shape and increased lamin B1 levels are observed in many tumors and seem to be associated with advanced grades of tumorigenesis and poor outcome (40–44). We show here that lamin B1 up-regulation leads to DSB accumulation that may ultimately lead to chromosomal rearrangements and genetic instability, both of which being hallmarks of tumorigenesis. It is thus tempting to speculate that the lamin B1 dysregulation could contribute to tumor progression through 53BP1 sequestration and/or DNA damage accumulation. A decrease of lamin A has also been observed in various tumors. A-type lamin depletion leads to 53BP1 destabilization due to increased activity of the cathepsin L proteasome pathway (71). It has been reported that pre-lamin A overexpression leads to 53BP1 cytoplasmic accumulation and subsequent recruitment defect to DNA damage because of NUP153 mislocalization (32). Hence, the dysregulation of either A-type or B-type lamin affects the DNA damage repair through an alteration of 53BP1, which is, however, mediated through distinct mechanisms. On the one hand, lamin A dysregulation affects the level of 53BP1 through degradation or mislocalization, and on the other hand, lamin B1, when overexpressed, sequesters 53BP1 away from repair sites. Then, in both situations, the dysregulation of lamins may participate in the genetic instability, which is associated with tumorigenesis. Exciting future studies should be performed to directly address this hypothesis.

In summary, the present data can be unified in the following model (Fig. 8D): In normal cells and in the absence of DNA damage, lamin B1 interacts with 53BP1 and can serve as “a reservoir” for 53BP1, away from repair sites but quickly available in response to genotoxic stresses. Upon DNA damage, 53BP1 dissociates from lamin B1, thus allowing its rapid recruitment to damaged chromatin. In the case of overexpression (or pathological situations associated with the lamin B1 up-regulation), lamin B1 sequesters 53BP1, impeding its recruitment to DNA damage sites. This impediment could have an impact on the frequencies of chromosomal rearrangements and thus may contribute to tumor evolution. However, because both 53BP1 deficiency and lamin B1 overexpression lead to radiosensitivity, dysregulation of the lamin B1 level may also represent an Achilles’ heel of tumors.

MATERIALS AND METHODS

Cell lines

SV40-transformed human fibroblasts (GM0639 cell line) and U2OS and derivative cells were grown in Dulbecco’s modified Eagle’s medium supplemented with 10% (v/v) fetal calf serum, 2 mM glutamine, and penicillin (200 IU/ml) at 37°C with 5% CO₂. U2OS 53BP1 knockout (KO) were provided by D. Durocher (6).

Survival assay

Forty-eight hours after the transfection, SV40-transformed fibroblast cells were plated at 100, 500, 1000, or 2000 cells per well. After adhesion, cells were treated with different doses of gamma ray (iBL637 irradiator; 0.5, 1, or 2 Gy at 1.77 Gy/min) and incubated for 8 to 11 days at 37°C before staining with gentian violet and colony counting.

Constructions of vectors expressing the different 53BP1 and Lamin B1 fragments

Two sets of constructs have been made depending on the experiments to be performed. For in vitro direct interaction tests, the different domains of either human 53BP1 (53BP1) or human lamin B1 (Lamin B1) were cloned by site-directed recombination using the Gateway technology (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA). For in vivo experiments, the domains of lamin B1 and 53BP1 were cloned by either by sequence- and ligation-independent cloning (SLIC) or by restriction-ligation. Open reading frames (ORFs) to be cloned were amplified by polymerase chain reaction (PCR) using specific primers (table S1). Briefly, two sequential PCR reactions were performed for the first set of constructs. The first PCR was performed with a template-specific forward primer that brought a tobacco etch virus (TEV) protease recognition site-encoding sequence for further cleavage. The second PCR was performed with a forward generic primer including the *attB1* recombination site sequence. Both PCRs of the first set were performed with a template-specific reverse primer including the *attB2* recombination site. The resulting PCR products were recombined by BP reaction to generate entry clones used for further LR reactions (first set of constructs) or to release the inserted domain by restriction-ligation (second set of constructs). For the second set of constructs, the ORF to be cloned by SLIC was amplified with sequence-specific primers extended at the 5’ and 3’ ends with a homology sequence for a modified pcDNA3 vector, and SLIC cloning was performed. All PCRs were performed using Phusion DNA polymerase following the manufacturer’s instructions. After amplification, PCR products were purified using a GeneJET PCR purification kit (Thermo Fisher Scientific). The Gateway cloning was performed following the manufacturer’s instructions. The BP reaction was performed using the pDONOR207 donor vector (Life Technologies), and LR reactions were performed using either pGGWA or pHGWA (72) for 53BP1 fragments or full-length lamin B1, respectively. All primers were designed to have a $T_m \approx 60^\circ\text{C}$. Restriction enzymes were obtained from New England Biolabs (Ipswich, MA) and antibiotics from Sigma-Aldrich (St Louis, MO). The sequences of all constructs were verified using universal T7 primers from GATC (T7, pcDNA3.1-RP/1, pcDNA3.1-RF, pDONOR-FP, and pDONOR-RP, depending on the construct) (table S2).

Ds-Red lamin B1-expressing vector is described in (73). Untagged lamin B1 full length was purchased from Origene (#SC 116661). Flag-lamin B1 was constructed by cloning a PCR product (primers: lower: GGGGTACCCCTTACATAATTGCACAGCTTCTATTGGATGCTCTTGGGGTCCCTGCTGGTGGAAAA; upper: CCGCTC-GAGCTAGCCACCATGGACTACAAGGACGACGATGACAAGCGGCCCGCGGCGACT-GCGACCCCGTGC CGCGGARGGG-CAGCCGCGTGGCGGCCACCACG) amplified from pCMV6-XL4-LMNBI (#SC 116661, Origene) into pcDNA3-puromycin vector Xho I and Kpn I sites.

Transfections

For the various experiments, 1.8×10^5 cells were plated 1 day before transfection. SV40 fibroblasts and 53BP1 KO U2OS cells were transfected using the jetPEI transfection reagent under the conditions specified by the manufacturer (polyplus transfection), and U2OS cells were transfected using Lipofectamine (Lipofectamine 2000, Life Technologies). For the repair foci analysis, the proximity ligation, and the survival assays, 3×10^{-13} mol of p-CMV-LMNBI plasmid or the same amount of the different 53BP1 or LMNB1

constructs, WT 53BP1 plasmid or 28A mutant 53BP1 plasmids (Addgene), or the empty plasmid was used to transfect the cells 48 hours before treatment and/or fixation. To perform NHEJ quantification assay, meganuclease I-SceI expression was achieved by transient transfection of the cells with 7.5×10^{-13} mol of the pCMV-Hemagglutinin (HA)-I-SceI plasmid, together with either 2.5×10^{-13} mol of the pCMV-LMN1 plasmid (lamin B1 overexpression) or the empty plasmid (control conditions). The U2OS cells used for the microirradiation experiments were transfected with 1.5 μ g of GFP-53BP1 plasmid and 1.5 μ g of either DsRed-LMN1 plasmid or empty plasmid. In the PLA assays, cells were transfected with plasmids as described above or with 20 μ M specific siRNA to lamin B1, lamin A, or 53BP1 (ON-TARGET plus SMARTpool, Dharmacon) or with control siRNA (NEG05, Eurogentec) using INTERFERin (Polyplus Transfection) under conditions specified by the manufacturer.

Nonhomologous end joining assay

SV40-transformed human fibroblasts cell line (GC92) containing the pCOH-CD4 intrachromosomal NHEJ substrate described in Fig. 2 was used to determine NHEJ frequency as described previously (48). Briefly, at 72 hours after transfection, cells were harvested in phosphate-buffered saline (PBS) with 20 mM EDTA and then washed in PBS (without Ca^{2+}) and fixed in PBS with 2% (w/v) paraformaldehyde for 20 min at room temperature. After the cells were saturated with PBS and 2% (w/v) bovine serum albumin (BSA) for 15 min, they were stained for 45 min with 0.5 μ g of anti-CD4-fluorescein isothiocyanate (FITC) or anti-CD4-Alexa Fluor 647 antibodies (BD Pharmingen). The cells were washed twice in PBS before fluorescence-activated cell sorting analyses.

Cellular fractionation

The cytosolic proteins from SV40-transformed fibroblasts were extracted by incubation in a buffer containing 1 mM Hepes, 10 mM KCl, 1.5 mM MgCl_2 , 0.5 mM dithiothreitol (DTT), 0.1% Triton X-100, and protease and phosphatase inhibitors (Roche) at 4°C for 10 min, followed by a centrifugation at 5000g for 2 min at 4°C. The nuclear fraction was obtained by extraction of the remaining pellet in a tris buffer [10 mM tris (pH 7.5), 1% SDS, and protease and phosphatase inhibitors].

Western blotting analysis

SV40-transformed fibroblasts were lysed in a buffer containing 10 mM tris (pH 7.5), 1% SDS, and protease and phosphatase inhibitors. We resolved the denatured protein extracts (25 to 50 μ g) using 10% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) or 3 to 8% NuPAGE tris-acetate gels (for the large proteins, such as 53BP1), transferred the proteins onto a nitrocellulose membrane, and probed the membrane with the following primary antibodies: anti-lamin B1 (rabbit, ab16048, Abcam), anti-53BP1 (rabbit, #4937S, Cell Signaling), anti-HA (mouse, MMS-101P, Covance), anti- γ H2AX (mouse, #05636, Upstate), anti-actin (rabbit, 057 K4803, Sigma-Aldrich), and anti-vinculin (mouse, ab18058, Abcam). Immunoreactivity was visualized using an enhanced chemiluminescence detection kit (EZ-ECL, Biological Industries), and signals were quantified using ImageJ software. For the GST pull-down experiments, for the control of siRNA depletion and fragments or GFP-tagged constructs expression, we used secondary fluorescent antibody [anti-rabbit IR800 (R-05060), anti-rabbit IR700 (R-05054), anti-mouse IR800 (R-05061), and anti-mouse IR700 (R-05055), DIAGOMICS]. Fluorescent

signals were acquired with Odyssey imager (LI-COR Biosciences) and quantified with Image Studio software (LI-COR Biosciences).

Protein purification

His-Lamin B1 and His-IRIF 53BP1

The gene encoding His-protein gene was placed under the T7 promoter in the vector pGWAHsLaminB, which was introduced into *Escherichia coli* strain BL21 (DE3). His-protein expression was induced by 0.5 mM isopropyl- β -D-thiogalactoside (IPTG). All of the subsequent protein purification steps were carried out at 4°C. Cells were harvested, resuspended in lysis buffer [50 mM tris-HCl (pH 8), 500 mM NaCl, 1 mM DTT, 10% glycerol, 1 \times Triton X-100, lysozyme (1 mg/ml), 1 mM 4-(2-aminoethyl) benzenesulfonyl fluoride, 10 mM benzamidine, and 2 μ M pepstatin] and disrupted by sonication. The extract was cleared by centrifugation at 186,000g for 1 hour at 4°C and then complemented with imidazole (20 mM final) before being loaded onto a 2-ml nickel-nitrilotriacetic acid (Ni-NTA) column (Qiagen) equilibrated with 50 mM tris-HCl (pH 8 at 4°C) and 500 mM NaCl. The column was washed with 30 ml of buffer A [50 mM tris-HCl (pH 8 at 4°C), 500 mM NaCl, 1 mM DTT, and 20 mM imidazole] followed by a second wash with 30 ml of buffer B [50 mM tris-HCl (pH 8 at 4°C), 100 mM NaCl, 1 mM DTT, and 20 mM imidazole]. Protein was eluted with buffer B containing 500 mM imidazole. Fractions containing His-protein were pooled and applied to a 1-ml Resource Q column (GE Healthcare) equilibrated with buffer B without imidazole. Protein was eluted with a 12-ml linear gradient of 0.05 to 0.5 M NaCl. Purified His-protein was stored at -80°C.

GST-53BP1 fragment purification and GST-lamin

B1 fragment purification

The plasmids pGWAHs53BP1 fragment (containing the GST-53BP1 fragment fusion gene) and plasmid pGWAHs lamin B1 fragment (containing the GST-lamin B1 fragment fusion gene) under the control of IPTG-inducible T7 promoter were introduced into *E. coli* strain BL21 (DE3). Overnight culture was diluted 100-fold in LB and incubated at 37°C until OD₆₀₀ (optical density at 600 nm) reached 1. At that time, IPTG was added to 0.5 mM, and incubation was pursued for 3 hours at 37°C. Cells were harvested; resuspended in 50 mM tris-HCl (pH 8 at 4°C), 500 mM NaCl, 1 mM DTT, 10% glycerol, 1 \times Triton X-100, lysozyme (1 mg/ml), 1 mM 4-(2-aminoethyl) benzenesulphonyl fluoride, 10 mM benzamidine, and 2 μ M pepstatin; and disrupted by sonication. Extracts were cleared by centrifugation at 186,000g for 1 hour at 4°C and then loaded onto a 1-ml Glutathione Sepharose 4B (GE Healthcare) column equilibrated with buffer A [50 mM tris-HCl (pH 8 at 4°C), 500 mM NaCl, 1 mM DTT, 0.5 mM EDTA, and 10% glycerol]. After the columns were washed extensively [40 ml of buffer A followed by 80 ml of buffer B (buffer A containing 100 mM NaCl)], GST proteins were eluted with elution buffer [50 mM tris-HCl (pH 8 at 4°C), 100 mM NaCl, 1 mM DTT, 0.5 mM EDTA, 10% glycerol, and 30 mM glutathione]. Fractions containing GST proteins were concentrated using Vivaspinn concentrator and then loaded onto a Superdex 75 10/300 GL (GE Healthcare) equilibrated with buffer B. Purified proteins were stored at -80°C.

GST pull-down assays

GST-53BP1 fragment (10 μ g) [GST-Nterm, GST-IRIF, GST-Cterm or GST-Nterm lamin B1, GST-Head-Coil1 lamin B1, GST-Coil2, GST-Cter lamin B1 or GST (10 μ g)] was immobilized on 20 μ l of Glutathione Sepharose 4B in 100 μ l of buffer A [50 mM tris-HCl

(pH 8 at 4°C), 150 mM NaCl, 1 mM DTT, 0.5 mM EDTA, 10% glycerol, 2 mM MgCl₂, and 25 U Benzonase] for 120 min at 4°C. The beads were collected by centrifugation and washed three times with 300 µl of buffer B (buffer A + 0.05% NP-40). His-lamin B1 (10 µg in 100 µl of buffer B) or His-IRIF 53BP1 (10 µg) was then added, and incubation was pursued for 120 min at 4°C with gentle agitation. The supernatant was removed and the beads were washed two times with 300 µl of buffer B. Proteins bound to the beads were then eluted by the addition of 30 µl of 50 mM tris-HCl (pH 8 at 4°C), 150 mM NaCl, 1 mM DTT, and 30 mM glutathione, and the presence of His-lamin B1 or His-IRIF 53BP1 in the eluate was determined by Western blot using respectively anti-lamin B1 antibody (ab16048, Abcam) or anti-53BP1 antibody (#4937S, Cell Signaling).

Immunofluorescence

Forty-eight hours after transfection, the SV40-transformed fibroblasts grown on glass coverslips were fixed in 4% (w/v) paraformaldehyde for 15 min and washed three times in PBS before a permeabilization step with 0.5% Triton X-100 in PBS for 15 min. After permeabilization, saturation was performed with PBS-BSA 2% containing 0.05% Tween 20 for 1 hour at room temperature. For 53BP1 foci analysis, coverslips were fixed for 5 min in ice-cold methanol and washed three times in PBS before saturation performed as described above. Cells were then immunolabeled using the following antibodies diluted with PBS-1%BSA containing 0.05% Tween 20 for 90 min at room temperature: anti-lamin B1 (rabbit, ab16048, Abcam), anti-lamin B1 (mouse, 56144 8D1, Santa-Cruz), anti-Flag (rabbit, F7425, Sigma-Aldrich), anti-53BP1 (mouse, 612522, BD Biosciences), anti-γH2AX (mouse, #05636, Upstate), and anti-MDC1 (rabbit, ab11169, Abcam). Cells were then probed with a secondary anti-mouse or anti-rabbit antibody coupled to Alexa Fluor 488 or 594, respectively (Life Technologies). Counterstaining was performed with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI; 1 µg/ml) in PBS, and slides were mounted with fluorescent mounting medium (Fluoromount-G, Southern Biotech). Images were obtained on a Leica DM5500 equipped with a 63× objective and a CoolSNAP HQ2 camera and were further processed with MetaMorph software (Molecular Devices). Digital image processing for nuclei and foci segmentation and fluorescence measurement was performed using ImageJ software or an in-house script developed in the MetaMorph software. Lamin B1-transfected fibroblasts were classified into two categories according to their lamin B1 expression level: cells expressing moderate (up to 5-fold) or higher (between 5- and 10-fold) levels of lamin B1, as compared to its basal expression level in nontransfected cells. For 53BP1 foci formation after Flag-lamin B1 fragment over-expression, nuclei were classified according to their Flag expression intensity as a fold compared to the maximal Flag antibody background intensity of nonoverexpressing nuclei measured on empty vector-transfected cells. Two classes with similar Flag expression intensity for each lamin B1 construct were defined: two- to fourfold or four- to sixfold intensity over the maximum background intensity. An average of between 25 and 80 cells per conditions and per replicate was analyzed.

Live cell microirradiation experiments

U2OS cells were plated on 35-mm glass bottom petri dishes. At 48 hours before microirradiation, cells were cotransfected with the 53BP1-GFP plasmid and either the lamin B1 plasmid or the empty plasmid. The nuclei were stained with Hoescht (1 µg/ml; Hoescht

33342, 4082, Cell Signaling). Live cell imaging was performed using a PLAN APO 60× (numerical aperture: 1.4) objective on a Nikon A1 confocal laser scanning microscope system attached to an inverted ECLIPSE Ti (Nikon Corp., Tokyo, Japan) maintained at 37°C under 5% of CO₂ and 20% O₂ atmosphere. The microirradiation was performed for selected regions for 2 s with a 405 nm-laser diode set to 2% of the maximum power. Time-lapse images were acquired every 30 s during 75 min. The analysis of protein recruitment kinetics was performed using the NIS-Elements software (Nikon Corp.) by measuring the change in the fluorescence intensities in the irradiated region over time. Intensity values were normalized by the background level in the same region before microirradiation.

Cytogenetic analysis

SV40-transformed fibroblasts were transfected with lamin B1, Head-Coil1 domain, lamin B1 deleted of the Head-Coil1 domain, with pre-lamin A or control vectors and cultured for 48 hours, then irradiated (IBL637 irradiator, 2 Gy, 1.77 Gy/min) or not, and replated for 24 hours. During the last 2 hours, colchicine (0.1 µg/ml; Sigma-Aldrich) was added to the cells. The trypsinized cell pellet was swollen in hypotonic KCl solution and incubated at 37°C for 20 min. Cells were fixed in ethanol-acetic acid (3:1) and spread on precooled glass slides. After the slides were air-dried, staining with 4% Giemsa was performed for 10 min. After the slides were mounted, metaphase spreads were captured in a blind fashion using a bright-field microscope (Leica DM5500) with a 63× objective lens.

Coimmunoprecipitation

The cellular proteins from SV40-transformed fibroblasts were extracted 48 hours after division for endogenous conditions or 48 hours after transfection using 50 mM tris-HCl (pH 7), 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0.5% NP-40, and a protease inhibitor cocktail (Roche). For the interaction analysis upon ATM inhibitor, cells treated were pre-treated for 2 hours with either 10 µM ATM inhibitor (ATMi; KU60019, S1570, Selleckchem) or dimethyl sulfoxide. One hour after irradiation (IBL637 irradiator, 2 Gy, 1.77 Gy/min) or not, cells were collected and proteins were extracted using the same buffer as above with 5% NP-40. The protein cell extract was incubated with the RQ1 nuclease (Promega) or Benzonase nuclease (0.5 U/µl; E1014, Sigma-Aldrich) supplemented with 10 mM MgCl₂ for 1 hour at room temperature. The Dynabeads protein G kit was used for the coimmunoprecipitation according to the manufacturer's recommendations (Life Technologies). In total, 2.5 µg of antibodies was coupled with Dynabeads at room temperature for 1 hour. The beads were subsequently washed three times with 0.05% Tween 20 in PBS before the incubation step with 1 mg of protein cell extract (1 hour and 30 min at room temperature). Laemmli buffer (2×) with 4% β-mercaptoethanol was used to dissociate and denature the beads-antibodies-proteins complexes. Western blot analysis was performed to reveal the proteins as described above. As coimmunoprecipitation controls, a specific mouse and rabbit immunoglobulins (IgGs) were used [mouse IgG (sc2025 Santa Cruz) or rabbit IgG (sc2027 Santa Cruz or 12-370 Merck Millipore)].

In situ PLA

SV40-transformed fibroblasts grown on slides were fixed in methanol for 10 min, washed in PBS, and stored in PBS (4°C). The slides were then saturated and stained as described above for immunofluorescence labeling using the following antibodies couples:

11. A. Bothmer, D. Robbiani, N. Feldhahn, A. Gazumyan, A. Nussenzweig, M. Nussenzweig, 53BP1 regulates DNA resection and the choice between classical and alternative end joining during class switch recombination. *J. Exp. Med.* **207**, 855–865 (2010).
12. P. Bouwman, A. Aly, J. Escandell, M. Pieterse, J. Bartkova, H. van der Gulden, S. Hiddingh, M. Thanasoula, A. Kulkarni, Q. Yang, B. Haffty, J. Tommiska, C. Blomqvist, R. Drapkin, D. Adams, H. Nevanlinna, J. Bartek, M. Tarsounas, S. Ganesan, J. Jonkers, 53BP1 loss rescues BRCA1 deficiency and is associated with triple-negative and BRCA-mutated breast cancers. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **17**, 688–695 (2010).
13. S. Bunting, E. Callen, N. Wong, H. Chen, F. Polato, A. Gunn, A. Bothmer, N. Feldhahn, O. Fernandez-Capetillo, L. Cao, X. Xu, C. Deng, T. Finkel, M. Nussenzweig, J. Stark, A. Nussenzweig, 53BP1 inhibits homologous recombination in Brca1-deficient cells by blocking resection of DNA breaks. *Cell* **141**, 243–254 (2010).
14. J. R. Chapman, P. Barral, J.-B. Vannier, V. Borel, M. Steger, A. Tomas-Loba, A. A. Sartori, I. R. Adams, F. D. Batista, S. J. Boulton, RIF1 is essential for 53BP1-dependent nonhomologous end joining and suppression of DNA double-strand break resection. *Mol. Cell* **49**, 858–871 (2013).
15. M. Di Virgilio, E. Callen, A. Yamane, W. Zhang, M. Jankovic, A. Gittlin, N. Feldhahn, W. Resch, T. Y. Oliveira, B. T. Chait, A. Nussenzweig, R. Casellas, D. F. Robbiani, M. C. Nussenzweig, RIF1 prevents resection of DNA breaks and promotes immunoglobulin class switching. *Science* **339**, 711–715 (2013).
16. A. Grabarz, J. Guirouilh-Barbat, A. Barasqu, G. Pennarun, D. Genet, E. Rass, S. Germann, P. Bertrand, I. Hickson, B. Lopez, A role for BLM in double-strand break repair pathway choice: Prevention of CtIP/Mre11-mediated alternative nonhomologous end-joining. *Cell Rep.* **5**, 21–28 (2013).
17. I. M. Ward, K. Minn, J. van Deursen, J. Chen, p53 binding protein 53BP1 is required for DNA damage responses and tumor suppression in mice. *Mol. Cell. Biol.* **23**, 2556–2563 (2003).
18. D. Lee, S. Acharya, M. Kwon, P. Drane, Y. Guan, G. Adelmant, P. Kalev, J. Shah, D. Pellman, J. Marto, D. Chowdhury, Dephosphorylation enables the recruitment of 53BP1 to double-strand DNA breaks. *Mol. Cell* **54**, 512–525 (2014).
19. A. Orthwein, A. Fradet-Turcotte, S. Noordermeer, M. Canny, C. Brun, J. Strecker, C. Escibano-Diaz, D. Durocher, Mitosis inhibits DNA double-strand break repair to guard against telomere fusions. *Science* **344**, 189–193 (2014).
20. S. Panier, S. J. Boulton, Double-strand break repair: 53BP1 comes into focus. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **15**, 7–18 (2014).
21. J. Benada, K. Burdova, T. Lidak, P. von Morgen, L. Macurek, Polo-like kinase 1 inhibits DNA damage response during mitosis. *Cell Cycle* **14**, 219–231 (2015).
22. X.-F. Zheng, S. S. Acharya, K. N. Choe, K. Nikhil, G. Adelmant, S. R. Satapathy, S. Sharma, K. Viccaro, S. Rana, A. Natarajan, P. Slciniski, J. A. Marto, K. Shah, D. Chowdhury, A mitotic CDK5-PP4 phospho-signaling cascade primes 53BP1 for DNA repair in G1. *Nat. Commun.* **10**, 4252 (2019).
23. T. Dechat, S. A. Adam, P. Taimen, T. Shimizu, R. D. Goldman, Nuclear lamins. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2**, a000547 (2010).
24. A. De Sandre-Giovannoli, R. Bernard, P. Cau, C. Navarro, J. Amiel, I. Boccaccio, S. Lyonnet, C. Stewart, A. Munnich, M. Le Merrer, N. Lévy, Lamin A truncation in Hutchinson–Gilford progeria. *Science* **300**, 2055 (2003).
25. M. Eriksson, W. Brown, L. Gordon, M. Glynn, J. Singer, L. Scott, M. Erdos, C. Robbins, T. Moses, P. Berglund, A. Dutra, E. Pak, S. Durkin, A. Csoka, M. Boehnke, T. Glover, F. Collins, Recurrent de novo point mutations in lamin A cause Hutchinson–Gilford progeria syndrome. *Nature* **423**, 293–298 (2003).
26. B. Liu, J. Wang, K. M. Chan, W. M. Tjia, W. Deng, X. Guan, J. D. Huang, K. M. Li, P. Y. Chau, D. J. Chen, D. Pei, A. M. Pendas, J. Cadinanos, C. López-Otin, H. F. Tse, C. Hutchison, J. Chen, Y. Cao, K. S. Cheah, K. Tryggvason, Z. Zhou, Genomic instability in laminopathy-based premature aging. *Nat. Med.* **11**, 780–785 (2005).
27. Y. Liu, A. Rusinol, M. Sinensky, Y. Wang, Y. Zou, DNA damage responses in progeroid syndromes arise from defective maturation of prelamin A. *J. Cell Sci.* **119**, 4644–4649 (2006).
28. I. Varela, J. Cadinanos, A. M. Pendas, A. Gutiérrez-Fernández, A. R. Folgueras, L. M. Sánchez, Z. Zhou, F. J. Rodríguez, C. L. Stewart, J. A. Vega, K. Tryggvason, J. M. Freije, C. López-Otin, Accelerated ageing in mice deficient in Zmpste24 protease is linked to p53 signalling activation. *Nature* **437**, 564–568 (2005).
29. S. Gonzalo, R. Kreienkamp, DNA repair defects and genome instability in Hutchinson–Gilford progeria syndrome. *Curr. Opin. Cell Biol.* **34**, 75–83 (2015).
30. I. Gonzalez-Suarez, A. Redwood, S. Perkins, B. Vermolen, D. Lichtensztein, D. Grotsky, L. Morgado-Palacin, E. Gapud, B. Sleckman, T. Sullivan, J. Sage, C. Stewart, S. Mai, S. Gonzalo, Novel roles for A-type lamins in telomere biology and the DNA damage response pathway. *EMBO J.* **28**, 2414–2427 (2009).
31. I. Gibbs-Seymour, E. Markiewicz, S. Bekker-Jensen, N. Mailand, C. J. Hutchison, Lamin A/C-dependent interaction with 53BP1 promotes cellular responses to DNA damage. *Aging Cell* **14**, 162–169 (2015).
32. A. M. Cobb, D. Larrieu, D. T. Warren, Y. Liu, S. Srivastava, A. J. O. Smith, R. P. Bowater, S. P. Jackson, C. M. Shanahan, Prelamin A impairs 53BP1 nuclear entry by mislocalizing NUP153 and disrupting the Ran gradient. *Aging Cell* **15**, 1039–1050 (2016).
33. V. Butin-Israeli, S. A. Adam, N. Jain, G. L. Otte, D. Neems, L. Wiesmüller, S. L. Berger, R. D. Goldman, Role of lamin b1 in chromatin instability. *Mol. Cell. Biol.* **35**, 884–898 (2015).
34. N.-A. Liu, J. Sun, K. Kono, Y. Horikoshi, T. Ikura, X. Tong, T. Haraguchi, S. Tashiro, Regulation of homologous recombinational repair by lamin B1 in radiation-induced DNA damage. *FASEB J.* **29**, 2514–2525 (2015).
35. D. A. Parry, C.-A. Martin, P. Greene, J. A. Marsh, M. Blyth, H. Cox, D. Donnelly, L. Greenhalgh, S. Greville-Heygate, V. Harrison, K. Lachlan, C. McKenna, A. J. Quigley, G. Rea, L. Robertson, M. Suri, A. P. Jackson, Heterozygous lamin B1 and lamin B2 variants cause primary microcephaly and define a novel laminopathy. *Genet. Med.* **23**, 408–414 (2021).
36. F. Cristofoli, T. Moss, H. W. Moore, K. Devriendt, H. Flanagan-Steet, M. May, J. Jones, F. Roelens, C. Fons, A. Fernandez, L. Martorell, A. Sellcorn, S. Maltz, G. Vitiello, G. V. der Hoeven, A. Skinner, M. Bollen, J. R. Vermeesch, R. Steet, H. V. Esch, De novo variants in LMNB1 cause pronounced syndromic microcephaly and disruption of nuclear envelope integrity. *Am. J. Hum. Genet.* **107**, 753–762 (2020).
37. Q. S. Padiath, K. Saigoh, R. Schiffmann, H. Asahara, T. Yamada, A. Koeppen, K. Hogan, L. J. Ptáček, Y.-H. Fu, Lamin B1 duplications cause autosomal dominant leukodystrophy. *Nat. Genet.* **38**, 1114–1123 (2006).
38. A. Barasqu, C. Le Chalony, G. Pennarun, D. Genet, N. Imam, B. Lopez, P. Bertrand, Oxidative stress induces an ATM-independent senescence pathway through p38 MAPK-mediated lamin B1 accumulation. *EMBO J.* **31**, 1080–1094 (2012).
39. B. Donadille, P. D’Anella, M. Auclair, N. Uhrhammer, M. Sorel, R. Grigorescu, S. Ouzounian, G. Cambonie, P. Boulout, P. Laforêt, B. Carbonne, S. Christin-Maitre, Y.-J. Bignon, C. Vigouroux, Partial lipodystrophy with severe insulin resistance and adult progeria Werner syndrome. *Orphanet J. Rare Dis.* **8**, 106 (2013).
40. V. Butin-Israeli, S. A. Adam, A. Goldman, R. Goldman, Nuclear lamin functions and disease. *Trends Genet.* **28**, 464–471 (2012).
41. L. Li, Y. Du, X. Kong, Z. Li, Z. Jia, J. Cui, J. Gao, G. Wang, K. Xie, Lamin B1 is a novel therapeutic target of betulinic acid in pancreatic cancer. *Clin. Cancer Res.* **19**, 4651–4661 (2013).
42. J. I. de las Heras, E. C. Schirmer, The nuclear envelope and cancer: A diagnostic perspective and historical overview. *Adv. Exp. Med. Biol.* **773**, 5–26 (2014).
43. M. M. Radspieler, M. Schindeldecker, P. Stenzel, S. Försch, K. E. Tagscherer, E. Herpel, M. Hohenfellner, G. Hatiboglu, W. Roth, S. Macher-Goeppinger, Lamin-B1 is a senescence-associated biomarker in clear-cell renal cell carcinoma. *Oncol. Lett.* **18**, 2654–2660 (2019).
44. M. Izdebska, M. Gagat, A. Grzanka, Overexpression of lamin B1 induces mitotic catastrophe in colon cancer LoVo cells and is associated with worse clinical outcomes. *Int. J. Oncol.* **52**, 89–102 (2018).
45. N. Kolas, J. Chapman, S. Nakada, J. Ylanko, R. Chahwan, F. Sweeney, S. Panier, M. Mendez, J. Wildenhain, T. M. Thomson, L. Pelletier, S. P. Jackson, D. Durocher, Orchestration of the DNA-damage response by the RNF8 ubiquitin ligase. *Science* **318**, 1637–1640 (2007).
46. A. J. Hartlerode, Y. Guan, A. Rajendran, K. Ura, G. Schotta, A. Xie, J. V. Shah, R. Scully, Impact of histone H4 lysine 20 methylation on 53BP1 responses to chromosomal double strand breaks. *PLoS ONE* **7**, e49211 (2012).
47. J. Guirouilh-Barbat, E. Rass, I. Plo, P. Bertrand, B. S. Lopez, Defects in XRCC4 and KU80 differentially affect the joining of distal nonhomologous ends. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **104**, 20902–20907 (2007).
48. E. Rass, A. Grabarz, I. Plo, J. Gautier, P. Bertrand, B. S. Lopez, Role of Mre11 in chromosomal nonhomologous end joining in mammalian cells. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **16**, 819–824 (2009).
49. R. Biehs, M. Steinlage, O. Barton, S. Juhász, J. Künzel, J. Spies, A. Shibata, P. A. Jeggo, M. Löbrich, DNA double-strand break resection occurs during non-homologous end joining in G1 but is distinct from resection during homologous recombination. *Mol. Cell* **65**, 671–684.e5 (2017).
50. C. Lemaitre, B. Fischer, A.-S. Kalouisi, A. Hoffbeck, J. Guirouilh-Barbat, O. D. Shahar, D. Genet, M. Goldberg, P. Bertrand, B. Lopez, L. Brino, E. Soutoglou, The nucleoporin 153, a novel factor in double-strand break repair and DNA damage response. *Oncogene* **31**, 4803–4809 (2012).
51. A. N. Malhas, D. J. Vaux, Transcription factor sequestration by nuclear envelope components. *Cell Cycle* **8**, 959–964 (2009).
52. P. Jowsey, N. A. Morrice, C. J. Hastie, H. McLauchlan, R. Toth, J. Rouse, Characterisation of the sites of DNA damage-induced 53BP1 phosphorylation catalysed by ATM and ATR. *DNA Repair* **6**, 1536–1544 (2007).
53. C. Escibano-Diaz, A. Orthwein, A. Fradet-Turcotte, M. Xing, J. Young, J. Tkáč, M. Cook, A. Rosebrock, M. Munro, M. Canny, D. Xu, D. Durocher, A cell cycle-dependent regulatory

anti-53BP1 (mouse, 612522, BD Biosciences) and anti-lamin B1 (rabbit, ab16048, Abcam) or anti-HA.11 (mouse, MMS 101P, Covance) and anti-lamin B1 (rabbit, ab16048, Abcam) or anti-53BP1 (mouse, 612522, BD Biosciences) and anti-Flag (rabbit, F7425, Sigma-Aldrich) or anti-53BP1 (mouse, 612522, BD Biosciences) and anti-lamin A (rabbit, L1293, Sigma-Aldrich) antibodies. PLAs were performed using a Duolink in situ detection kit (Sigma-Aldrich) according to the manufacturer's protocol. For PLA after Flag-Lamin B1 fragment overexpression, analysis was made among populations with similar Flag expression intensity for each Lamin B1 construct. For PLA assays in the 53BP1 KO U2OS cells after expression of WT or 28A mutant 53BP1, nuclei populations of similar level of 53BP1 expression were analyzed. Digital images were acquired with an SPE Leica DMRx2 confocal microscope using a 63 \times objective lens. Images were further processed with the Leica and ImageJ software. To study the localization of the endogenous interactions, PLA dots were acquired on multiple Z-plan on a confocal microscope. Dots were then scored on the focus plane and categorized as being at the membrane (colocalization with lamin staining) or in the nuclear interior, using ImageJ software.

Microscope equipment and acquisition settings

For immunofluorescence assays, the images were acquired using a Leica DM5500B epifluorescence microscope. A Lumen 200-W mercury lamp (Microvision) was used as a light source. The used Leica filters are as follows: A4 excitation filter band-pass (BP), 360/40 nm; long-pass dichroic (LPDC) mirror, 400 nm; emission filter, BP 470/40 nm (#11504162, Leica); L5 excitation filter, BP 480/40 nm; LPDC mirror, 505 nm, emission filter BP 527/30 (#11504166, Leica); TX2 excitation filter BP 560/40 nm, LPDC mirror 595 nm, emission filter BP 645/75 nm (#11504166, Leica). A monochrome CoolSNAP HQ2 14-bit camera with a charge-coupled device sensor pixel size 6.45 \times 6.45 μ m was used. Images were acquired at a magnification of \times 63 oil immersion (numerical aperture: 1.30). The acquired image size was 1344 \times 1024 pixels, with a 14-bit depth, and an x - y dimension of 0.1024 μ m per pixel.

For PLAs, the images were acquired using a Leica SPE laser scanning confocal microscope, equipped with a photomultiplier tube and 405-, 488-, and 532-nm excitation lasers. Commercial software LAS AF (Leica) was used for image acquisition. Image acquisition was performed with a magnification of \times 63 immersion oil (numerical aperture: 1.30). The acquired image size was 512 \times 512 pixels, with a 12-bit depth, and an x - y dimension of 0.227 μ m per pixel. All included images in the figures have a linear gamma (= 1 curve) and their display ranges have been equally rescaled.

Digital microscopy image analyses

Raw data images acquired with linear and full display range were iteratively deconvolved using the Wiener filter preconditioned Landweber method (parallel iterative 2D deconvolution plugin v1.9 with ImageJ software) for deblurring. All digital images, except for 53BP1 foci formation after lamin B1 fragment overexpression and PLA assays in 53BP1 KO U2OS cells, were processed in batch with the CellProfiler software. The segmentation of each structure of interest (i.e., nuclei, foci, and PLA dots) was based on an adaptive labeling-dependent threshold. The consistency of the automatic segmentation was controlled visually on the original images supplemented with the outlines of identified objects. Measurement data for each object were collected by CellProfiler during the pipeline

run and then further analyzed using the KNIME analytics platform for calculation of per nuclei parameters. 53BP1 foci formation after lamin B1 fragment overexpression and PLA assays in 53BP1 KO U2OS cells after expression of WT or 28A mutant 53BP1 were analyzed with ImageJ software. After nuclei segmentation on DAPI counterstaining, foci or PLA dots were counted as local maxima, respectively, on the 53BP1 or PLA field and matched to the intensity of, respectively, lamin B1 fragment expression or 53BP1 expression for the analyzed nuclei. Nuclei were classified according to their lamin B1 fragment or 53BP1 intensity as compared to the maximal background intensity of nonoverexpressing nuclei measured on empty vector-transfected cells. For the 53BP1 foci, two classes with similar expression intensity for each lamin B1 construct were defined: low- or moderate-expressing cells, corresponding respectively to two- to fourfold or four to sixfold expression over the maximum background intensity. For PLA dots, populations with similar expression of LMNB1 fragment or 53BP1 were compared.

Statistical analysis

Statistical analyses [unpaired t test, multiple t test, two-tailed Mann-Whitney test, one-way analysis of variance (ANOVA)] were performed using GraphPad Prism 7.0 (GraphPad Software Inc.).

SUPPLEMENTARY MATERIALS

Supplementary material for this article is available at <http://advances.sciencemag.org/cgi/content/full/7/35/eabb3799/DC1>

[View/request a protocol for this paper from Bio-protocol.](#)

REFERENCES AND NOTES

1. M. Lieber, The mechanism of double-strand DNA break repair by the nonhomologous DNA end-joining pathway. *Annu. Rev. Biochem.* **79**, 181–211 (2010).
2. J. Guirouilh-Barbat, S. Huck, P. Bertrand, L. Pirzio, C. Desmaze, L. Sabatier, B. S. Lopez, Impact of the KU80 pathway on NHEJ-induced genome rearrangements in mammalian cells. *Mol. Cell* **14**, 611–623 (2004).
3. S. F. Bunting, A. Nussenzweig, End-joining, translocations and cancer. *Nat. Rev. Cancer* **13**, 443–454 (2013).
4. M. Betermier, P. Bertrand, B. Lopez, Is non-homologous end-joining really an inherently error-prone process? *PLoS Genet.* **10**, e1004086 (2014).
5. A. J. Holland, D. W. Cleveland, Chromoanagenesis and cancer: Mechanisms and consequences of localized, complex chromosomal rearrangements. *Nat. Med.* **18**, 1630–1638 (2012).
6. S. M. Noordermeer, S. Adam, D. Setiawati, M. Barazas, S. J. Pettitt, A. K. Ling, M. Olivieri, A. Álvarez-Quilón, N. Moatti, M. Zimmermann, S. Annunziato, D. B. Krastev, F. Song, I. Brandsma, J. Frankum, R. Brough, A. Sherker, S. Landry, R. K. Szilard, M. M. Munro, A. McEwan, T. Goullet de Rugy, Z.-Y. Lin, T. Hart, J. Moffat, A.-C. Gingras, A. Martin, H. van Attikum, J. Jonkers, C. J. Lord, S. Rottenberg, D. Durocher, The shieldin complex mediates 53BP1-dependent DNA repair. *Nature* **560**, 117–121 (2018).
7. H. Dev, T.-W. W. Chiang, C. Lescale, I. de Krijger, A. G. Martin, D. Pilger, J. Coates, M. Sczaniecka-Clift, W. Wei, M. Ostermaier, M. Herzog, J. Lam, A. Shea, M. Demir, Q. Wu, F. Yang, B. Fu, Z. Lai, G. Balmus, R. Belotserkovskaya, V. Serra, M. J. O'Connor, A. Bruna, P. Beli, L. Pellegrini, C. Caldas, L. Deriano, J. J. L. Jacobs, Y. Galanty, S. P. Jackson, Shieldin complex promotes DNA end-joining and counters homologous recombination in BRCA1-null cells. *Nat. Cell Biol.* **20**, 954–965 (2018).
8. S. Findlay, J. Heath, V. M. Luo, A. Malina, T. Morin, Y. Coulombe, B. Djerir, Z. Li, A. Samiei, E. Simo-Cheyou, M. Karam, H. Bagci, D. Rahat, D. Grapton, E. G. Lavoie, C. Dove, H. Khaled, H. Kuasne, K. K. Mann, K. O. Klein, C. M. Greenwood, Y. Tabach, M. Park, J.-F. Côté, J.-Y. Masson, A. Maréchal, A. Orthwein, SHLD2/FAM35A co-operates with REV7 to coordinate DNA double-strand break repair pathway choice. *EMBO J.* **37**, e100158 (2018).
9. Z. Mirman, F. Lottersberger, H. Takai, T. Kibe, Y. Gong, K. Takai, A. Bianchi, M. Zimmermann, D. Durocher, T. de Lange, 53BP1-RIF1-shieldin counteracts DSB resection through CST- and Pol α -dependent fill-in. *Nature* **560**, 112–116 (2018).
10. H. Ghezraoui, C. Oliveira, J. R. Becker, K. Bilham, D. Moralli, C. Anzilotti, R. Fischer, M. Deobagkar-Lele, M. Sanchez-Calvo, E. Fueyo-Marcos, S. Bonham, B. M. Kessler, S. Rottenberg, R. J. Cornall, C. M. Green, J. R. Chapman, 53BP1 cooperation with the REV7-shieldin complex underpins DNA structure-specific NHEJ. *Nature* **560**, 122–127 (2018).

- circuit composed of 53BP1-RIF1 and BRCA1-CtIP controls DNA repair pathway choice. *Mol. Cell* **49**, 872–883 (2013).
54. M. V. Botuyan, J. Lee, I. M. Ward, J.-E. Kim, J. Thompson, J. Chen, G. Mer, Structural basis for the methylation state-specific recognition of histone H4-K20 by 53BP1 and Crb2 in DNA repair. *Cell* **127**, 1361–1373 (2006).
 55. A. Fradet-Turcotte, M. D. Canny, C. Escobedo-Diaz, A. Orthwein, C. Y. Leung, H. Huang, M.-C. Landry, J. Kitevski-LeBlanc, S. M. Noordermeer, F. Sicheri, D. Durocher, 53BP1 is a reader of the DNA-damage-induced H2A Lys 15 ubiquitin mark. *Nature* **499**, 50–54 (2013).
 56. M. D. Wilson, S. Benlekber, A. Fradet-Turcotte, A. Sherker, J.-P. Julien, A. McEwan, S. M. Noordermeer, F. Sicheri, J. L. Rubinstein, D. Durocher, The structural basis of modified nucleosome recognition by 53BP1. *Nature* **536**, 100–103 (2016).
 57. F. A. Mallette, F. Mattioli, G. Cui, L. C. Young, M. J. Hendzel, G. Mer, T. K. Sixma, S. Richard, RNF8- and RNF168-dependent degradation of KDM4A/JMJD2A triggers 53BP1 recruitment to DNA damage sites. *EMBO J.* **31**, 1865–1878 (2012).
 58. K. ACS, M. Luijsterburg, L. Ackermann, F. Salomons, T. Hoppe, N. Dantama, The AAA-ATPase VCP/p97 promotes 53BP1 recruitment by removing L3MBTL1 from DNA double-strand breaks. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **18**, 1345–1350 (2011).
 59. M. Meerang, D. Ritz, S. Paliwal, Z. Garajova, M. Bosshard, N. Mailand, P. Janscak, U. Hubscher, H. Meyer, K. Ramadan, The ubiquitin-selective segregase VCP/p97 orchestrates the response to DNA double-strand breaks. *Nat. Cell Biol.* **13**, 1376–1382 (2011).
 60. A. Zhang, B. Peng, P. Huang, J. Chen, Z. Gong, The p53-binding protein 1-Tudor-interacting repair regulator complex participates in the DNA damage response. *J. Biol. Chem.* **292**, 6461–6467 (2017).
 61. P. Drané, M.-E. Brault, G. Cui, K. Meghani, S. Chaubey, A. Detappe, N. Parnandi, Y. He, X.-F. Zheng, M. V. Botuyan, A. Kalousi, W. T. Yewdell, C. Münch, J. W. Harper, J. Chaudhuri, E. Soutoglou, G. Mer, D. Chowdhury, TIRF regulates 53BP1 by masking its histone methyl-lysine binding function. *Nature* **543**, 211–216 (2017).
 62. N. S. Moreno, J. Liu, K. M. Haas, L. L. Parker, C. Chakraborty, S. J. Kron, K. Hodges, L. D. Miller, C. Langefeld, P. J. Robinson, S. A. Lelièvre, P.-A. Vidi, The nuclear structural protein NuMA is a negative regulator of 53BP1 in DNA double-strand break repair. *Nucleic Acids Res.* **47**, 10475 (2019).
 63. N. Parnandi, V. Rendo, G. Cui, M. V. Botuyan, M. Remisova, H. Nguyen, P. Drané, R. Beroukhim, M. Altmeyer, G. Mer, D. Chowdhury, TIRF inhibits the 53BP1-p53 complex to alter cell-fate programs. *Mol. Cell* **81**, 2583–2595.e6 (2021).
 64. S. Kilić, A. Lezaja, M. Gatti, E. Bianco, J. Michelen, R. Imhof, M. Altmeyer, Phase separation of 53BP1 determines liquid-like behavior of DNA repair compartments. *EMBO J.* **38**, e101379 (2019).
 65. F. Pessina, F. Giavazzi, Y. Yin, U. Gioia, V. Vitelli, A. Galbiati, S. Barozzi, M. Garre, A. Oldani, A. Flaus, R. Cerbino, D. Parazzoli, E. Rothenberg, F. d'Adda di Fagnagna, Functional transcription promoters at DNA double-strand breaks mediate RNA-driven phase separation of damage-response factors. *Nat. Cell Biol.* **21**, 1286–1299 (2019).
 66. I. Ghodke, M. Remisova, A. Furst, S. Kilić, B. Reina-San-Martin, A. R. Poetsch, M. Altmeyer, E. Soutoglou, AHNAC controls 53BP1-mediated p53 response by restraining 53BP1 oligomerization and phase separation. *Mol. Cell* **81**, 2596–2610.e7 (2021).
 67. L. A. Murray-Nerger, J. L. Justice, P. Rekapalli, J. E. Hutton, I. M. Cristea, Lamin B1 acetylation slows the G1 to S cell cycle transition through inhibition of DNA repair. *Nucleic Acids Res.* **49**, 2044–2064 (2021).
 68. S. Willaume, E. Rass, P. Fontanilla-Ramirez, A. Moussa, P. Wanschoor, P. Bertrand, A link between replicative stress, lamin proteins, and inflammation. *Genes* **12**, 552 (2021).
 69. R. Mahen, H. Hattori, M. Lee, P. Sharma, A. D. Jayasekharan, A. R. Venkataraman, A-type lamins maintain the positional stability of DNA damage repair foci in mammalian nuclei. *PLoS ONE* **8**, e61893 (2013).
 70. P. Scaffidi, T. Misteli, Reversal of the cellular phenotype in the premature aging disease Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Nat. Med.* **11**, 440–445 (2005).
 71. I. Gonzalez-Suarez, A. B. Redwood, D. A. Grotzky, M. A. Neumann, E. H. Cheng, C. L. Stewart, A. Dusso, S. Gonzalo, A new pathway that regulates 53BP1 stability implicates Cathepsin L and vitamin D in DNA repair. *EMBO J.* **30**, 3383–3396 (2011).
 72. D. Busso, B. Delagoutte-Busso, D. Moras, Construction of a set Gateway-based destination vectors for high-throughput cloning and expression screening in *Escherichia coli*. *Anal. Biochem.* **343**, 313–321 (2005).
 73. E. Delbarre, M. Tramier, M. Coppey-Moisán, C. Gaillard, J.-C. Courvalin, B. Buendia, The truncated prelamin A in Hutchinson-Gilford progeria syndrome alters segregation of A-type and B-type lamin homopolymers. *Hum. Mol. Genet.* **15**, 1113–1122 (2006).

Acknowledgments: We acknowledge K. Dubrana, S. Marcand, E. Soler, F. Boussin, and B. Lopez for helpful discussions and comments on the manuscript. We thank D. Durocher for providing the 53BP1-deficient U2OS cell line. The manuscript was edited by American Journal Experts. **Funding:** This work was supported by the Ligue Nationale Contre le Cancer (Ile de France committee), Association for Research against Cancer (Fondation ARC) number of grant if required (ARCPJA32020070002430), AT Europe Association, Radiobiology program CEA grant, EDF grant, AFM-Téléthon grant number of grant if required : (n 21566), INCA grant, and INSERM house funding (SGCSR unit). L.E. was supported by a Ligue Nationale Contre le Cancer fellowship (Haut-de-Seine committee) and by INSERM. A.M. is recipient of a CEA DSV IRTÉLIS international fellowship and of a Fondation ARC fellowship. D.G. was a recipient of a CEA DSV IRTÉLIS international fellowship and of a Fondation ARC fellowship. E.R. was recipient of a Fondation pour la Recherche Médicale fellowship. S.W. is recipient of CEA DRF "Phare" fellowship and of a Fondation ARC fellowship. P.W. is recipient of a Ligue Nationale Contre le Cancer fellowship. J.P. is recipient of a PhD fellowship from University Paris Saclay (ED CBM5). **Author contributions:** P.B. and E.R. wrote the paper. L.E., D.G., A.M., E.R., G.P., and P.B. conceived the experiments. L.E., D.G., A.M., E.R., and G.P. developed most of the experiments. S.W., C.C.-O., P.W., and J.P. performed some experiments. B.T. developed several in-house scripts for imaging analysis and performed some experiments. A.B. performed initial DSB repair experiment. J.D. and X.V. performed GST pull-down assay. E.D. and D.B. constructed the vectors expressing different 53BP1 and lamin B1 domains. L.I., T.K., and A.C. helped with live laser microirradiation experiments. C.L.C. assisted for the development of several in-house scripts in Metamorph software. S.Z.-J. for helpful discussions and especially for design of truncated lamin B1 constructions/proteins. R.S. provided its expertise and biological reagents. **Competing interests:** The authors declare that they have no competing interests. **Data and materials availability:** All data needed to evaluate the conclusions in the paper are present in the paper and/or the Supplementary Materials.

Submitted 9 March 2020

Accepted 7 July 2021

Published 27 August 2021

10.1126/sciadv.abb3799

Citation: L. Etourneau, A. Moussa, E. Rass, D. Genet, S. Willaume, C. Chabance-Okumura, P. Wanschoor, J. Picotto, B. Thézé, J. Dépaigne, X. Veaute, E. Dizez, D. Busso, A. Barascu, L. Irabah, T. Kortulewski, A. Campalans, C. Le Chalony, S. Zinn-Justin, R. Scully, G. Pennarun, P. Bertrand, Lamin B1 sequesters 53BP1 to control its recruitment to DNA damage. *Sci. Adv.* **7**, eabb3799 (2021).

Supplementary Materials for

Lamin B1 sequesters 53BP1 to control its recruitment to DNA damage

Laure Etourneau, Angela Moussa, Emilie Rass, Diane Genet, Simon Willaume,
Caroline Chabance-Okumura, Paul Wanschoor, Julien Picotto, Benoît Thézé, Jordane Dépagne,
Xavier Veaute, Eléa Dizet, Didier Busso, Aurélia Barascu, Lamya Irbah, Thierry Kortulewski,
Anna Campalans, Catherine Le Chalony, Sophie Zinn-Justin,
Ralph Scully, Gaëlle Pennarun, Pascale Bertrand*

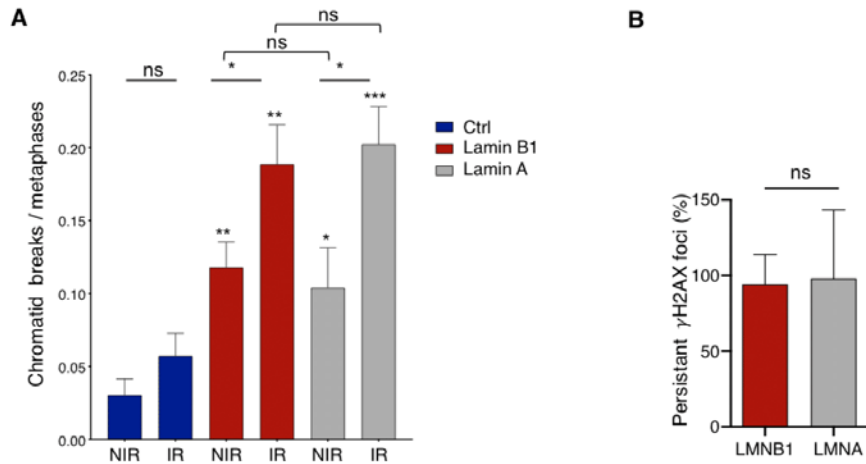
*Corresponding author. Email: pascale.bertrand@cea.fr

Published 27 August 2021, *Sci. Adv.* 7, eabb3799 (2021)
DOI: [10.1126/sciadv.abb3799](https://doi.org/10.1126/sciadv.abb3799)

This PDF file includes:

Figs. S1 to S9
Tables S1 and S2

SUPPLEMENTARY FIGURES

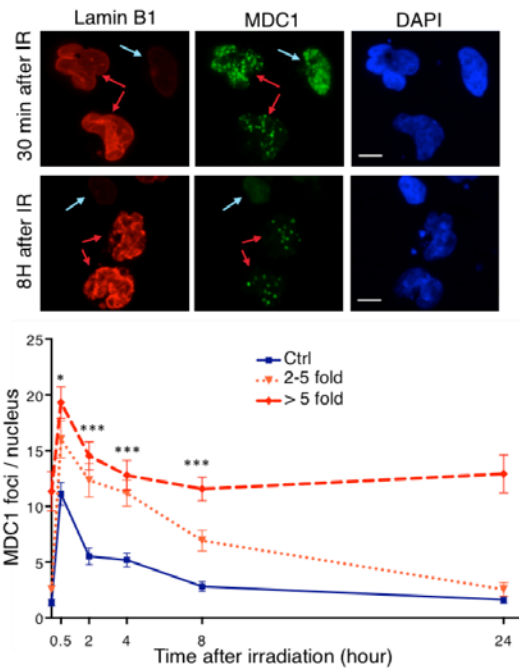


Supplementary Figure 1: Impact of lamin A overexpression on DNA damage persistence

A. Chromosomal aberrations were scored in metaphase spreads prepared from Lamin B1 or Lamin A expressing cells or control cells, under basal conditions (NI) or irradiation (2 Gy) 24 hours prior to cell harvest. Histogram shows the mean number of chromatid breaks scored per metaphase (n=202 to 420). P value above bar compare to matching NIR or IR "Ctrl: empty vector" data sets.

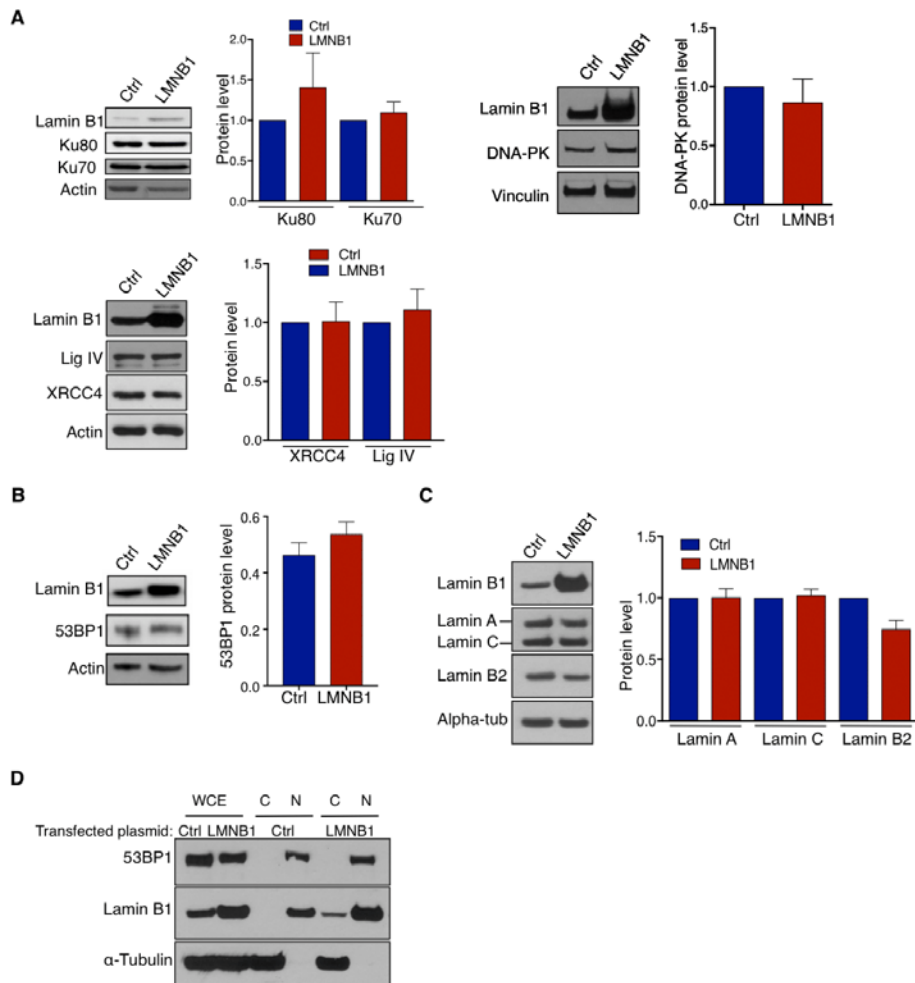
B. Analysis of persistent γ H2AX foci kinetics after expression of the lamin A. γ H2AX foci were counted in Lamin B1 and Lamin A overexpressing cells using ImageJ software and plotted for cells with similar fold increase in expression level. Histograms show the percentage of radioinduced foci persisting 3 hours after irradiation (0.5 Gy) from 3 to 4 independent experiments.

Error bars: s.e.m. Unpaired t-test p values *p<0.05; **p<0.005; ***p<0.0001.



Supplementary Figure 2: Impact of lamin B1 overexpression on MDC1 foci

Analysis of MDC1 foci kinetic after irradiation. SV40 fibroblasts were transfected with either the empty vector (Ctrl) or the lamin B1 vector (LMNB1) and were incubated for 48h. Then, cells were irradiated (2Gy) and fixed at different time after irradiation. Cells were then immunolabelled with MDC1 and lamin B1 antibodies for immunofluorescence (upper panel). MDC1 foci were counted and statistical analyses were performed using an unpaired t-test (bottom panel). White line: scale Bar = 10 μ m. Cells overexpressing lamin B1 were divided in two categories, those with moderate overexpression (up to 5 fold compared to wild type) and those with higher overexpression (more than 5 fold). The antibody used was the anti-MDC1 (Rabbit, ab11169, Abcam).



Supplementary Figure 3:

A. Impact of lamin B1 overexpression on NHEJ proteins. SV40 fibroblasts were transfected with either the empty vector (Ctrl) or lamin B1 vector (LMNB1). At 48h after transfection, Lamin B1, Ku70 and Ku80, DNAPK, Ligase IV and XRCC4 protein levels were measured by western blot. The antibodies used for this experiment were the following: anti-Ku70 (Rabbit, MS329P1, Neomarkers), anti-Ku80 (Rabbit, #2180, Cell Signaling), anti-DNAPK (Mouse, #12311, Cell Signaling), anti-XRCC4 (Rabbit, 5606, Santa-Cruz), and anti-ligase IV (Rabbit, ab80514, Abcam). The Y axis represents the level protein of interest corrected to the protein level of Actin.

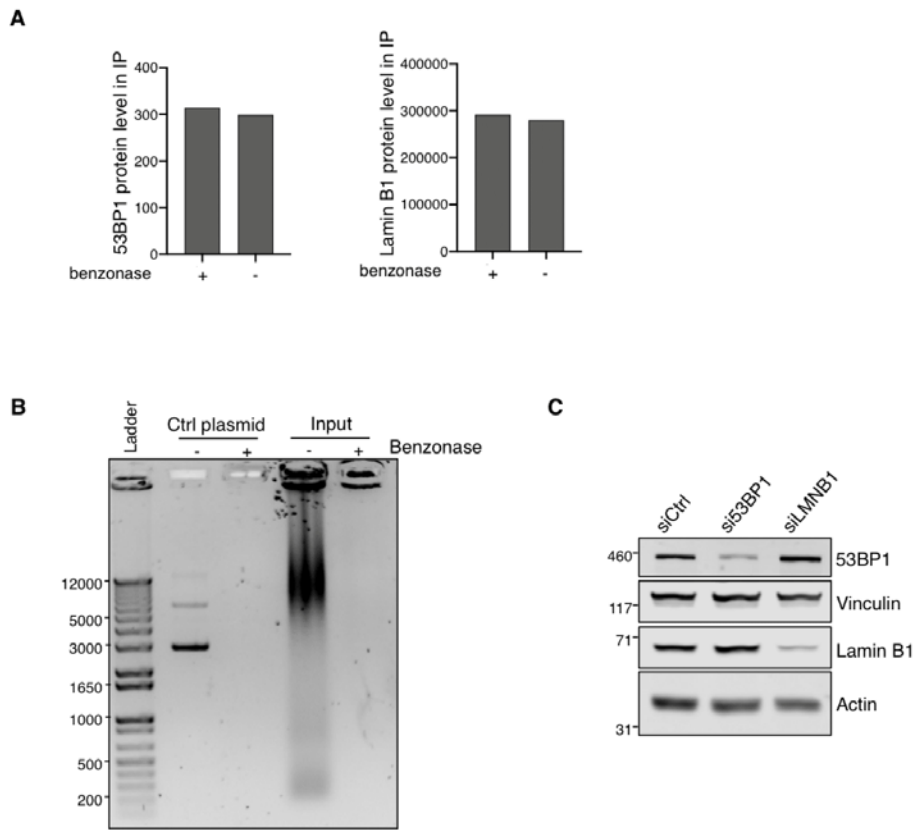
B. Impact of lamin B1 overexpression on 53BP1 protein level. SV40 fibroblasts were transfected with either the empty vector (Ctrl) or the lamin B1 vector (LMNB1). 53BP1 protein level was measured by western blotting using antibody anti-53BP1 (Rabbit, #4937S, Cell Signaling). The Y axis represents the protein level of 53BP1 corrected to the protein level of Actin.

C. Impact of lamin B1 overexpression on lamin A, C and B2 protein level. SV40 fibroblasts were transfected with either the empty vector (Ctrl) or the lamin B1 vector (LMNB1). 48 hours after transfection,

protein levels were measured by western blotting. The antibodies used for these experiments were lamin A/C antibody (Cell Signaling 4777, clone 4C11), lamin B2 antibody (Abcam 8983), lamin B1 antibody (Abcam 16048) and Alpha-tubulin antibody (Sigma-Aldrich T9026). The Y axis represents the level protein of interest corrected to the protein level of Alpha-tubulin.

For A, B and C, Western blots were quantified with *ImageJ* or Image Studio Lite software. Statistical t-test shows no significant difference between lamin B1 overexpressing cells and Ctrl cells.

D. Impact of lamin B1 overexpression on 53BP1 nuclear localization. Cellular fractionation showing no defect in 53BP1 nuclear import following lamin B1-overexpression. SV40-fibroblasts were transfected with lamin B1 (LMNB1) or control vectors (Ctrl) and 48h after transfection, cells were harvested for cellular fractionation; Cytosolic, soluble nuclear, and whole-cell extracts (C, N and WCE, respectively) were subjected to immunoblot and probed with indicated antibodies.

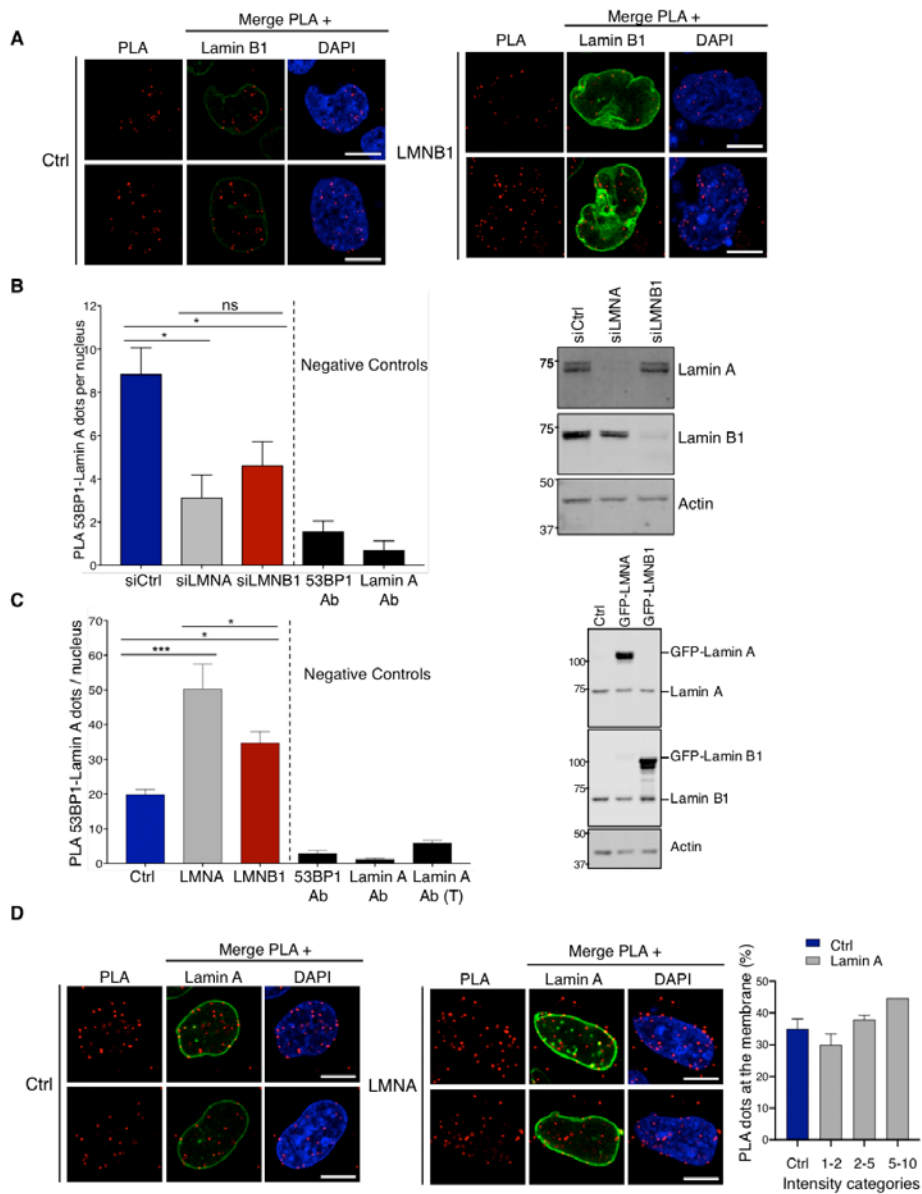


Supplementary Figure 4:

A. Quantification from the co-immunoprecipitation of endogenous lamin B1 and 53BP1 with or without pre-treatment with benzonase shown in figure 3A. Co-immunoprecipitated proteins were revealed with mouse anti-53BP1 (left panel) and rabbit anti-lamin B1 antibodies (right panel).

B. Control for the benzonase treatment. Untreated (-) and benzonase treated (+) input extract for coimmunoprecipitation or control plasmid were run on ethidium bromide stained agarose gel to reveal the efficacy of the digest.

C. Depletion level of si53BP1 and siLMNB1. SV40 fibroblasts were transfected with siCtrl, si53BP1 or siLMNB1. Depletion level of 53BP1 and lamin B1 were revealed by western blot, 48h after transfection. The antibodies used for this experiment were 53BP1 antibody (mouse, 612522, BD Biosciences), lamin B1 antibody (rabbit, ab16048, Abcam), actin antibody (rabbit, A2066, Sigma-Aldrich).



Supplementary Figure 5:

A. Representative images from quantification of PLA dots shown in figure 3D for *In situ* localisation of the interaction between 53BP1 and lamin B1. Cells transfected with empty vector (Ctrl, left panel) or with lamin B1-expressing vector (LMNB1, right panel) were subjected to PLA using anti-53BP1 and lamin B1 antibodies.

B. Impact of lamin B1 depletion on 53BP1-lamin A interaction (left panel). For depletion, PLA between lamin A and 53BP1 were performed after siCtrl, siLMNA/C or siLMNB1. Negative controls used are single

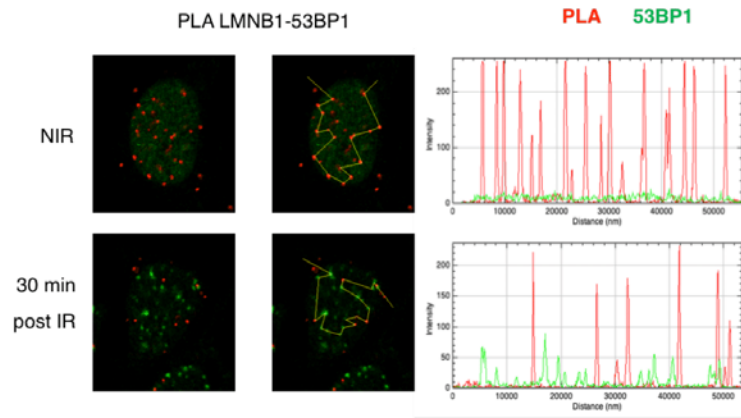
antibody against 53BP1 (53BP1 Ab) or Lamin A (Lamin A Ab) or single antibody against Lamin A after transfection of LMNA vector (Lamin A Ab T). Depletion level of siLMNA/C and siLMNB1 (right panel). SV40 fibroblasts were transfected with siCtrl, siLMNA/C or siLMNB1. Depletion level of lamin A and lamin B1 were revealed by western blot, 48h after transfection. The antibodies used for this experiment were lamin A antibody (mouse, ab8980, Abcam), lamin B1 antibody (rabbit, ab16048, Abcam), actin antibody (rabbit, A2066, Sigma-Aldrich).

C. Impact of lamin B1 overexpression on 53BP1-laminA interaction (left panel) PLA between lamin A and 53BP1 were performed after Ctrl, GFP-LMNA or GFP-LMNB1 expression. PLA spots were quantified in cells with comparable GFP intensity. Expression of GFP-LMNA and GFP-LMNB1 (right panel). SV40 fibroblasts were transfected with GFP-lamin A or GFP-lamin B1. 48 hours after transfection, lamin A and B1 expression level were revealed by western blot. The antibodies used for this experiment were lamin A antibody (mouse, ab8980, Abcam) and lamin B1 antibody (rabbit, ab16048, Abcam), actin antibody (rabbit, A2066, Sigma-Aldrich).

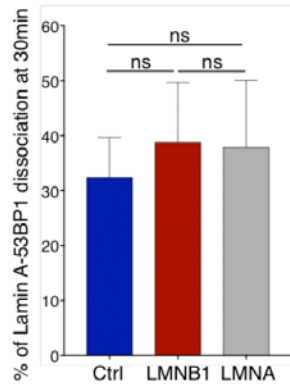
D. In situ localisation of the interaction between 53BP1 and lamin A. Representative image of cells transfected with empty vector (Ctrl, left panel) or with lamin A-expressing vector (LMNA, middle panel) were subjected to PLA using anti-53BP1 and lamin A antibodies. Level of Lamin A overexpression was categorized in 3 class as a fold increase compared to endogenous level : 1 to 2 fold, 2 to 5 fold or 5 to 10 fold (respectively Intensity categories: 1-2, 2-5 or 5-10). Right panel: PLA dots at the nuclear membrane or in the nucleus interior were counted and expressed as a percentage of total PLA dots per cells from 2 independent experiments (except 5-10 Intensity categorie, n=1).

For B and C, the mean values correspond to at least 3 independent experiments. Error bars : s.e.m. One-way ANOVA test: *p<0.05; ***p<0.0001.

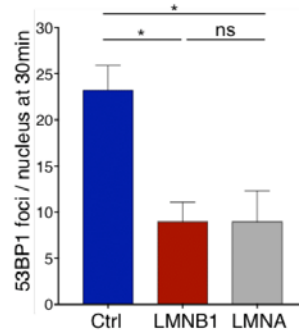
A



B



C



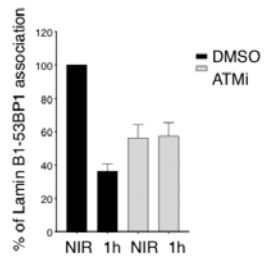
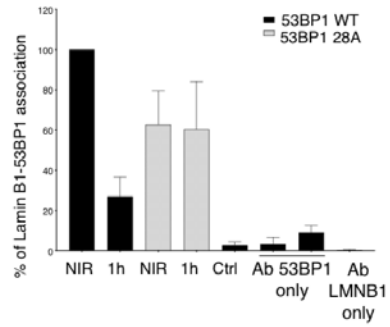
Supplementary Figure 6:

A. Representative analysis for the absence of co-localization between PLA dots (Lamin B1-53BP1) and 53BP1 foci before irradiation (NIR, top Panel) or 30 min following 2Gy irradiation (IR, bottom panel). Confocal images of PLA (red) and 53BP1 (green) staining were analysed with ImageJ plotting corresponding intensity along a line drawn between dots and/or foci (peaks on histograms) on the merge images (yellow line).

B. Impact of lamin B1 or lamin A overexpression on dissociation of the lamin A-53BP1 interaction after DNA damages. Percentage of remaining PLA dots remaining at 30 min after irradiation (2 Gy) were analysed after Ctrl, GFP-LMNA or GFP-LMNB1 expression. PLA spots were quantified in cells with comparable GFP intensity.

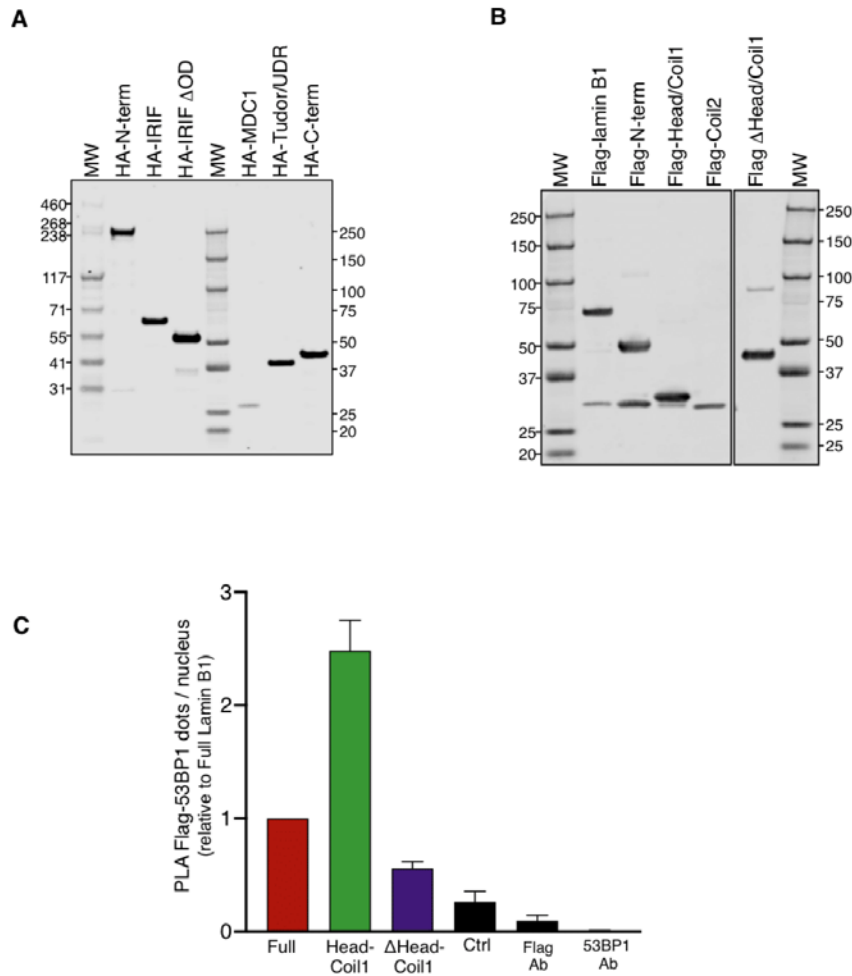
C. Impact of lamin A overexpression on 53BP1 foci formation. 48 H after transfection with either the empty vector (Ctrl), GFP-lamin B1 (LMNB1) or GFP-lamin A (LMNA) expressing vector, SV40 fibroblasts are irradiated (2 Gy). 53BP1 foci formation at 30 minutes post-radiation are counted with *Metamorph* software in cells with equivalent GFP expression. PLA spots were quantified in cells with comparable GFP intensity.

For B and C, the mean values correspond to at least 3 independent experiments and the error bars correspond to s.e.m. One-way ANOVA test: * $p < 0.05$.

A**B****Supplementary Figure 7:**

A. Alternative representation for figure 3F. Co-immunoprecipitation measured of the Lamin B1-53BP1 dissociation were plotted on histograms as relative the condition DMSO NIR.

B. Alternative representation for figure 3G. Histograms represent the percentage of dissociation as measured by PLA dots, relative to the 53BP1 WT NIR condition.

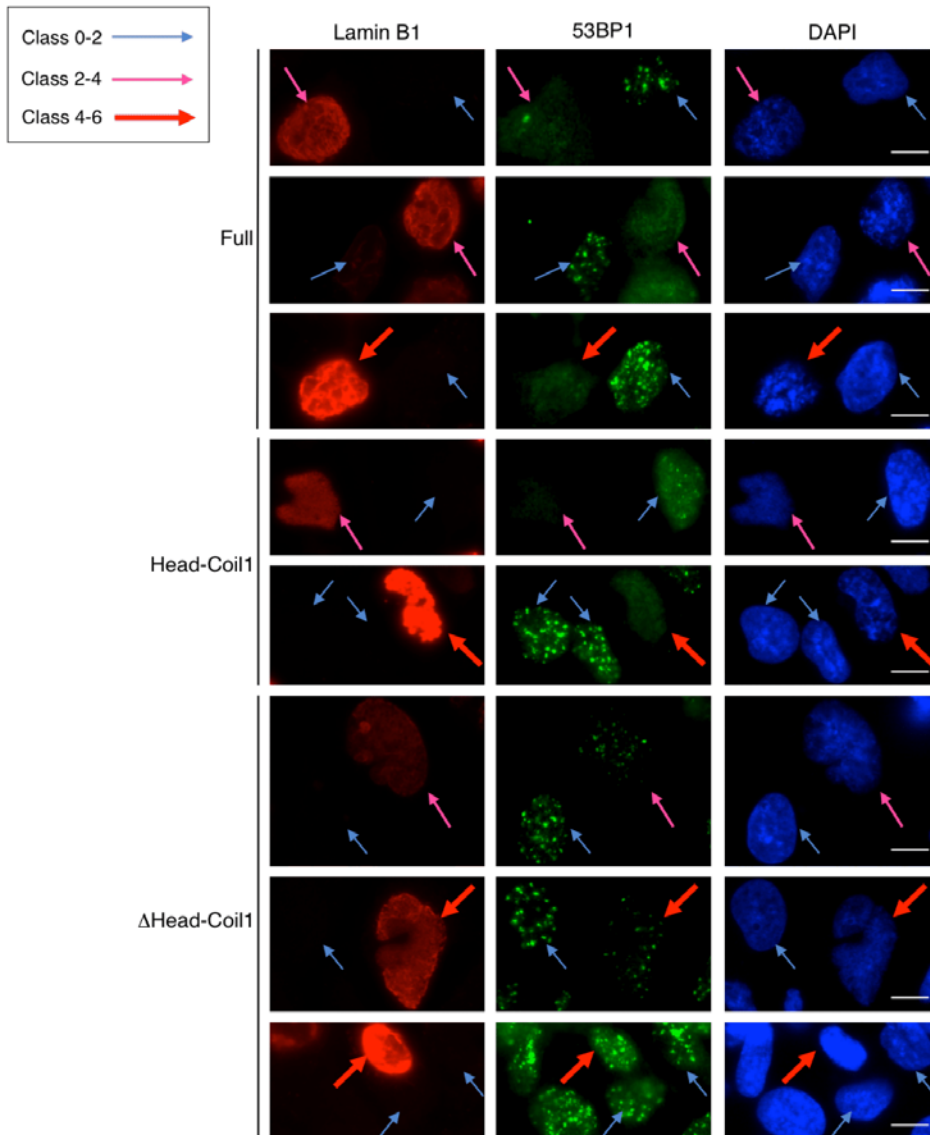


Supplementary Figure 8: Expression of 53BP1 and lamin B1 fragments.

A. Expression of 53BP1 fragments. SV40 fibroblasts were transfected with HA-53BP1 vectors and revealed by western blot. The antibody used for this experiment was HA.11 antibody (mouse, MMS 101P, Covance).

B. Expression of lamin B1 fragments. SV40 fibroblasts were transfected with Flag-lamin B1 vectors and revealed by western blot. The antibody used for this experiment was Flag antibody (rabbit, F7425, Sigma).

C. PLA between endogenous 53BP1 and Flag-lamin B1 constructs: PLA spots were counted in Flag-expressing cells using ImageJ software from cells with similar Flag-expression in 2 independent experiments.



Supplementary Fig 9: Representative images of radio-induced 53BP1 foci after expression of Flag-lamin B1 fragments

SV40-fibroblasts were transfected with either the empty vector, Flag-lamin B1 vector, Flag-Head-Coil1 vector or Flag- Δ Head-Coil1 vector. At 48 hours after transfection, cells were irradiated (2 Gy) and fixed at 30 minutes post-irradiation. Cells were immunostained with 53BP1 and Flag antibodies for immunofluorescence. Cells expressing the Flag-lamin B1 fragments were classified into three classes (0-2, 2-4 and 4-6) according to the Flag-expression level of the nuclei as compared to the maximal background staining of the Flag antibody in non-transfected cells. White line: scale Bar = 10 μ m.

SUPPLEMENTARY TABLES

Supplementary Table 1: Oligonucleotides used for amplifying the different ORFs

Name	Orientation	Sequence (5' → 3')
G1	F	GGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTC GGAAAACCTGPA TTTTCAGGGC
Hs53BP1_F1	F	GAAAACCTGTATTTTCAGGGCGC CCC GGGAG ACCCTACTGGAA GT CAGTTG
Hs53BP1_R1	R	GGGACCACCTTTGTACAAGAAAGCTGGGT CCTCGAGTTA TCCCTGGCTATGGAGC
Hs53BP1_F2	F	GAAAACCTGTATTTTCAGGGCGC CCC GGG GAAGAGAGTTT GTAT ATGGCTC
Hs53BP1_R2	R	GGGACCACCTTTGTACAAGAAAGCTGGGT CCTCGAGTT AGG CCAGGAGCA TT TCCTG
Hs53BP1_F3	F	GAAAACCTGTATTTTCAGGGCGC CCC GGG ATCCATGGGAGTCTCTCAG
Hs53BP1_R3	R	GGGACCACCTTTGTACAAGAAAGCTGGGT CCTCGAGTT AGT GAGAAACATAATCGTGT TTAT ATTTTG
Hs53BP1_F4	F	GAAAACCTGTATTTTCAGGGCGC CCC GGG ATCCCTTCCACAGACTGG
Hs53BP1_R4	R	GGGACCACCTTTGTACAAGAAAGCTGGGT CCTCGAGTC AGG CCAGGAGCA TT TCCTG
Hs53BP1_F5	F	GAAAACCTGTATTTTCAGGGCGC CCC GGG AGGAAACAGGAAACAGCTG
Hs53BP1_R5	R	GGGACCACCTTTGTACAAGAAAGCTGGGT CCTCGAGTCA AG TGGTCCGAGAAAGTG
HsLaminB1_F1	F	GAAAACCTGTATTTTCAGGGC CATATGGCCGACTGGGACC
HsLaminB1_R1	R	GGGACCACCTTTGTACAAGAAAGCTGGGT CGGATCC TACATA ATTTCACAGCTTCTATTTG
HsLaminB1_F2	F	GAAAACCTGTATTTTCAGGGC GCGGCCGCGGCACTGGCACCCC
HsLaminB1_R2	R	GGGACCACCTTTGTACAAGAAAGCTGGGT CGTACCTCATGATTC TTCCACAT CAACCC
HsLaminB1_R3	R	TGATTCTTCCACATCAACCTCTTCCGCTTCCCTAGTGTACG GCCAGCTTGTACTCATACTC
HsLaminB1_F4	F	GAAAACCTGTATTTTCAGGGC GCGGCCGCGATT AACGAG CCAGGAGGAGC
HsLaminB1_F5	F	CAAGGACGACGATGACAAG GCGGCCGCGAAGCCTT CATGAGAT GAG
HsLaminB1_R5	R	GTTTAACTTAAGTTGGTACCC CCCGGATCCCGTTACATA ATTGGACAG CTTCTATTTG

Oligonucleotides are used as indicated in Material and Methods. The annealing sequence is underlined. *Bam*HI (GGATCC), *Nde*I (CATATG), *Not*I (GCGGCCGC), *Xho*I (CTCGAG) and *Xma*I (CCCGGG) restriction sites are bolded.

Supplementary Table 2: Oligonucleotides used for sequencing

Name	Orientation	Sequence (5'-3')
pcDNA3.1-FP	F	CTCTGGCTACTAGAGAAC
pcDNA3.1-RP/1	R	CAAAACAACAGATGGCTGGC
pDONOR-FP	F	TAACGCTAGCATGGATCT
pDONOR-RP	R	GCAATGTAACATCAGAGAT

Bibliographie

- Aguilera, A., García-Muse, T., 2013. Causes of Genome Instability. *Annu. Rev. Genet.* 47, 1–32. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-111212-133232>
- Albelazi, Martin, Mohammed, Mutti, Elder, 2019a. The Biochemical Role of the Human NEIL1 and NEIL3 DNA Glycosylases on Model DNA Replication Forks. *Genes* 10, 315. <https://doi.org/10.3390/genes10040315>
- Albelazi, Martin, Mohammed, Mutti, Elder, 2019b. The Biochemical Role of the Human NEIL1 and NEIL3 DNA Glycosylases on Model DNA Replication Forks. *Genes* 10, 315. <https://doi.org/10.3390/genes10040315>
- Aller, P., Rould, M.A., Hogg, M., Wallace, S.S., Doublé, S., 2007. A structural rationale for stalling of a replicative DNA polymerase at the most common oxidative thymine lesion, thymine glycol. *PNAS* 104, 814–818. <https://doi.org/10.1073/pnas.0606648104>
- Almine, J.F., O’Hare, C.A.J., Dunphy, G., Haga, I.R., Naik, R.J., Atrih, A., Connolly, D.J., Taylor, J., Kelsall, I.R., Bowie, A.G., Beard, P.M., Unterholzner, L., 2017. IFI16 and cGAS cooperate in the activation of STING during DNA sensing in human keratinocytes. *Nat Commun* 8, 14392. <https://doi.org/10.1038/ncomms14392>
- Amouzegar, A., Chelvanambi, M., Filderman, J.N., Storkus, W.J., Luke, J.J., 2021. STING Agonists as Cancer Therapeutics. *Cancers* 13, 2695. <https://doi.org/10.3390/cancers13112695>
- Anglana, M., Bensimon, A., Debatisse, M., 2003. Dynamics of DNA Replication in Mammalian Somatic Cells: Nucleotide Pool Modulates Origin Choice and Interorigin Spacing. *Cell* Vol. 114, 385–394, 10.
- Audry, J., Maestroni, L., Delagoutte, E., Gauthier, T., Nakamura, T.M., Gachet, Y., Saintomé, C., Géli, V., Coulon, S., 2015. RPA prevents G-rich structure formation at lagging-strand telomeres to allow maintenance of chromosome ends. *EMBO J* 34, 1942–1958. <https://doi.org/10.15252/embj.201490773>
- Bai, G., Kermi, C., Stoy, H., Schiltz, C.J., Bacal, J., Zaino, A.M., Hadden, M.K., Eichman, B.F., Lopes, M., Cimprich, K.A., 2020. HLTf Promotes Fork Reversal, Limiting Replication Stress Resistance and Preventing Multiple Mechanisms of Unrestrained DNA Synthesis. *Molecular Cell* 78, 1237–1251.e7. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2020.04.031>
- Bakhom, S.F., Ngo, B., Laughney, A.M., Cavallo, J.-A., Murphy, C.J., Ly, P., Shah, P., Sriram, R.K., Watkins, T.B.K., Taunk, N.K., Duran, M., Pauli, C., Shaw, C., Chadalavada, K., Rajasekhar, V.K., Genovese, G., Venkatesan, S., Birkbak, N.J., McGranahan, N., Lundquist, M., LaPlant, Q., Healey, J.H., Elemento, O., Chung, C.H., Lee, N.Y., Imielenski, M., Nanjangud, G., Pe’er, D., Cleveland, D.W., Powell, S.N., Lammerding, J., Swanton, C., Cantley, L.C., 2018. Chromosomal instability drives metastasis through a cytosolic DNA response. *Nature* 553, 467–472. <https://doi.org/10.1038/nature25432>
- Bakkenist, C.J., Kastan, M.B., 2003. DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation. *Nature* 421, 499–506. <https://doi.org/10.1038/nature01368>
- Balakrishnan, L., Bambara, R.A., 2013. Okazaki Fragment Metabolism. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 5, a010173–a010173. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a010173>
- Banerjee, D., Mandal, S.M., Das, A., Hegde, M.L., Das, S., Bhakat, K.K., Boldogh, I., Sarkar, P.S., Mitra, S., Hazra, T.K., 2011. Preferential Repair of Oxidized Base Damage in the

- Transcribed Genes of Mammalian Cells. *Journal of Biological Chemistry* 286, 6006–6016. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.198796>
- Barnum, K.J., O’Connell, M.J., 2014. Cell Cycle Regulation by Checkpoints, in: Noguchi, E., Gadaleta, M.C. (Eds.), *Cell Cycle Control, Methods in Molecular Biology*. Springer New York, New York, NY, pp. 29–40. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0888-2_2
- Beck, H., Nähse-Kumpf, V., Larsen, M.S.Y., O’Hanlon, K.A., Patzke, S., Holmberg, C., Mejlvang, J., Groth, A., Nielsen, O., Syljuåsen, R.G., Sørensen, C.S., 2012. Cyclin-Dependent Kinase Suppression by WEE1 Kinase Protects the Genome through Control of Replication Initiation and Nucleotide Consumption. *Mol Cell Biol* 32, 4226–4236. <https://doi.org/10.1128/MCB.00412-12>
- Bekker-Jensen, S., Lukas, C., Kitagawa, R., Melander, F., Kastan, M.B., Bartek, J., Lukas, J., 2006. Spatial organization of the mammalian genome surveillance machinery in response to DNA strand breaks. *Journal of Cell Biology* 173, 195–206. <https://doi.org/10.1083/jcb.200510130>
- Benada, J., Burdová, K., Lidak, T., von Morgen, P., Macurek, L., 2015. Polo-like kinase 1 inhibits DNA damage response during mitosis. *Cell Cycle* 14, 219–231. <https://doi.org/10.4161/15384101.2014.977067>
- Berti, M., Ray Chaudhuri, A., Thangavel, S., Gomathinayagam, S., Kenig, S., Vujanovic, M., Odreman, F., Glatter, T., Graziano, S., Mendoza-Maldonado, R., Marino, F., Lucic, B., Biasin, V., Gstaiger, M., Aebersold, R., Sidorova, J.M., Monnat, R.J., Lopes, M., Vindigni, A., 2013a. Human RECQ1 promotes restart of replication forks reversed by DNA topoisomerase I inhibition. *Nat Struct Mol Biol* 20, 347–354. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2501>
- Berti, M., Ray Chaudhuri, A., Thangavel, S., Gomathinayagam, S., Kenig, S., Vujanovic, M., Odreman, F., Glatter, T., Graziano, S., Mendoza-Maldonado, R., Marino, F., Lucic, B., Biasin, V., Gstaiger, M., Aebersold, R., Sidorova, J.M., Monnat, R.J., Lopes, M., Vindigni, A., 2013b. Human RECQ1 promotes restart of replication forks reversed by DNA topoisomerase I inhibition. *Nat Struct Mol Biol* 20, 347–354. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2501>
- Berti, M., Vindigni, A., 2016a. Replication stress: getting back on track. *Nat Struct Mol Biol* 23, 103–109. <https://doi.org/10.1038/nsmb.3163>
- Berti, M., Vindigni, A., 2016b. Replication stress: getting back on track. *Nature Structural & Molecular Biology* 23, 103–109. <https://doi.org/10.1038/nsmb.3163>
- Besnard, E., Babled, A., Lapasset, L., Milhavet, O., Parrinello, H., Dantec, C., Marin, J.-M., Lemaitre, J.-M., 2012. Unraveling cell type-specific and reprogrammable human replication origin signatures associated with G-quadruplex consensus motifs. *Nat Struct Mol Biol* 19, 837–844. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2339>
- Besson, A., Dowdy, S.F., Roberts, J.M., 2008. CDK Inhibitors: Cell Cycle Regulators and Beyond. *Developmental Cell* 14, 159–169. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2008.01.013>
- Bester, A.C., Roniger, M., Oren, Y.S., Im, M.M., Sarni, D., Chaoat, M., Bensimon, A., Zamir, G., Shewach, D.S., Kerem, B., 2011. Nucleotide Deficiency Promotes Genomic Instability in Early Stages of Cancer Development. *Cell* 145, 435–446. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.03.044>
- Betous, R., Mason, A.C., Rambo, R.P., Bansbach, C.E., Badu-Nkansah, A., Sirbu, B.M., Eichman, B.F., Cortez, D., 2012. SMARCAL1 catalyzes fork regression and Holliday junction migration to maintain genome stability during DNA replication. *Genes & Development* 26, 151–162. <https://doi.org/10.1101/gad.178459.111>

- Bhattacharya, S., Srinivasan, K., Abdisalaam, S., Su, F., Raj, P., Dozmorov, I., Mishra, R., Wakeland, E.K., Ghose, S., Mukherjee, S., Asaithamby, A., 2017a. RAD51 interconnects between DNA replication, DNA repair and immunity. *Nucleic Acids Research* 45, 4590–4605. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx126>
- Bhattacharya, S., Srinivasan, K., Abdisalaam, S., Su, F., Raj, P., Dozmorov, I., Mishra, R., Wakeland, E.K., Ghose, S., Mukherjee, S., Asaithamby, A., 2017b. RAD51 interconnects between DNA replication, DNA repair and immunity. *Nucleic Acids Research* 45, 4590–4605. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx126>
- Bianco, J.N., Poli, J., Saksouk, J., Bacal, J., Silva, M.J., Yoshida, K., Lin, Y.-L., Tourrière, H., Lengronne, A., Pasero, P., 2012. Analysis of DNA replication profiles in budding yeast and mammalian cells using DNA combing. *Methods* 57, 149–157. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2012.04.007>
- Billing, D., Horiguchi, M., Wu-Baer, F., Taglialatela, A., Leuzzi, G., Nanez, S.A., Jiang, W., Zha, S., Szabolcs, M., Lin, C.-S., Ciccia, A., Baer, R., 2018. The BRCT Domains of the BRCA1 and BARD1 Tumor Suppressors Differentially Regulate Homology-Directed Repair and Stalled Fork Protection. *Molecular Cell* 72, 127-139.e8. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2018.08.016>
- Birben, E., Sahiner, U.M., Sackesen, C., Erzurum, S., Kalayci, O., 2012. Oxidative Stress and Antioxidant Defense: World Allergy Organization Journal 5, 9–19. <https://doi.org/10.1097/WOX.0b013e3182439613>
- Bjørås, K.Ø., Sousa, M.M.L., Sharma, A., Fonseca, D.M., Sjøgaard, C.K., Bjørås, M., Otterlei, M., 2017a. Monitoring of the spatial and temporal dynamics of BER/SSBR pathway proteins, including MYH, UNG2, MPG, NTH1 and NEIL1-3, during DNA replication. *Nucleic Acids Research* 45, 8291–8301. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx476>
- Bjørås, K.Ø., Sousa, M.M.L., Sharma, A., Fonseca, D.M., Sjøgaard, C.K., Bjørås, M., Otterlei, M., 2017b. Monitoring of the spatial and temporal dynamics of BER/SSBR pathway proteins, including MYH, UNG2, MPG, NTH1 and NEIL1-3, during DNA replication. *Nucleic Acids Research* 45, 8291–8301. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx476>
- Blackford, A.N., Jackson, S.P., 2017. ATM, ATR, and DNA-PK: The Trinity at the Heart of the DNA Damage Response. *Molecular Cell* 66, 801–817. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.05.015>
- Boldogh, I., 2001. hMYH cell cycle-dependent expression, subcellular localization and association with replication foci: evidence suggesting replication-coupled repair of adenine:8-oxoguanine mispairs. *Nucleic Acids Research* 29, 2802–2809. <https://doi.org/10.1093/nar/29.13.2802>
- Borrego-Soto, G., Ortiz-López, R., Rojas-Martínez, A., 2015. Ionizing radiation-induced DNA injury and damage detection in patients with breast cancer. *Genet. Mol. Biol.* 38, 420–432. <https://doi.org/10.1590/S1415-475738420150019>
- Boutros, R., Dozier, C., Ducommun, B., 2006. The when and wheres of CDC25 phosphatases. *Current Opinion in Cell Biology* 18, 185–191. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2006.02.003>
- Brambati, A., Zardoni, L., Nardini, E., Pellicoli, A., Liberi, G., 2020. The dark side of RNA:DNA hybrids. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research* 784, 108300. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2020.108300>
- Brégnard, C., Guerra, J., Déjardin, S., Passalacqua, F., Benkirane, M., Laguette, N., 2016a. Upregulated LINE-1 Activity in the Fanconi Anemia Cancer Susceptibility Syndrome

- Leads to Spontaneous Pro-inflammatory Cytokine Production. *EBioMedicine* 8, 184–194. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2016.05.005>
- Brégnard, C., Guerra, J., Déjardin, S., Passalacqua, F., Benkirane, M., Laguette, N., 2016b. Upregulated LINE-1 Activity in the Fanconi Anemia Cancer Susceptibility Syndrome Leads to Spontaneous Pro-inflammatory Cytokine Production. *EBioMedicine* 8, 184–194. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2016.05.005>
- Brouwer, I., Sitters, G., Candelli, A., Heerema, S.J., Heller, I., Melo de, A.J., Zhang, H., Normanno, D., Modesti, M., Peterman, E.J.G., Wuite, G.J.L., 2016. Sliding sleeves of XRCC4–XLF bridge DNA and connect fragments of broken DNA. *Nature* 535, 566–569. <https://doi.org/10.1038/nature18643>
- Bryant, H.E., Schultz, N., Thomas, H.D., Parker, K.M., Flower, D., Lopez, E., Kyle, S., Meuth, M., Curtin, N.J., Helleday, T., 2005. Specific killing of BRCA2-deficient tumours with inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase 434, 6.
- Brzostek-Racine, S., Gordon, C., Van Scoy, S., Reich, N.C., 2011. The DNA Damage Response Induces IFN. *J.I.* 187, 5336–5345. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1100040>
- Burgers, P.M.J., 2009. Polymerase Dynamics at the Eukaryotic DNA Replication Fork. *J. Biol. Chem.* 284, 4041–4045. <https://doi.org/10.1074/jbc.R800062200>
- Burnette, B.C., Liang, H., Lee, Y., Chlewicki, L., Khodarev, N.N., Weichselbaum, R.R., Fu, Y.-X., Auh, S.L., 2011a. The Efficacy of Radiotherapy Relies upon Induction of Type I Interferon-Dependent Innate and Adaptive Immunity. *Cancer Research* 71, 2488–2496. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-2820>
- Burnette, B.C., Liang, H., Lee, Y., Chlewicki, L., Khodarev, N.N., Weichselbaum, R.R., Fu, Y.-X., Auh, S.L., 2011b. The Efficacy of Radiotherapy Relies upon Induction of Type I Interferon-Dependent Innate and Adaptive Immunity. *Cancer Research* 71, 2488–2496. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-2820>
- Caldecott, K.W., 2008. Single-strand break repair and genetic disease. *Nat Rev Genet* 9, 619–631. <https://doi.org/10.1038/nrg2380>
- Cannan, W.J., Pederson, D.S., 2016. Mechanisms and Consequences of Double-Strand DNA Break Formation in Chromatin: DOUBLE-STRAND DNA BREAK FORMATION IN CHROMATIN. *J. Cell. Physiol.* 231, 3–14. <https://doi.org/10.1002/jcp.25048>
- Capp, J.-P., 2006. The DNA polymerase is required for the repair of non-compatible DNA double strand breaks by NHEJ in mammalian cells. *Nucleic Acids Research* 34, 2998–3007. <https://doi.org/10.1093/nar/gkl380>
- Capp, J.-P., Boudsocq, F., Besnard, A.-G., Lopez, B.S., Cazaux, C., Hoffmann, J.-S., Canitrot, Y., 2007. Involvement of DNA polymerase μ in the repair of a specific subset of DNA double-strand breaks in mammalian cells. *Nucleic Acids Research* 35, 3551–3560. <https://doi.org/10.1093/nar/gkm243>
- Carr, A.M., Lambert, S., 2013. Replication Stress-Induced Genome Instability: The Dark Side of Replication Maintenance by Homologous Recombination. *Journal of Molecular Biology* 425, 4733–4744. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2013.04.023>
- Castor, D., Nair, N., Déclais, A.-C., Lachaud, C., Toth, R., Macartney, T.J., Lilley, D.M.J., Arthur, J.S.C., Rouse, J., 2013. Cooperative Control of Holliday Junction Resolution and DNA Repair by the SLX1 and MUS81-EME1 Nucleases. *Molecular Cell* 52, 221–233. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2013.08.036>
- Ceccaldi, R., Rondinelli, B., D’Andrea, A.D., 2016. Repair Pathway Choices and Consequences at the Double-Strand Break. *Trends in Cell Biology* 26, 52–64. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2015.07.009>

- Cejka, P., 2015. DNA End Resection: Nucleases Team Up with the Right Partners to Initiate Homologous Recombination. *Journal of Biological Chemistry* 290, 22931–22938. <https://doi.org/10.1074/jbc.R115.675942>
- Cerritelli, S.M., Crouch, R.J., 2016. The Balancing Act of Ribonucleotides in DNA. *Trends in Biochemical Sciences* 41, 434–445. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2016.02.005>
- Chang, H.H.Y., Pannunzio, N.R., Adachi, N., Lieber, M.R., 2017. Non-homologous DNA end joining and alternative pathways to double-strand break repair. *Nat Rev Mol Cell Biol* 18, 495–506. <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.48>
- Chappidi, N., Nascakova, Z., Boleslavska, B., Zellweger, R., Isik, E., Andrs, M., Menon, S., Dobrovolna, J., Balbo Pogliano, C., Matos, J., Porro, A., Lopes, M., Janscak, P., 2020. Fork Cleavage-Religation Cycle and Active Transcription Mediate Replication Restart after Fork Stalling at Co-transcriptional R-Loops. *Molecular Cell* 77, 528-541.e8. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2019.10.026>
- Chaudhury, I., Stroik, D.R., Sobeck, A., 2014. FANCD2-Controlled Chromatin Access of the Fanconi-Associated Nuclease FAN1 Is Crucial for the Recovery of Stalled Replication Forks. *Molecular and Cellular Biology* 34, 3939–3954. <https://doi.org/10.1128/MCB.00457-14>
- Chen, Q., Boire, A., Jin, X., Valiente, M., Er, E.E., Lopez-Soto, A., S. Jacob, L., Patwa, R., Shah, H., Xu, K., Cross, J.R., Massagué, J., 2016. Carcinoma–astrocyte gap junctions promote brain metastasis by cGAMP transfer. *Nature* 533, 493–498. <https://doi.org/10.1038/nature18268>
- Chen, Y.-A., Shen, Y.-L., Hsia, H.-Y., Tiang, Y.-P., Sung, T.-L., Chen, L.-Y., 2017. Extrachromosomal telomere repeat DNA is linked to ALT development via cGAS-STING DNA sensing pathway. *Nat Struct Mol Biol* 24, 1124–1131. <https://doi.org/10.1038/nsmb.3498>
- Chiu, Y.-H., MacMillan, J.B., Chen, Z.J., 2009a. RNA Polymerase III Detects Cytosolic DNA and Induces Type I Interferons through the RIG-I Pathway. *Cell* 138, 576–591. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.06.015>
- Chiu, Y.-H., MacMillan, J.B., Chen, Z.J., 2009b. RNA Polymerase III Detects Cytosolic DNA and Induces Type I Interferons through the RIG-I Pathway. *Cell* 138, 576–591. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.06.015>
- Ciccía, 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>
- Ciccía, A., McDonald, N., West, S.C., 2008. Structural and Functional Relationships of the XPF/MUS81 Family of Proteins. *Annu. Rev. Biochem.* 77, 259–287. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.77.070306.102408>
- Cimprich, K.A., Cortez, D., 2008. ATR: an essential regulator of genome integrity. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9, 616–627. <https://doi.org/10.1038/nrm2450>
- Clausen, A.R., Murray, M.S., Passer, A.R., Pedersen, L.C., Kunkel, T.A., 2013. Structure-function analysis of ribonucleotide bypass by B family DNA replicases. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110, 16802–16807. <https://doi.org/10.1073/pnas.1309119110>
- Coll-Bonfill, N., Cancado de Faria, R., Bhoopatiraju, S., Gonzalo, S., 2020. Calcitriol Prevents RAD51 Loss and cGAS-STING-IFN Response Triggered by Progerin. *Proteomics* 20, 1800406. <https://doi.org/10.1002/pmic.201800406>

- Coquel, F., Neumayer, C., Lin, Y.-L., Pasero, P., 2019. SAMHD1 and the innate immune response to cytosolic DNA during DNA replication. *Current Opinion in Immunology* 56, 24–30. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2018.09.017>
- Coquel, F., Silva, M.-J., Técher, H., Zadorozhny, K., Sharma, S., Nieminuszczy, J., Mettling, C., Dardillac, E., Barthe, A., Schmitz, A.-L., Promonet, A., Cribier, A., Sarrazin, A., Niedzwiedz, W., Lopez, B., Costanzo, V., Krejci, L., Chabes, A., Benkirane, M., Lin, Y.-L., Pasero, P., 2018a. SAMHD1 acts at stalled replication forks to prevent interferon induction. *Nature* 557, 57–61. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0050-1>
- Coquel, F., Silva, M.-J., Técher, H., Zadorozhny, K., Sharma, S., Nieminuszczy, J., Mettling, C., Dardillac, E., Barthe, A., Schmitz, A.-L., Promonet, A., Cribier, A., Sarrazin, A., Niedzwiedz, W., Lopez, B., Costanzo, V., Krejci, L., Chabes, A., Benkirane, M., Lin, Y.-L., Pasero, P., 2018b. SAMHD1 acts at stalled replication forks to prevent interferon induction. *Nature* 557, 57–61. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0050-1>
- Cortez, D., 2015. Preventing replication fork collapse to maintain genome integrity. *DNA Repair* 32, 149–157. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2015.04.026>
- Costanzo, V., 2011. Brca2, Rad51 and Mre11: Performing balancing acts on replication forks. *DNA Repair* 10, 1060–1065. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2011.07.009>
- Costanzo, V., Robertson, K., Bibikova, M., Kim, E., Grieco, D., Gottesman, M., Carroll, D., Gautier, J., 2001. Mre11 Protein Complex Prevents Double-Strand Break Accumulation during Chromosomal DNA Replication. *Molecular Cell* 8, 137–147. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(01\)00294-5](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(01)00294-5)
- Couch, F.B., Bansbach, C.E., Driscoll, R., Luzwick, J.W., Glick, G.G., Betous, R., Carroll, C.M., Jung, S.Y., Qin, J., Cimprich, K.A., Cortez, D., 2013a. ATR phosphorylates SMARCAL1 to prevent replication fork collapse. *Genes & Development* 27, 1610–1623. <https://doi.org/10.1101/gad.214080.113>
- Couch, F.B., Bansbach, C.E., Driscoll, R., Luzwick, J.W., Glick, G.G., Betous, R., Carroll, C.M., Jung, S.Y., Qin, J., Cimprich, K.A., Cortez, D., 2013b. ATR phosphorylates SMARCAL1 to prevent replication fork collapse. *Genes & Development* 27, 1610–1623. <https://doi.org/10.1101/gad.214080.113>
- Cybulski, K.E., Howlett, N.G., 2011. FANCP/SLX4: A Swiss army knife of DNA interstrand crosslink repair. *Cell Cycle* 10, 1757–1763. <https://doi.org/10.4161/cc.10.11.15818>
- Daley, J.M., Niu, H., Miller, A.S., Sung, P., 2015. Biochemical mechanism of DSB end resection and its regulation. *DNA Repair* 32, 66–74. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2015.04.015>
- Das, A., Boldogh, I., Lee, J.W., Harrigan, J.A., Hegde, M.L., Piotrowski, J., de Souza Pinto, N., Ramos, W., Greenberg, M.M., Hazra, T.K., Mitra, S., Bohr, V.A., 2007. The Human Werner Syndrome Protein Stimulates Repair of Oxidative DNA Base Damage by the DNA Glycosylase NEIL1. *Journal of Biological Chemistry* 282, 26591–26602. <https://doi.org/10.1074/jbc.M703343200>
- Daza-Martin, M., Starowicz, K., Jamshad, M., Tye, S., Ronson, G.E., MacKay, H.L., Chauhan, A.S., Walker, A.K., Stone, H.R., Beesley, J.F.J., Coles, J.L., Garvin, A.J., Stewart, G.S., McCorvie, T.J., Zhang, X., Densham, R.M., Morris, J.R., 2019. Isomerization of BRCA1–BARD1 promotes replication fork protection. *Nature* 571, 521–527. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1363-4>
- de Lange, T., 2018. Shelterin-Mediated Telomere Protection. *Annu. Rev. Genet.* 52, 223–247. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-032918-021921>

- Deegan, T.D., Diffley, J.F., 2016. MCM: one ring to rule them all. *Current Opinion in Structural Biology* 37, 145–151. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2016.01.014>
- Deem, A., Keszthelyi, A., Blackgrove, T., Vayl, A., Coffey, B., Mathur, R., Chabes, A., Malkova, A., 2011. Break-Induced Replication Is Highly Inaccurate. *PLoS Biol* 9, e1000594. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000594>
- Dehé, P.-M., Gaillard, P.-H.L., 2017. Control of structure-specific endonucleases to maintain genome stability. *Nat Rev Mol Cell Biol* 18, 315–330. <https://doi.org/10.1038/nrm.2016.177>
- Demaria, S., Golden, E.B., Formenti, S.C., 2015a. Role of Local Radiation Therapy in Cancer Immunotherapy. *JAMA Oncol* 1, 1325. <https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2015.2756>
- Demaria, S., Golden, E.B., Formenti, S.C., 2015b. Role of Local Radiation Therapy in Cancer Immunotherapy. *JAMA Oncol* 1, 1325. <https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2015.2756>
- Dempsey, A., Bowie, A.G., 2015. Innate immune recognition of DNA: A recent history. *Virology* 479–480, 146–152. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2015.03.013>
- Deng, L., Liang, H., Xu, M., Yang, X., Burnette, B., Arina, A., Li, X.-D., Mauceri, H., Beckett, M., Darga, T., Huang, X., Gajewski, T.F., Chen, Z.J., Fu, Y.-X., Weichselbaum, R.R., 2014a. STING-Dependent Cytosolic DNA Sensing Promotes Radiation-Induced Type I Interferon-Dependent Antitumor Immunity in Immunogenic Tumors. *Immunity* 41, 843–852. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2014.10.019>
- Deng, L., Liang, H., Xu, M., Yang, X., Burnette, B., Arina, A., Li, X.-D., Mauceri, H., Beckett, M., Darga, T., Huang, X., Gajewski, T.F., Chen, Z.J., Fu, Y.-X., Weichselbaum, R.R., 2014b. STING-Dependent Cytosolic DNA Sensing Promotes Radiation-Induced Type I Interferon-Dependent Antitumor Immunity in Immunogenic Tumors. *Immunity* 41, 843–852. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2014.10.019>
- Dewar, J.M., Walter, J.C., 2017. Mechanisms of DNA replication termination. *Nat Rev Mol Cell Biol* 18, 507–516. <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.42>
- Dhanwani, R., Takahashi, M., Sharma, S., 2018. Cytosolic sensing of immuno-stimulatory DNA, the enemy within. *Current Opinion in Immunology* 50, 82–87. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2017.11.004>
- Di Marco, S., Hasanova, Z., Kanagaraj, R., Chappidi, N., Altmannova, V., Menon, S., Sedlackova, H., Langhoff, J., Surendranath, K., Hühn, D., Bhowmick, R., Marini, V., Ferrari, S., Hickson, I.D., Krejci, L., Janscak, P., 2017. RECQ5 Helicase Cooperates with MUS81 Endonuclease in Processing Stalled Replication Forks at Common Fragile Sites during Mitosis. *Molecular Cell* 66, 658–671.e8. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.05.006>
- Diamond, J.M., Vanpouille-Box, C., Spada, S., Rudqvist, N.-P., Chapman, J.R., Ueberheide, B.M., Pilonis, K.A., Sarfraz, Y., Formenti, S.C., Demaria, S., 2018. Exosomes Shuttle TREX1-Sensitive IFN-Stimulatory dsDNA from Irradiated Cancer Cells to DCs. *Cancer Immunol Res* 6, 910–920. <https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-17-0581>
- Dianov, G.L., Hübscher, U., 2013. Mammalian Base Excision Repair: the Forgotten Archangel. *Nucleic Acids Research* 41, 3483–3490. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt076>
- Ding, H., Greenberg, M.M., 2007. γ -Radiolysis and Hydroxyl Radical Produce Interstrand Cross-Links in DNA Involving Thymidine. *Chem. Res. Toxicol.* 20, 1623–1628. <https://doi.org/10.1021/tx7002307>
- Dizdaroglu, M., Jaruga, P., Birincioglu, M., Rodriguez, H., 2002. Guest Editor: Miral Dizdaroglu. *Free Radical Biology & Medicine*, 32, No. 11, pp. 1102–1115, 2002, 14.

- Dong, S., Lyu, X., Yuan, S., Wang, S., Li, W., Chen, Z., Yu, H., Li, fengsheng, Jiang, Q., 2020. Oxidative stress: A critical hint in ionizing radiation induced pyroptosis. *Radiation Medicine and Protection* 1, 179–185. <https://doi.org/10.1016/j.radmp.2020.10.001>
- Dou, H., Mitra, S., Hazra, T.K., 2003. Repair of Oxidized Bases in DNA Bubble Structures by Human DNA Glycosylases NEIL1 and NEIL2. *Journal of Biological Chemistry* 278, 49679–49684. <https://doi.org/10.1074/jbc.M308658200>
- Duda, H., Arter, M., Gloggnitzer, J., Teloni, F., Wild, P., Blanco, M.G., Altmeyer, M., Matos, J., 2016. A Mechanism for Controlled Breakage of Under-replicated Chromosomes during Mitosis. *Developmental Cell* 39, 740–755. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2016.11.017>
- Dungrawala, H., Rose, K.L., Bhat, K.P., Mohni, K.N., Glick, G.G., Couch, F.B., Cortez, D., 2015. The Replication Checkpoint Prevents Two Types of Fork Collapse without Regulating Replisome Stability. *Molecular Cell* 59, 998–1010. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.07.030>
- Dunphy, G., Flannery, S.M., Almine, J.F., Connolly, D.J., Paulus, C., Jønsson, K.L., Jakobsen, M.R., Nevels, M.M., Bowie, A.G., Unterholzner, L., 2018. Non-canonical Activation of the DNA Sensing Adaptor STING by ATM and IFI16 Mediates NF-κB Signaling after Nuclear DNA Damage. *Molecular Cell* 71, 745-760.e5. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2018.07.034>
- Elango, R., Kockler, Z., Liu, L., Malkova, A., 2018. Investigation of Break-Induced Replication in Yeast, in: *Methods in Enzymology*. Elsevier, pp. 161–203. <https://doi.org/10.1016/bs.mie.2017.12.010>
- Erdal, E., Haider, S., Rehwinkel, J., Harris, A.L., McHugh, P.J., 2017a. A prosurvival DNA damage-induced cytoplasmic interferon response is mediated by end resection factors and is limited by Trex1. *Genes Dev.* 31, 353–369. <https://doi.org/10.1101/gad.289769.116>
- Erdal, E., Haider, S., Rehwinkel, J., Harris, A.L., McHugh, P.J., 2017b. A prosurvival DNA damage-induced cytoplasmic interferon response is mediated by end resection factors and is limited by Trex1. *Genes & Development* 31, 353–369. <https://doi.org/10.1101/gad.289769.116>
- Etourneau et al, 2021. Lamin B1 sequesters 53BP1 to control its recruitment to DNA damage. *SCIENCE ADVANCES Adv.* 2021; 7.
- Falquet, B., Rass, U., 2019. Structure-Specific Endonucleases and the Resolution of Chromosome Underreplication. *Genes* 10, 232. <https://doi.org/10.3390/genes10030232>
- Fang, C., Mo, F., Liu, L., Du, J., Luo, M., Men, K., Na, F., Wang, W., Yang, H., Wei, X., 2020. Oxidized mitochondrial DNA sensing by STING signaling promotes the antitumor effect of an irradiated immunogenic cancer cell vaccine. *Cell Mol Immunol.* <https://doi.org/10.1038/s41423-020-0456-1>
- Farmer et al, 2005. Targeting the DNA repair defect in BRCA mutant cells as a therapeutic strategy. *Nature.* <https://doi.org/10.1038/nature03445>
- Feng, L., Chen, J., 2012. The E3 ligase RNF8 regulates KU80 removal and NHEJ repair. *Nat Struct Mol Biol* 19, 201–206. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2211>
- Feng, X., Tubbs, A., Zhang, C., Tang, M., Sridharan, S., Wang, C., Jiang, D., Su, D., Zhang, H., Chen, Z., Nie, L., Xiong, Y., Huang, M., Nussenzweig, A., Chen, J., 2020a. ATR inhibition potentiates ionizing radiation-induced interferon response via cytosolic nucleic acid-sensing pathways. *EMBO J* 39. <https://doi.org/10.15252/emj.2019104036>

- Feng, X., Tubbs, A., Zhang, C., Tang, M., Sridharan, S., Wang, C., Jiang, D., Su, D., Zhang, H., Chen, Z., Nie, L., Xiong, Y., Huang, M., Nussenzweig, A., Chen, J., 2020b. ATR inhibition potentiates ionizing radiation-induced interferon response via cytosolic nucleic acid-sensing pathways. *EMBO J* 39. <https://doi.org/10.15252/emboj.2019104036>
- Follonier, C., Oehler, J., Herrador, R., Lopes, M., 2013. Friedreich's ataxia-associated GAA repeats induce replication-fork reversal and unusual molecular junctions. *Nat Struct Mol Biol* 20, 486–494. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2520>
- Fontanilla, P., Willaume, S., Thézé, B., Moussa, A., Pennarun, G., Bertrand, P., 2020. Le vieillissement: Une histoire de dommages de l'ADN, d'enveloppe nucléaire altérée et d'inflammation ? *Med Sci (Paris)* 36, 1118–1128. <https://doi.org/10.1051/medsci/2020241>
- Fragkos, M., Ganier, O., Coulombe, P., Méchali, M., 2015. DNA replication origin activation in space and time. *Nat Rev Mol Cell Biol* 16, 360–374. <https://doi.org/10.1038/nrm4002>
- Fregoso, O.I., Emerman, M., 2016. Activation of the DNA Damage Response Is a Conserved Function of HIV-1 and HIV-2 Vpr That Is Independent of SLX4 Recruitment. *mBio* 7, e01433-16, /mbio/7/5/e01433-16.atom. <https://doi.org/10.1128/mBio.01433-16>
- Fu, H., Martin, M.M., Regairaz, M., Huang, L., You, Y., Lin, C.-M., Ryan, M., Kim, R., Shimura, T., Pommier, Y., Aladjem, M.I., 2015. The DNA repair endonuclease Mus81 facilitates fast DNA replication in the absence of exogenous damage. *Nat Commun* 6, 6746. <https://doi.org/10.1038/ncomms7746>
- Fugger, K., Kit Chu, W., Haahr, P., Nedergaard Kousholt, A., Beck, H., Payne, M.J., Hanada, K., Hickson, I.D., Storgaard Sørensen, C., 2013. FBH1 co-operates with MUS81 in inducing DNA double-strand breaks and cell death following replication stress. *Nat Commun* 4, 1423. <https://doi.org/10.1038/ncomms2395>
- Gan, W., Guan, Z., Liu, J., Gui, T., Shen, K., Manley, J.L., Li, X., 2011. R-loop-mediated genomic instability is caused by impairment of replication fork progression. *Genes & Development* 25, 2041–2056. <https://doi.org/10.1101/gad.17010011>
- García-Muse, T., Aguilera, A., 2016. Transcription–replication conflicts: how they occur and how they are resolved. *Nat Rev Mol Cell Biol* 17, 553–563. <https://doi.org/10.1038/nrm.2016.88>
- Gari, K., Decaillet, C., Delannoy, M., Wu, L., Constantinou, A., 2008. Remodeling of DNA replication structures by the branch point translocase FANCM. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105, 16107–16112. <https://doi.org/10.1073/pnas.0804777105>
- Gari, Kerstin, Décaillet, C., Stasiak, A.Z., Stasiak, A., Constantinou, A., 2008. The Fanconi Anemia Protein FANCM Can Promote Branch Migration of Holliday Junctions and Replication Forks. *Molecular Cell* 29, 141–148. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2007.11.032>
- Gasser, S., Zhang, W.Y.L., Tan, N.Y.J., Tripathi, S., Suter, M.A., Chew, Z.H., Khatoor, M., Ngeow, J., Cheung, F.S.G., 2017. Sensing of dangerous DNA. *Mechanisms of Ageing and Development* 165, 33–46. <https://doi.org/10.1016/j.mad.2016.09.001>
- Gehrke, N., Mertens, C., Zillinger, T., Wenzel, J., Bald, T., Zahn, S., Tüting, T., Hartmann, G., Barchet, W., 2013. Oxidative Damage of DNA Confers Resistance to Cytosolic Nuclease TREX1 Degradation and Potentiates STING-Dependent Immune Sensing. *Immunity* 39, 482–495. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.08.004>

- Georgakilas, A.G., O'Neill, P., Stewart, R.D., 2013a. Induction and Repair of Clustered DNA Lesions: What Do We Know So Far? *Radiation Research* 180, 100–109. <https://doi.org/10.1667/RR3041.1>
- Georgakilas, A.G., O'Neill, P., Stewart, R.D., 2013b. Induction and Repair of Clustered DNA Lesions: What Do We Know So Far? *Radiation Research* 180, 100–109. <https://doi.org/10.1667/RR3041.1>
- Ginno, P.A., Lott, P.L., Christensen, H.C., Korf, I., Chédin, F., 2012. R-Loop Formation Is a Distinctive Characteristic of Unmethylated Human CpG Island Promoters. *Molecular Cell* 45, 814–825. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2012.01.017>
- Glück, S., Guey, B., Gulen, M.F., Wolter, K., Kang, T.-W., Schmacke, N.A., Bridgeman, A., Rehwinkel, J., Zender, L., Ablasser, A., 2017. Innate immune sensing of cytosolic chromatin fragments through cGAS promotes senescence. *Nat Cell Biol* 19, 1061–1070. <https://doi.org/10.1038/ncb3586>
- Gomez, V., Hergovich, A., 2016. Cell-Cycle Control and DNA-Damage Signaling in Mammals, in: *Genome Stability*. Elsevier, pp. 227–242. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803309-8.00014-8>
- Gómez-González, B., Aguilera, A., 2019. Transcription-mediated replication hindrance: a major driver of genome instability. *Genes Dev.* 33, 1008–1026. <https://doi.org/10.1101/gad.324517.119>
- Grabarz, A., Guirouilh-Barbat, J., Barascu, A., Pennarun, G., Genet, D., Rass, E., Germann, S.M., Bertrand, P., Hickson, I.D., Lopez, B.S., 2013. A Role for BLM in Double-Strand Break Repair Pathway Choice: Prevention of CtIP/Mre11-Mediated Alternative Nonhomologous End-Joining. *Cell Reports* 5, 21–28. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2013.08.034>
- Graham, T.G.W., Walter, J.C., Loparo, J.J., 2016. Two-Stage Synapsis of DNA Ends during Non-homologous End Joining. *Molecular Cell* 61, 850–858. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.02.010>
- Gratia, M., Rodero, M.P., Conrad, C., Bou Samra, E., Maurin, M., Rice, G.I., Duffy, D., Revy, P., Petit, F., Dale, R.C., Crow, Y.J., Amor-Gueret, M., Manel, N., 2019. Bloom syndrome protein restrains innate immune sensing of micronuclei by cGAS. *Journal of Experimental Medicine* 216, 1199–1213. <https://doi.org/10.1084/jem.20181329>
- Guan, J., Lu, C., Jin, Q., Lu, H., Chen, X., Tian, L., Zhang, Y., Ortega, J., Zhang, J., Siteni, S., Chen, M., Gu, L., Shay, J.W., Davis, A.J., Chen, Z.J., Fu, Y.-X., Li, G.-M., 2021. MLH1 Deficiency-Triggered DNA Hyperexcision by Exonuclease 1 Activates the cGAS-STING Pathway. *Cancer Cell* 39, 109–121.e5. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2020.11.004>
- Guervilly, J.-H., Gaillard, P.H., 2018a. SLX4: multitasking to maintain genome stability. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* 53, 475–514. <https://doi.org/10.1080/10409238.2018.1488803>
- Guervilly, J.-H., Gaillard, P.H., 2018b. SLX4: multitasking to maintain genome stability. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* 53, 475–514. <https://doi.org/10.1080/10409238.2018.1488803>
- Guervilly, J.-H., Takedachi, A., Naim, V., Scaglione, S., Chawhan, C., Lovera, Y., Despras, E., Kuraoka, I., Kannouche, P., Rosselli, F., Gaillard, P.-H.L., 2015. The SLX4 Complex Is a SUMO E3 Ligase that Impacts on Replication Stress Outcome and Genome Stability. *Molecular Cell* 57, 123–137. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.11.014>
- Guirouilh-Barbat, J., Huck, S., Bertrand, P., Pirzio, L., Desmaze, C., Sabatier, L., Lopez, B.S., 2004. Impact of the KU80 Pathway on NHEJ-Induced Genome Rearrangements in

- Mammalian Cells. *Molecular Cell* 14, 611–623. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2004.05.008>
- Guirouilh-Barbat, J., Rass, E., Plo, I., Bertrand, P., Lopez, B.S., 2007. Defects in XRCC4 and KU80 differentially affect the joining of distal nonhomologous ends. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104, 20902–20907. <https://doi.org/10.1073/pnas.0708541104>
- Halazonetis, T.D., Gorgoulis, V.G., Bartek, J., 2008. An Oncogene-Induced DNA Damage Model for Cancer Development. *Science* 319, 1352–1355. <https://doi.org/10.1126/science.1140735>
- Hamperl, S., Bocek, M.J., Saldivar, J.C., Swigut, T., Cimprich, K.A., 2017. Transcription-Replication Conflict Orientation Modulates R-Loop Levels and Activates Distinct DNA Damage Responses. *Cell* 170, 774–786.e19. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.07.043>
- Hanada, K., Budzowska, M., Davies, S.L., van Drunen, E., Onizawa, H., Beverloo, H.B., Maas, A., Essers, J., Hickson, I.D., Kanaar, R., 2007a. The structure-specific endonuclease Mus81 contributes to replication restart by generating double-strand DNA breaks. *Nat Struct Mol Biol* 14, 1096–1104. <https://doi.org/10.1038/nsmb1313>
- Hanada, K., Budzowska, M., Davies, S.L., van Drunen, E., Onizawa, H., Beverloo, H.B., Maas, A., Essers, J., Hickson, I.D., Kanaar, R., 2007b. The structure-specific endonuclease Mus81 contributes to replication restart by generating double-strand DNA breaks. *Nat Struct Mol Biol* 14, 1096–1104. <https://doi.org/10.1038/nsmb1313>
- Hans, F., Senarisoy, M., Bhaskar Naidu, C., Timmins, J., 2020. Focus on DNA Glycosylases—A Set of Tightly Regulated Enzymes with a High Potential as Anticancer Drug Targets. *IJMS* 21, 9226. <https://doi.org/10.3390/ijms21239226>
- Harding, S.M., Benci, J.L., Irianto, J., Discher, D.E., Minn, A.J., Greenberg, R.A., 2017. Mitotic progression following DNA damage enables pattern recognition within micronuclei. *Nature* 548, 466–470. <https://doi.org/10.1038/nature23470>
- Harper, J.V., Anderson, J.A., O’Neill, P., 2010. Radiation induced DNA DSBs: Contribution from stalled replication forks? *DNA Repair* 9, 907–913. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2010.06.002>
- Hartford, S.A., Chittela, R., Ding, X., Vyas, A., Martin, B., Burkett, S., Haines, D.C., Southon, E., Tessarollo, L., Sharan, S.K., 2016. Interaction with PALB2 Is Essential for Maintenance of Genomic Integrity by BRCA2. *PLoS Genet* 12, e1006236. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1006236>
- Härtlova, A., Erttmann, S.F., Raffi, F.A.M., Schmalz, A.M., Resch, U., Anugula, S., Lienenklaus, S., Nilsson, L.M., Kröger, A., Nilsson, J.A., Ek, T., Weiss, S., Gekara, N.O., 2015a. DNA Damage Primes the Type I Interferon System via the Cytosolic DNA Sensor STING to Promote Anti-Microbial Innate Immunity. *Immunity* 42, 332–343. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2015.01.012>
- Härtlova, A., Erttmann, S.F., Raffi, F.A.M., Schmalz, A.M., Resch, U., Anugula, S., Lienenklaus, S., Nilsson, L.M., Kröger, A., Nilsson, J.A., Ek, T., Weiss, S., Gekara, N.O., 2015b. DNA Damage Primes the Type I Interferon System via the Cytosolic DNA Sensor STING to Promote Anti-Microbial Innate Immunity. *Immunity* 42, 332–343. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2015.01.012>
- Hartmann, G., 2017. Nucleic Acid Immunity, in: *Advances in Immunology*. Elsevier, pp. 121–169. <https://doi.org/10.1016/bs.ai.2016.11.001>

- Hashimoto, Y., Ray Chaudhuri, A., Lopes, M., Costanzo, V., 2010. Rad51 protects nascent DNA from Mre11-dependent degradation and promotes continuous DNA synthesis. *Nat Struct Mol Biol* 17, 1305–1311. <https://doi.org/10.1038/nsmb.1927>
- Hazra, T.K., Izumi, T., Boldogh, I., Imhoff, B., Kow, Y.W., Jaruga, P., Dizdaroglu, M., Mitra, S., 2002. Identification and characterization of a human DNA glycosylase for repair of modified bases in oxidatively damaged DNA. *PNAS* 99, 3523–3528. <https://doi.org/10.1073/pnas.062053799>
- Hegde, Muralidhar L, Hazra, T.K., Mitra, S., 2008. Early steps in the DNA base excision/single-strand interruption repair pathway in mammalian cells. *Cell Res* 18, 27–47. <https://doi.org/10.1038/cr.2008.8>
- Hegde, M.L., Hegde, P.M., Bellot, L.J., Mandal, S.M., Hazra, T.K., Li, G.-M., Boldogh, I., Tomkinson, A.E., Mitra, S., 2013a. Prereplicative repair of oxidized bases in the human genome is mediated by NEIL1 DNA glycosylase together with replication proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110, E3090–E3099. <https://doi.org/10.1073/pnas.1304231110>
- Hegde, M.L., Hegde, P.M., Bellot, L.J., Mandal, S.M., Hazra, T.K., Li, G.-M., Boldogh, I., Tomkinson, A.E., Mitra, S., 2013b. Prereplicative repair of oxidized bases in the human genome is mediated by NEIL1 DNA glycosylase together with replication proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110, E3090–E3099. <https://doi.org/10.1073/pnas.1304231110>
- Hegde, Muralidhar L., Theriot, C.A., Das, A., Hegde, P.M., Guo, Z., Gary, R.K., Hazra, T.K., Shen, B., Mitra, S., 2008. Physical and Functional Interaction between Human Oxidized Base-specific DNA Glycosylase NEIL1 and Flap Endonuclease 1. *Journal of Biological Chemistry* 283, 27028–27037. <https://doi.org/10.1074/jbc.M802712200>
- Heller, R.C., Kang, S., Lam, W.M., Chen, S., Chan, C.S., Bell, S.P., 2011. Eukaryotic Origin-Dependent DNA Replication In Vitro Reveals Sequential Action of DDK and S-CDK Kinases. *Cell* 146, 80–91. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.06.012>
- Helmrich, A., Ballarino, M., Tora, L., 2011. Collisions between Replication and Transcription Complexes Cause Common Fragile Site Instability at the Longest Human Genes. *Molecular Cell* 44, 966–977. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2011.10.013>
- Herzner, A.-M., Hagmann, C.A., Goldeck, M., Wolter, S., Kübler, K., Wittmann, S., Gramberg, T., Andreeva, L., Hopfner, K.-P., Mertens, C., Zillinger, T., Jin, T., Xiao, T.S., Bartok, E., Coch, C., Ackermann, D., Hornung, V., Ludwig, J., Barchet, W., Hartmann, G., Schlee, M., 2015. Sequence-specific activation of the DNA sensor cGAS by Y-form DNA structures as found in primary HIV-1 cDNA. *Nat Immunol* 16, 1025–1033. <https://doi.org/10.1038/ni.3267>
- Ho, S.S.W., Zhang, W.Y.L., Tan, N.Y.J., Khatoor, M., Suter, M.A., Tripathi, S., Cheung, F.S.G., Lim, W.K., Tan, P.H., Ngeow, J., Gasser, S., 2016a. The DNA Structure-Specific Endonuclease MUS81 Mediates DNA Sensor STING-Dependent Host Rejection of Prostate Cancer Cells. *Immunity* 44, 1177–1189. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2016.04.010>
- Ho, S.S.W., Zhang, W.Y.L., Tan, N.Y.J., Khatoor, M., Suter, M.A., Tripathi, S., Cheung, F.S.G., Lim, W.K., Tan, P.H., Ngeow, J., Gasser, S., 2016b. The DNA Structure-Specific Endonuclease MUS81 Mediates DNA Sensor STING-Dependent Host Rejection of Prostate Cancer Cells. *Immunity* 44, 1177–1189. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2016.04.010>
- Hodskinson, M.R.G., Silhan, J., Crossan, G.P., Garaycochea, J.I., Mukherjee, S., Johnson, C.M., Schärer, O.D., Patel, K.J., 2014. Mouse SLX4 Is a Tumor Suppressor that Stimulates the

- Activity of the Nuclease XPF-ERCC1 in DNA Crosslink Repair. *Molecular Cell* 54, 472–484. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.03.014>
- Hoeijmakers, J.H.J., 2009. DNA Damage, Aging, and Cancer. *N Engl J Med* 361, 1475–1485. <https://doi.org/10.1056/NEJMra0804615>
- Hollingworth, R., Grand, R., 2015. Modulation of DNA Damage and Repair Pathways by Human Tumour Viruses. *Viruses* 7, 2542–2591. <https://doi.org/10.3390/v7052542>
- Hong, C., Tijhuis, A.E., Foijer, F., 2019. The cGAS Paradox: Contrasting Roles for cGAS-STING Pathway in Chromosomal Instability. *Cells* 8, 1228. <https://doi.org/10.3390/cells8101228>
- Hornung, V., Hartmann, R., Ablasser, A., Hopfner, K.-P., 2014. OAS proteins and cGAS: unifying concepts in sensing and responding to cytosolic nucleic acids. *Nat Rev Immunol* 14, 521–528. <https://doi.org/10.1038/nri3719>
- Horsman MR, 2009. The oxygen effect and fractionated radiotherapy. *Basic Clinical Radiobiology* 4th edit.
- Hu, M.-M., Shu, H.-B., 2020a. Innate Immune Response to Cytoplasmic DNA: Mechanisms and Diseases. *Annu. Rev. Immunol.* 38, 79–98. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-070119-115052>
- Hu, M.-M., Shu, H.-B., 2020b. Innate Immune Response to Cytoplasmic DNA: Mechanisms and Diseases. *Annu. Rev. Immunol.* 38, 79–98. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-070119-115052>
- Huen, M.S.Y., Sy, S.M.H., Chen, J., 2010. BRCA1 and its toolbox for the maintenance of genome integrity. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11, 138–148. <https://doi.org/10.1038/nrm2831>
- Huertas, P., Jackson, S.P., 2009. Human CtIP Mediates Cell Cycle Control of DNA End Resection and Double Strand Break Repair. *Journal of Biological Chemistry* 284, 9558–9565. <https://doi.org/10.1074/jbc.M808906200>
- Iliakis, G., Murmann, T., Soni, A., 2015. Alternative end-joining repair pathways are the ultimate backup for abrogated classical non-homologous end-joining and homologous recombination repair: Implications for the formation of chromosome translocations. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 793, 166–175. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2015.07.001>
- Ismail, I.H., Gagné, J.-P., Genois, M.-M., Strickfaden, H., McDonald, D., Xu, Z., Poirier, G.G., Masson, J.-Y., Hendzel, M.J., 2015. The RNF138 E3 ligase displaces Ku to promote DNA end resection and regulate DNA repair pathway choice. *Nature Cell Biology* 17, 1446–1457. <https://doi.org/10.1038/ncb3259>
- Isono, M., Niimi, A., Oike, T., Hagiwara, Y., Sato, H., Sekine, R., Yoshida, Y., Isobe, S.-Y., Obuse, C., Nishi, R., Petricci, E., Nakada, S., Nakano, T., Shibata, A., 2017. BRCA1 Directs the Repair Pathway to Homologous Recombination by Promoting 53BP1 Dephosphorylation. *Cell Reports* 18, 520–532. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.12.042>
- Ivashkiv, L.B., Donlin, L.T., 2014a. Regulation of type I interferon responses. *Nat Rev Immunol* 14, 36–49. <https://doi.org/10.1038/nri3581>
- Ivashkiv, L.B., Donlin, L.T., 2014b. Regulation of type I interferon responses. *Nat Rev Immunol* 14, 36–49. <https://doi.org/10.1038/nri3581>
- Jackson, S.P., Bartek, J., 2009. The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature* 461, 1071–1078. <https://doi.org/10.1038/nature08467>

- Karlsson-Rosenthal, C., Millar, J.B.A., 2006. Cdc25: mechanisms of checkpoint inhibition and recovery. *Trends in Cell Biology* 16, 285–292. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2006.04.002>
- Kavanagh, J.N., Redmond, K.M., Schettino, G., Prise, K.M., 2013. DNA Double Strand Break Repair: A Radiation Perspective. *Antioxidants & Redox Signaling* 18, 2458–2472. <https://doi.org/10.1089/ars.2012.5151>
- Kawamura, K., Qi, F., Kobayashi, J., 2018. Potential relationship between the biological effects of low-dose irradiation and mitochondrial ROS production. *Journal of Radiation Research* 59, ii91–ii97. <https://doi.org/10.1093/jrr/rrx091>
- Kemiha, S., Poli, J., Lin, Y.-L., Lengronne, A., Pasero, P., 2021. Toxic R-loops: Cause or consequence of replication stress? *DNA Repair* 107, 103199. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2021.103199>
- Kim, C., Wang, X.-D., Yu, Y., 2020. PARP1 inhibitors trigger innate immunity via PARP1 trapping-induced DNA damage response. *eLife* 9, e60637. <https://doi.org/10.7554/eLife.60637>
- Kim, H., D'Andrea, A.D., 2012. Regulation of DNA cross-link repair by the Fanconi anemia/BRCA pathway. *Genes & Development* 26, 1393–1408. <https://doi.org/10.1101/gad.195248.112>
- Kim, J.H., Grosbart, M., Anand, R., Wyman, C., Cejka, P., Petrini, J.H.J., 2017. The Mre11-Nbs1 Interface Is Essential for Viability and Tumor Suppression. *Cell Reports* 18, 496–507. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.12.035>
- Kim, Y., 2016. Nuclease Delivery: Versatile Functions of SLX4/FANCP in Genome Maintenance. *Molecules and Cells*.
- Kim, Y., Spitz, G.S., Veturi, U., Lach, F.P., Auerbach, A.D., Smogorzewska, A., 2013. Regulation of multiple DNA repair pathways by the Fanconi anemia protein SLX4. *Blood* 121, 54–63. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-07-441212>
- Klattenhoff, A.W., Thakur, M., Chu, C.S., Ray, D., Habib, S.L., Kidane, D., 2017a. Loss of NEIL3 DNA glycosylase markedly increases replication associated double strand breaks and enhances sensitivity to ATR inhibitor in glioblastoma cells. *Oncotarget* 8, 112942–112958. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.22896>
- Klattenhoff, A.W., Thakur, M., Chu, C.S., Ray, D., Habib, S.L., Kidane, D., 2017b. Loss of NEIL3 DNA glycosylase markedly increases replication associated double strand breaks and enhances sensitivity to ATR inhibitor in glioblastoma cells. *Oncotarget* 8, 112942–112958. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.22896>
- Klein Douwel, D., Boonen, R.A.C.M., Long, D.T., Szymowska, A.A., Räschle, M., Walter, J.C., Knipscheer, P., 2014. XPF-ERCC1 Acts in Unhooking DNA Interstrand Crosslinks in Cooperation with FANCD2 and FANCP/SLX4. *Molecular Cell* 54, 460–471. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.03.015>
- Koo, C.X., Kobiyama, K., Shen, Y.J., LeBert, N., Ahmad, S., Khato, M., Aoshi, T., Gasser, S., Ishii, K.J., 2015. RNA Polymerase III Regulates Cytosolic RNA:DNA Hybrids and Intracellular MicroRNA Expression. *Journal of Biological Chemistry* 290, 7463–7473. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.636365>
- Koritzinsky, M., Wouters, B.G., 2013. The Roles of Reactive Oxygen Species and Autophagy in Mediating the Tolerance of Tumor Cells to Cycling Hypoxia. *Seminars in Radiation Oncology* 23, 252–261. <https://doi.org/10.1016/j.semradonc.2013.05.006>
- Koturbash, I., 2017. LINE-1 in response to exposure to ionizing radiation. *Mobile Genetic Elements* 7, e1393491. <https://doi.org/10.1080/2159256X.2017.1393491>

- Kowalczykowski, S.C., 2015. An Overview of the Molecular Mechanisms of Recombinational DNA Repair. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 7, a016410. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a016410>
- Krokan, H.E., Bjoras, M., 2013. Base Excision Repair. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 5, a012583–a012583. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a012583>
- Lachaud, C., Castor, D., Hain, K., Muñoz, I., Wilson, J., MacArtney, T.J., Schindler, D., Rouse, J., 2014. Distinct functional roles for the SLX4 ubiquitin-binding UBZ domains mutated in Fanconi anemia. *Journal of Cell Science* jcs.146167. <https://doi.org/10.1242/jcs.146167>
- Lan, Y.Y., Heather, J.M., Eisenhaure, T., Garris, C.S., Lieb, D., Raychowdhury, R., Hacoheh, N., 2019. Extranuclear DNA accumulates in aged cells and contributes to senescence and inflammation. *Aging Cell* 18, e12901. <https://doi.org/10.1111/accel.12901>
- Lang, K.S., Hall, A.N., Merrikkh, C.N., Ragheb, M., Merrikkh, H., 2017. Head-on replication-transcription collisions lead to formation of life threatening R-loops (preprint). *Molecular Biology*. <https://doi.org/10.1101/154427>
- Le Naour, J., Zitvogel, L., Galluzzi, L., Vacchelli, E., Kroemer, G., 2020. Trial watch: STING agonists in cancer therapy. *Oncolmmunology* 9, 1777624. <https://doi.org/10.1080/2162402X.2020.1777624>
- Lebraud, E., 2018. Rôle du médiateur et des cohésines dans la réparation des dommages oxydatifs de l'ADN 211.
- Lee, D.-H., Acharya, S.S., Kwon, M., Drane, P., Guan, Y., Adelmant, G., Kalev, P., Shah, J., Pellman, D., Marto, J.A., Chowdhury, D., 2014. Dephosphorylation Enables the Recruitment of 53BP1 to Double-Strand DNA Breaks. *Molecular Cell* 54, 512–525. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.03.020>
- Lemaçon, D., Jackson, J., Quinet, A., Brickner, J.R., Li, S., Yazinski, S., You, Z., Ira, G., Zou, L., Mosammaparast, N., Vindigni, A., 2017. MRE11 and EXO1 nucleases degrade reversed forks and elicit MUS81-dependent fork rescue in BRCA2-deficient cells. *Nat Commun* 8, 860. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-01180-5>
- Liao, H., Ji, F., Helleday, T., Ying, S., 2018. Mechanisms for stalled replication fork stabilization: new targets for synthetic lethality strategies in cancer treatments. *EMBO Rep* 19. <https://doi.org/10.15252/embr.201846263>
- Limpose, K.L., Trego, K.S., Li, Z., Leung, S.W., Sarker, A.H., Shah, J.A., Ramalingam, S.S., Werner, E.M., Dynan, W.S., Cooper, P.K., Corbett, A.H., Doetsch, P.W., 2018a. Overexpression of the base excision repair NTHL1 glycosylase causes genomic instability and early cellular hallmarks of cancer. *Nucleic Acids Research* 46, 4515–4532. <https://doi.org/10.1093/nar/gky162>
- Limpose, K.L., Trego, K.S., Li, Z., Leung, S.W., Sarker, A.H., Shah, J.A., Ramalingam, S.S., Werner, E.M., Dynan, W.S., Cooper, P.K., Corbett, A.H., Doetsch, P.W., 2018b. Overexpression of the base excision repair NTHL1 glycosylase causes genomic instability and early cellular hallmarks of cancer. *Nucleic Acids Research* 46, 4515–4532. <https://doi.org/10.1093/nar/gky162>
- Lin, Y.-L., Pasero, P., 2021. Replication stress: from chromatin to immunity and beyond. *Current Opinion in Genetics & Development* 71, 136–142. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2021.08.004>
- Lin, Y.-L., Pasero, P., 2012. Interference Between DNA Replication and Transcription as a Cause of Genomic Instability. *CG* 13, 65–73. <https://doi.org/10.2174/138920212799034767>

- Liu, Q., Guntuku, S., Cui, X.-S., Matsuoka, S., Cortez, D., Tamai, K., Luo, G., Carattini-Rivera, S., DeMayo, F., Bradley, A., Donehower, L.A., Elledge, S.J., 2000. Chk1 is an essential kinase that is regulated by Atr and required for the G2/M DNA damage checkpoint 12.
- Liu, S., Opiyo, S.O., Manthey, K., Glanzer, J.G., Ashley, A.K., Amerin, C., Troksa, K., Shrivastav, M., Nickoloff, J.A., Oakley, G.G., 2012. Distinct roles for DNA-PK, ATM and ATR in RPA phosphorylation and checkpoint activation in response to replication stress. *Nucleic Acids Research* 40, 10780–10794. <https://doi.org/10.1093/nar/gks849>
- Liu, W., Krishnamoorthy, A., Zhao, R., Cortez, D., 2020. Two replication fork remodeling pathways generate nuclease substrates for distinct fork protection factors. *Sci. Adv.* 6, eabc3598. <https://doi.org/10.1126/sciadv.abc3598>
- Lohard, S., Bourgeois, N., Maillet, L., Gautier, F., Fétiveau, A., Lasla, H., Nguyen, F., Vuillier, C., Dumont, A., Moreau-Aubry, A., Frapin, M., David, L., Loussouarn, D., Kerdraon, O., Campone, M., Jézéquel, P., Juin, P.P., Barillé-Nion, S., 2020. STING-dependent paracrine shapes apoptotic priming of breast tumors in response to anti-mitotic treatment. *Nat Commun* 11, 259. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-13689-y>
- Lomax, M.E., Folkes, L.K., O'Neill, P., 2013. Biological Consequences of Radiation-induced DNA Damage: Relevance to Radiotherapy. *Clinical Oncology* 25, 578–585. <https://doi.org/10.1016/j.clon.2013.06.007>
- Lossaint, G., Larroque, M., Ribeyre, C., Bec, N., Larroque, C., Décaillet, C., Gari, K., Constantinou, A., 2013. FANCD2 Binds MCM Proteins and Controls Replisome Function upon Activation of S Phase Checkpoint Signaling. *Molecular Cell* 51, 678–690. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2013.07.023>
- Lou, Z., Minter-Dykhouse, K., Franco, S., Gostissa, M., Rivera, M.A., Celeste, A., Manis, J.P., van Deursen, J., Nussenzweig, A., Paull, T.T., Alt, F.W., Chen, J., 2006. MDC1 Maintains Genomic Stability by Participating in the Amplification of ATM-Dependent DNA Damage Signals. *Molecular Cell* 21, 187–200. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2005.11.025>
- Lugli, N., Sotiriou, S.K., Halazonetis, T.D., 2017. The role of SMARCAL1 in replication fork stability and telomere maintenance. *DNA Repair* 56, 129–134. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2017.06.015>
- Luna, L., Bjørås, M., Hoff, E., Rognes, T., Seeberg, E., 2000. Cell-cycle regulation, intracellular sorting and induced overexpression of the human NTH1 DNA glycosylase involved in removal of formamidopyrimidine residues from DNA. *Mutation Research/DNA Repair* 460, 95–104. [https://doi.org/10.1016/S0921-8777\(00\)00015-X](https://doi.org/10.1016/S0921-8777(00)00015-X)
- Macheret, M., Halazonetis, T.D., 2018. Intragenic origins due to short G1 phases underlie oncogene-induced DNA replication stress. *Nature* 555, 112–116. <https://doi.org/10.1038/nature25507>
- Machwe, A., Karale, R., Xu, X., Liu, Y., Orren, D.K., 2011a. The Werner and Bloom Syndrome Proteins Help Resolve Replication Blockage by Converting (Regressed) Holliday Junctions to Functional Replication Forks. *Biochemistry* 50, 6774–6788. <https://doi.org/10.1021/bi2001054>
- Machwe, A., Lozada, E., Wold, M.S., Li, G.-M., Orren, D.K., 2011b. Molecular Cooperation between the Werner Syndrome Protein and Replication Protein A in Relation to Replication Fork Blockage. *Journal of Biological Chemistry* 286, 3497–3508. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.105411>
- Mackenzie, K.J., Carroll, P., Martin, C.-A., Murina, O., Fluteau, A., Simpson, D.J., Olova, N., Sutcliffe, H., Rainger, J.K., Leitch, A., Osborn, R.T., Wheeler, A.P., Nowotny, M., Gilbert, W., 2011. The Werner Syndrome Protein and Replication Protein A Cooperate to Resolve Replication Fork Blockage. *Journal of Biological Chemistry* 286, 3497–3508. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.105411>

- N., Chandra, T., Reijns, M.A.M., Jackson, A.P., 2017. cGAS surveillance of micronuclei links genome instability to innate immunity. *Nature* 548, 461–465. <https://doi.org/10.1038/nature23449>
- Madireddy, A., Gerhardt, J., 2017. Replication Through Repetitive DNA Elements and Their Role in Human Diseases, in: Masai, H., Foiani, M. (Eds.), *DNA Replication, Advances in Experimental Medicine and Biology*. Springer Singapore, Singapore, pp. 549–581. https://doi.org/10.1007/978-981-10-6955-0_23
- Maestroni, L., Matmati, S., Coulon, S., 2017. Solving the Telomere Replication Problem. *Genes* 8, 55. <https://doi.org/10.3390/genes8020055>
- Malacaria, E., Franchitto, A., Pichierri, P., 2017. SLX4 Prevents GEN1-Dependent DSBs During DNA Replication Arrest Under Pathological Conditions in Human Cells. *Sci Rep* 7, 44464. <https://doi.org/10.1038/srep44464>
- Malumbres, M., Barbacid, M., 2009. Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. *Nat Rev Cancer* 9, 153–166. <https://doi.org/10.1038/nrc2602>
- Mankan, A.K., Schmidt, T., Chauhan, D., Goldeck, M., Höning, K., Gaidt, M., Kubarenko, A.V., Andreeva, L., Hopfner, K., Hornung, V., 2014. Cytosolic RNA:DNA hybrids activate the cGAS–STING axis. *EMBO J* 33, 2937–2946. <https://doi.org/10.15252/embj.201488726>
- Marians, K.J., 2018. Lesion Bypass and the Reactivation of Stalled Replication Forks. *Annu. Rev. Biochem.* 87, 217–238. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-062917-011921>
- Markkanen, E., 2017. Not breathing is not an option: How to deal with oxidative DNA damage. *DNA Repair* 59, 82–105. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2017.09.007>
- Meas, R., Wyrick, J.J., Smerdon, M.J., 2019. Nucleosomes regulate base excision repair in chromatin. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research* 780, 29–36. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2017.10.002>
- Mehta, A., Haber, J.E., 2014. Sources of DNA Double-Strand Breaks and Models of Recombinational DNA Repair. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 6, a016428–a016428. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a016428>
- Mijic, S., Zellweger, R., Chappidi, N., Berti, M., Jacobs, K., Mutreja, K., Ursich, S., Ray Chaudhuri, A., Nussenzweig, A., Janscak, P., Lopes, M., 2017a. Replication fork reversal triggers fork degradation in BRCA2-defective cells. *Nature Communications* 8. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-01164-5>
- Mijic, S., Zellweger, R., Chappidi, N., Berti, M., Jacobs, K., Mutreja, K., Ursich, S., Ray Chaudhuri, A., Nussenzweig, A., Janscak, P., Lopes, M., 2017b. Replication fork reversal triggers fork degradation in BRCA2-defective cells. *Nat Commun* 8, 859. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-01164-5>
- 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>
- Mladenov, E., Kalev, P., Anachkova, B., 2009. The Complexity of Double-Strand Break Ends is a Factor in the Repair Pathway Choice. *Radiation Research* 171, 397–404. <https://doi.org/10.1667/RR1487.1>
- Moldovan, G.-L., Pfander, B., Jentsch, S., 2007. PCNA, the Maestro of the Replication Fork. *Cell* 129, 665–679. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.05.003>
- Mukherjee, C., Tripathi, V., Manolika, E.M., Heijink, A.M., Ricci, G., Merzouk, S., de Boer, H.R., Demmers, J., van Vugt, M.A.T.M., Ray Chaudhuri, A., 2019. RIF1 promotes replication fork protection and efficient restart to maintain genome stability. *Nat Commun* 10, 3287. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-11246-1>

- Murakami, H., Keeney, S., 2008. Regulating the formation of DNA double-strand breaks in meiosis. *Genes & Development* 22, 286–292. <https://doi.org/10.1101/gad.1642308>
- Nair, N., Castor, D., Macartney, T., Rouse, J., 2014. Identification and characterization of MUS81 point mutations that abolish interaction with the SLX4 scaffold protein. *DNA Repair* 24, 131–137. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2014.08.004>
- Nakad, R., Schumacher, B., 2016. DNA Damage Response and Immune Defense: Links and Mechanisms. *Front. Genet.* 7. <https://doi.org/10.3389/fgene.2016.00147>
- Nam, E.A., Cortez, D., 2011. ATR signalling: more than meeting at the fork. *Biochemical Journal* 436, 527–536. <https://doi.org/10.1042/BJ20102162>
- Nastasi, C., Mannarino, L., D’Incalci, M., 2020. DNA Damage Response and Immune Defense. *IJMS* 21, 7504. <https://doi.org/10.3390/ijms21207504>
- Neelsen, K.J., Lopes, M., 2015. Replication fork reversal in eukaryotes: from dead end to dynamic response. *Nat Rev Mol Cell Biol* 16, 207–220. <https://doi.org/10.1038/nrm3935>
- Neelsen, K.J., Zanini, I.M.Y., Mijic, S., Herrador, R., Zellweger, R., Ray Chaudhuri, A., Creavin, K.D., Blow, J.J., Lopes, M., 2013. Deregulated origin licensing leads to chromosomal breaks by rereplication of a gapped DNA template. *Genes & Development* 27, 2537–2542. <https://doi.org/10.1101/gad.226373.113>
- Nemoz, C., Ropars, V., Frit, P., Gontier, A., Drevet, P., Yu, J., Guerois, R., Pitois, A., Comte, A., Delteil, C., Barboule, N., Legrand, P., Baconnais, S., Yin, Y., Tadi, S., Barbet-Massin, E., Berger, I., Le Cam, E., Modesti, M., Rothenberg, E., Calsou, P., Charbonnier, J.B., 2018. XLF and APLF bind Ku80 at two remote sites to ensure DNA repair by non-homologous end joining. *Nat Struct Mol Biol* 25, 971–980. <https://doi.org/10.1038/s41594-018-0133-6>
- Neurauter, C.G., Luna, L., Bjørås, M., 2012a. Release from quiescence stimulates the expression of human NEIL3 under the control of the Ras dependent ERK–MAP kinase pathway. *DNA Repair* 11, 401–409. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2012.01.007>
- Neurauter, C.G., Luna, L., Bjørås, M., 2012b. Release from quiescence stimulates the expression of human NEIL3 under the control of the Ras dependent ERK–MAP kinase pathway. *DNA Repair* 11, 401–409. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2012.01.007>
- Nicolette, M.L., Lee, K., Guo, Z., Rani, M., Chow, J.M., Lee, S.E., Paull, T.T., 2010. Mre11–Rad50–Xrs2 and Sae2 promote 5’ strand resection of DNA double-strand breaks. *Nat Struct Mol Biol* 17, 1478–1485. <https://doi.org/10.1038/nsmb.1957>
- Nimonkar, A.V., Genschel, J., Kinoshita, E., Polaczek, P., Campbell, J.L., Wyman, C., Modrich, P., Kowalczykowski, S.C., 2011. BLM–DNA2–RPA–MRN and EXO1–BLM–RPA–MRN constitute two DNA end resection machineries for human DNA break repair. *Genes & Development* 25, 350–362. <https://doi.org/10.1101/gad.2003811>
- Nowotny, M., Gaur, V., 2016. Structure and mechanism of nucleases regulated by SLX4. *Current Opinion in Structural Biology* 36, 97–105. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2016.01.003>
- Odell, I.D., Wallace, S.S., Pederson, D.S., 2013. Rules of engagement for base excision repair in chromatin. *J. Cell. Physiol.* 228, 258–266. <https://doi.org/10.1002/jcp.24134>
- Orth, M., Lauber, K., Niyazi, M., Friedl, A.A., Li, M., Maihöfer, C., Schüttrumpf, L., Ernst, A., Niemöller, O.M., Belka, C., 2014. Current concepts in clinical radiation oncology. *Radiat Environ Biophys* 53, 1–29. <https://doi.org/10.1007/s00411-013-0497-2>
- Orthwein, A., Fradet-Turcotte, A., Noordermeer, S.M., Canny, M.D., Brun, C.M., Strecker, J., Escribano-Diaz, C., Durocher, D., 2014. Mitosis Inhibits DNA Double-Strand Break

- Repair to Guard Against Telomere Fusions. *Science* 344, 189–193. <https://doi.org/10.1126/science.1248024>
- Ouyang, J., Garner, E., Hallet, A., Nguyen, H.D., Rickman, K.A., Gill, G., Smogorzewska, A., Zou, L., 2015. Noncovalent Interactions with SUMO and Ubiquitin Orchestrate Distinct Functions of the SLX4 Complex in Genome Maintenance. *Molecular Cell* 57, 108–122. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.11.015>
- Panier, S., Durocher, D., 2013. Push back to respond better: regulatory inhibition of the DNA double-strand break response. *Nat Rev Mol Cell Biol* 14, 661–672. <https://doi.org/10.1038/nrm3659>
- Pannunzio, N.R., Lieber, M.R., 2016. Dissecting the Roles of Divergent and Convergent Transcription in Chromosome Instability. *Cell Reports* 14, 1025–1031. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.12.098>
- Pannunzio, N.R., Watanabe, G., Lieber, M.R., 2018. Nonhomologous DNA end-joining for repair of DNA double-strand breaks. *Journal of Biological Chemistry* 293, 10512–10523. <https://doi.org/10.1074/jbc.TM117.000374>
- Parker, M.W., Botchan, M.R., Berger, J.M., 2017. Mechanisms and regulation of DNA replication initiation in eukaryotes. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* 52, 107–144. <https://doi.org/10.1080/10409238.2016.1274717>
- Parkes, E.E., Walker, S.M., Taggart, L.E., McCabe, N., Knight, L.A., Wilkinson, R., McCloskey, K.D., Buckley, N.E., Savage, K.I., Salto-Tellez, M., McQuaid, S., Harte, M.T., Mullan, P.B., Harkin, D.P., Kennedy, R.D., 2017a. Activation of STING-Dependent Innate Immune Signaling By S-Phase-Specific DNA Damage in Breast Cancer. *JNCI J Natl Cancer Inst* 109, djw199. <https://doi.org/10.1093/jnci/djw199>
- Parkes, E.E., Walker, S.M., Taggart, L.E., McCabe, N., Knight, L.A., Wilkinson, R., McCloskey, K.D., Buckley, N.E., Savage, K.I., Salto-Tellez, M., McQuaid, S., Harte, M.T., Mullan, P.B., Harkin, D.P., Kennedy, R.D., 2017b. Activation of STING-Dependent Innate Immune Signaling By S-Phase-Specific DNA Damage in Breast Cancer. *Journal of the National Cancer Institute* 109, djw199. <https://doi.org/10.1093/jnci/djw199>
- Pasero, P., Vindigni, A., 2017. Nucleases Acting at Stalled Forks: How to Reboot the Replication Program with a Few Shortcuts. *Annual review of genetics* 51, 477–499.
- Pellegrini, L., 2012. The Pol α -Primase Complex, in: MacNeill, S. (Ed.), *The Eukaryotic Replisome: A Guide to Protein Structure and Function*, Subcellular Biochemistry. Springer Netherlands, Dordrecht, pp. 157–169. https://doi.org/10.1007/978-94-007-4572-8_9
- Petermann, E., Orta, M.L., Issaeva, N., Schultz, N., Helleday, T., 2010. Hydroxyurea-Stalled Replication Forks Become Progressively Inactivated and Require Two Different RAD51-Mediated Pathways for Restart and Repair. *Molecular Cell* 37, 492–502. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.01.021>
- Pisoschi, A.M., Pop, A., 2015a. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *European Journal of Medicinal Chemistry* 97, 55–74. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2015.04.040>
- Pisoschi, A.M., Pop, A., 2015b. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *European Journal of Medicinal Chemistry* 97, 55–74. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2015.04.040>
- Poole, L.A., Zhao, R., Glick, G.G., Lovejoy, C.A., Eischen, C.M., Cortez, D., 2015. SMARCAL1 maintains telomere integrity during DNA replication. *Proc Natl Acad Sci USA* 112, 14864–14869. <https://doi.org/10.1073/pnas.1510750112>

- Popuri, V., Croteau, D.L., Bohr, V.A., 2010. Substrate specific stimulation of NEIL1 by WRN but not the other human RecQ helicases. *DNA Repair* 9, 636–642. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2010.02.012>
- Porebski, B., Wild, S., Kummer, S., Scaglione, S., Gaillard, P.-H.L., Gari, K., 2019. WRNIP1 Protects Reversed DNA Replication Forks from SLX4-Dependent Nucleolytic Cleavage. *iScience* 21, 31–41. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2019.10.010>
- Postow, L., Ghenoiu, C., Woo, E.M., Krutchinsky, A.N., Chait, B.T., Funabiki, H., 2008. Ku80 removal from DNA through double strand break–induced ubiquitylation. *Journal of Cell Biology* 182, 467–479. <https://doi.org/10.1083/jcb.200802146>
- Prakash, A., Doublie, S., Wallace, S.S., 2012. The Fpg/Nei Family of DNA Glycosylases, in: *Progress in Molecular Biology and Translational Science*. Elsevier, pp. 71–91. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-387665-2.00004-3>
- Prakash, R., Zhang, Y., Feng, W., Jasin, M., 2015. Homologous Recombination and Human Health: The Roles of BRCA1, BRCA2, and Associated Proteins. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 7, a016600. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a016600>
- Primo, L.M.F., Teixeira, L.K., 2020. DNA replication stress: oncogenes in the spotlight. *Genet. Mol. Biol.* 43, e20190138. <https://doi.org/10.1590/1678-4685-gmb-2019-0138>
- Quinet, A., Carvajal-Maldonado, D., Lemaçon, D., Vindigni, A., 2017. DNA Fiber Analysis: Mind the Gap!, in: *Methods in Enzymology*. Elsevier, pp. 55–82. <https://doi.org/10.1016/bs.mie.2017.03.019>
- Quinet, A., Tirman, S., Cybulla, E., Meroni, A., Vindigni, A., 2021. To skip or not to skip: choosing repriming to tolerate DNA damage. *Molecular Cell* 81, 649–658. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2021.01.012>
- Quinet, A., Tirman, S., Jackson, J., Šviković, S., Lemaçon, D., Carvajal-Maldonado, D., González-Acosta, D., Vessoni, A.T., Cybulla, E., Wood, M., Tavis, S., Batista, L.F.Z., Méndez, J., Sale, J.E., Vindigni, A., 2020. PRIMPOL-Mediated Adaptive Response Suppresses Replication Fork Reversal in BRCA-Deficient Cells. *Molecular Cell* 77, 461-474.e9. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2019.10.008>
- Ragland, R.L., Patel, S., Rivard, R.S., Smith, K., Peters, A.A., Bielinsky, A.-K., Brown, E.J., 2013. RNF4 and PLK1 are required for replication fork collapse in ATR-deficient cells. *Genes & Development* 27, 2259–2273. <https://doi.org/10.1101/gad.223180.113>
- Rangaswamy, S., Pandey, A., Mitra, S., Hegde, M., 2017a. Pre-Replicative Repair of Oxidized Bases Maintains Fidelity in Mammalian Genomes: The Cowcatcher Role of NEIL1 DNA Glycosylase. *Genes* 8, 175. <https://doi.org/10.3390/genes8070175>
- Rangaswamy, S., Pandey, A., Mitra, S., Hegde, M., 2017b. Pre-Replicative Repair of Oxidized Bases Maintains Fidelity in Mammalian Genomes: The Cowcatcher Role of NEIL1 DNA Glycosylase. *Genes* 8, 175. <https://doi.org/10.3390/genes8070175>
- 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>
- Rass, E., Grabarz, A., Plo, I., Gautier, J., Bertrand, P., Lopez, B.S., 2009. Role of Mre11 in chromosomal nonhomologous end joining in mammalian cells. *Nat Struct Mol Biol* 16, 819–824. <https://doi.org/10.1038/nsmb.1641>
- Ray Chaudhuri, A., Hashimoto, Y., Herrador, R., Neelsen, K.J., Fachinetti, D., Bermejo, R., Cocito, A., Costanzo, V., Lopes, M., 2012. Topoisomerase I poisoning results in PARP-mediated replication fork reversal. *Nat Struct Mol Biol* 19, 417–423. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2258>

- Ray Chaudhuri, A., Nussenzweig, A., 2017. The multifaceted roles of PARP1 in DNA repair and chromatin remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 18, 610–621. <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.53>
- Regairaz, M., Zhang, Y.-W., Fu, H., Agama, K.K., Tata, N., Agrawal, S., Aladjem, M.I., Pommier, Y., 2011. Mus81-mediated DNA cleavage resolves replication forks stalled by topoisomerase I–DNA complexes. *Journal of Cell Biology* 195, 739–749. <https://doi.org/10.1083/jcb.201104003>
- Reisländer, T., Groelly, F.J., Tarsounas, M., 2020. DNA Damage and Cancer Immunotherapy: A STING in the Tale. *Molecular Cell* 80, 21–28. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2020.07.026>
- Reisländer, T., Lombardi, E.P., Groelly, F.J., Miar, A., Porru, M., Di Vito, S., Wright, B., Lockstone, H., Biroccio, A., Harris, A., Londoño-Vallejo, A., Tarsounas, M., 2019. BRCA2 abrogation triggers innate immune responses potentiated by treatment with PARP inhibitors. *Nat Commun* 10, 3143. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-11048-5>
- Rickman, K., Smogorzewska, A., 2019. Advances in understanding DNA processing and protection at stalled replication forks. *Journal of Cell Biology* 218, 1096–1107. <https://doi.org/10.1083/jcb.201809012>
- Riera, A., Barbon, M., Noguchi, Y., Reuter, L.M., Schneider, S., Speck, C., 2017. From structure to mechanism—understanding initiation of DNA replication. *Genes Dev.* 31, 1073–1088. <https://doi.org/10.1101/gad.298232.117>
- Rodier, F., Campisi, J., 2011. Four faces of cellular senescence. *Journal of Cell Biology* 192, 547–556. <https://doi.org/10.1083/jcb.201009094>
- Ropars, V., Drevet, P., Legrand, P., Baconnais, S., Amram, J., Faure, G., Marquez, J.A., Pietrement, O., Guerois, R., Callebaut, I., Le Cam, E., Revy, P., de Villartay, J.-P., Charbonnier, J.-B., 2011. Structural characterization of filaments formed by human Xrcc4-Cernunnos/XLF complex involved in nonhomologous DNA end-joining. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108, 12663–12668. <https://doi.org/10.1073/pnas.1100758108>
- Roy, S., Luzwick, J.W., Schlacher, K., 2018. SIRF: Quantitative in situ analysis of protein interactions at DNA replication forks. *The Journal of Cell Biology* 217, 1521–1536. <https://doi.org/10.1083/jcb.201709121>
- Russo, M.T., Blasi, M.F., Chiera, F., Fortini, P., Degan, P., Macpherson, P., Furuichi, M., Nakabeppu, Y., Karran, P., Aquilina, G., Bignami, M., 2004. The Oxidized Deoxynucleoside Triphosphate Pool Is a Significant Contributor to Genetic Instability in Mismatch Repair-Deficient Cells. *Mol Cell Biol* 24, 465–474. <https://doi.org/10.1128/MCB.24.1.465-474.2004>
- Sage, E., Shikazono, N., 2017. Radiation-induced clustered DNA lesions: Repair and mutagenesis. *Free Radical Biology and Medicine* 107, 125–135. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2016.12.008>
- Saharia, A., Teasley, D.C., Duxin, J.P., Dao, B., Chiappinelli, K.B., Stewart, S.A., 2010. FEN1 Ensures Telomere Stability by Facilitating Replication Fork Re-initiation. *Journal of Biological Chemistry* 285, 27057–27066. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.112276>
- Sale, J.E., Lehmann, A.R., Woodgate, R., 2013. Y-family DNA polymerases and their role in tolerance of cellular DNA damage 27.
- Saleh, A., Macia, A., Muotri, A.R., 2019. Transposable Elements, Inflammation, and Neurological Disease. *Front. Neurol.* 10, 894. <https://doi.org/10.3389/fneur.2019.00894>

- Santos-Pereira, J.M., Aguilera, A., 2015. R loops: new modulators of genome dynamics and function. *Nat Rev Genet* 16, 583–597. <https://doi.org/10.1038/nrg3961>
- Sarek, G., Vannier, J.-B., Panier, S., Petrini, J.H.J., Boulton, S.J., 2015. TRF2 Recruits RTEL1 to Telomeres in S Phase to Promote T-Loop Unwinding. *Molecular Cell* 57, 622–635. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.12.024>
- Sarkar, J., Wan, B., Yin, J., Vallabhaneni, H., Horvath, K., Kulikowicz, T., Bohr, V.A., Zhang, Y., Lei, M., Liu, Y., 2015. SLX4 contributes to telomere preservation and regulated processing of telomeric joint molecule intermediates. *Nucleic Acids Res* 43, 5912–5923. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv522>
- Sattler, U., Frit, P., Salles, B., Calsou, P., 2003. Long-patch DNA repair synthesis during base excision repair in mammalian cells. *EMBO Rep* 4, 363–367. <https://doi.org/10.1038/sj.embor.embor796>
- Schlacher, K., Christ, N., Siaud, N., Egashira, A., Wu, H., Jasin, M., 2011. Double-Strand Break Repair-Independent Role for BRCA2 in Blocking Stalled Replication Fork Degradation by MRE11. *Cell* 145, 529–542. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.03.041>
- Scully, R., Panday, A., Elango, R., Willis, N.A., 2019. DNA double-strand break repair-pathway choice in somatic mammalian cells. *Nat Rev Mol Cell Biol* 20, 698–714. <https://doi.org/10.1038/s41580-019-0152-0>
- Semenza, G.L., 2017. Hypoxia-inducible factors: coupling glucose metabolism and redox regulation with induction of the breast cancer stem cell phenotype. *EMBO J* 36, 252–259. <https://doi.org/10.15252/embj.201695204>
- Shaltiel, I.A., Krenning, L., Bruinsma, W., Medema, R.H., 2015. The same, only different - DNA damage checkpoints and their reversal throughout the cell cycle. *Journal of Cell Science* 128, 607–620. <https://doi.org/10.1242/jcs.163766>
- Shen, J., Zhao, W., Ju, Z., Wang, L., Peng, Y., Labrie, M., Yap, T.A., Mills, G.B., Peng, G., 2019. PARPi Triggers the STING-Dependent Immune Response and Enhances the Therapeutic Efficacy of Immune Checkpoint Blockade Independent of BRCAness. *Cancer Res* 79, 311–319. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-18-1003>
- Shen, Y.J., Le Bert, N., Chitre, A.A., Koo, C.X., Nga, X.H., Ho, S.S.W., Khatoo, M., Tan, N.Y., Ishii, K.J., Gasser, S., 2015. Genome-Derived Cytosolic DNA Mediates Type I Interferon-Dependent Rejection of B Cell Lymphoma Cells. *Cell Reports* 11, 460–473. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.03.041>
- Shimura, T., Torres, M.J., Martin, M.M., Rao, V.A., Pommier, Y., Katsura, M., Miyagawa, K., Aladjem, M.I., 2008. Bloom's Syndrome Helicase and Mus81 are Required to Induce Transient Double-strand DNA Breaks in Response to DNA Replication Stress. *Journal of Molecular Biology* 375, 1152–1164. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2007.11.006>
- Shin, Y.-K., Amangyeld, T., Nguyen, T.A., Munashingha, P.R., Seo, Y.-S., 2012. Human MUS81 complexes stimulate flap endonuclease 1: Human MUS81 stimulates FEN1 activity. *FEBS Journal* 279, 2412–2430. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2012.08620.x>
- Sies, H., Berndt, C., Jones, D.P., 2017a. *Oxidative Stress* 37.
- Sies, H., Berndt, C., Jones, D.P., 2017b. *Oxidative Stress* 37.
- Somyajit, K., Gupta, R., Sedlackova, H., Neelsen, K.J., Ochs, F., Rask, M.-B., Choudhary, C., Lukas, J., 2017. Redox-sensitive alteration of replisome architecture safeguards genome integrity. *Science* 358, 797–802. <https://doi.org/10.1126/science.aao3172>
- Somyajit, K., Saxena, S., Babu, S., Mishra, A., Nagaraju, G., 2015. Mammalian RAD51 paralogs protect nascent DNA at stalled forks and mediate replication restart. *Nucleic Acids Res* gkv880. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv880>

- Sørensen, B.S., Horsman, M.R., 2020. Tumor Hypoxia: Impact on Radiation Therapy and Molecular Pathways. *Front. Oncol.* 10, 562. <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.00562>
- Soulas-Sprauel, P., Rivera-Munoz, P., Malivert, L., Le Guyader, G., Abramowski, V., Revy, P., de Villartay, J.-P., 2007. V(D)J and immunoglobulin class switch recombinations: a paradigm to study the regulation of DNA end-joining. *Oncogene* 26, 7780–7791. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210875>
- Stetson, D.B., Ko, J.S., Heidmann, T., Medzhitov, R., 2008. Trex1 Prevents Cell-Intrinsic Initiation of Autoimmunity. *Cell* 134, 587–598. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.06.032>
- Sun, Y., Jiang, X., Chen, S., Fernandes, N., Price, B.D., 2005. A role for the Tip60 histone acetyltransferase in the acetylation and activation of ATM. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102, 13182–13187. <https://doi.org/10.1073/pnas.0504211102>
- T Lindahl, 1993. Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature*.
- Tagliatalata, A., Alvarez, S., Leuzzi, G., Sannino, V., Ranjha, L., Huang, J.-W., Madubata, C., Anand, R., Levy, B., Rabadan, R., Cejka, P., Costanzo, V., Ciccio, A., 2017. Restoration of Replication Fork Stability in BRCA1- and BRCA2-Deficient Cells by Inactivation of SNF2-Family Fork Remodelers. *Molecular Cell* 68, 414-430.e8. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.09.036>
- Takedachi, A., Despras, E., Scaglione, S., Guérois, R., Guervilly, J.H., Blin, M., Audebert, S., Camoin, L., Hasanova, Z., Schertzer, M., Guille, A., Churikov, D., Callebaut, I., Naim, V., Chaffanet, M., Borg, J.P., Bertucci, F., Revy, P., Birnbaum, D., Londoño-Vallejo, A., Kannouche, P.L., Gaillard, P.H.L., 2020a. SLX4 interacts with RTEL1 to prevent transcription-mediated DNA replication perturbations. *Nat Struct Mol Biol* 27, 438–449. <https://doi.org/10.1038/s41594-020-0419-3>
- Takedachi, A., Despras, E., Scaglione, S., Guérois, R., Guervilly, J.H., Blin, M., Audebert, S., Camoin, L., Hasanova, Z., Schertzer, M., Guille, A., Churikov, D., Callebaut, I., Naim, V., Chaffanet, M., Borg, J.P., Bertucci, F., Revy, P., Birnbaum, D., Londoño-Vallejo, A., Kannouche, P.L., Gaillard, P.H.L., 2020b. SLX4 interacts with RTEL1 to prevent transcription-mediated DNA replication perturbations. *Nat Struct Mol Biol* 27, 438–449. <https://doi.org/10.1038/s41594-020-0419-3>
- Tan, J., Wang, X., Phoon, L., Yang, H., Lan, L., 2020. Resolution of ROS-induced G-quadruplexes and R-loops at transcriptionally active sites is dependent on BLM helicase. *FEBS Lett* 594, 1359–1367. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.13738>
- Teixeira-Silva, A., Ait Saada, A., Hardy, J., Iraqui, I., Nocente, M.C., Fréon, K., Lambert, S.A.E., 2017. The end-joining factor Ku acts in the end-resection of double strand break-free arrested replication forks. *Nat Commun* 8, 1982. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-02144-5>
- Teng, Y., Yadav, T., Duan, M., Tan, J., Xiang, Y., Gao, B., Xu, J., Liang, Z., Liu, Y., Nakajima, S., Shi, Y., Levine, A.S., Zou, L., Lan, L., 2018. ROS-induced R loops trigger a transcription-coupled but BRCA1/2-independent homologous recombination pathway through CSB. *Nat Commun* 9, 4115. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-06586-3>
- Thangavel, S., Berti, M., Levikova, M., Pinto, C., Gomathinayagam, S., Vujanovic, M., Zellweger, R., Moore, H., Lee, E.H., Hendrickson, E.A., Cejka, P., Stewart, S., Lopes, M., Vindigni, A., 2015. DNA2 drives processing and restart of reversed replication forks in human cells. *Journal of Cell Biology* 208, 545–562. <https://doi.org/10.1083/jcb.201406100>

- Toledo, L., Neelsen, K.J., Lukas, J., 2017. Replication Catastrophe: When a Checkpoint Fails because of Exhaustion. *Molecular Cell* 66, 735–749. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.05.001>
- Toledo, L.I., Altmeyer, M., Rask, M.-B., Lukas, C., Larsen, D.H., Povlsen, L.K., Bekker-Jensen, S., Mailand, N., Bartek, J., Lukas, J., 2013. ATR Prohibits Replication Catastrophe by Preventing Global Exhaustion of RPA. *Cell* 155, 1088–1103. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.10.043>
- Tuduri, S., Crabbé, L., Conti, C., Tourrière, H., Holtgreve-Grez, H., Jauch, A., Pantesco, V., De Vos, J., Thomas, A., Theillet, C., Pommier, Y., Tazi, J., Coquelle, A., Pasero, P., 2009. Topoisomerase I suppresses genomic instability by preventing interference between replication and transcription. *Nat Cell Biol* 11, 1315–1324. <https://doi.org/10.1038/ncb1984>
- Turkmen, R., Birdane, Y.O., Demirel, H.H., Yavuz, H., Kabu, M., Ince, S., 2019. Antioxidant and cytoprotective effects of N-acetylcysteine against subchronic oral glyphosate-based herbicide-induced oxidative stress in rats. *Environ Sci Pollut Res* 26, 11427–11437. <https://doi.org/10.1007/s11356-019-04585-5>
- Unterholzner, L., Dunphy, G., 2019. cGAS-independent STING activation in response to DNA damage. *Molecular & Cellular Oncology* 6, 1558682. <https://doi.org/10.1080/23723556.2018.1558682>
- Valton, A.-L., Prioleau, M.-N., 2016. G-Quadruplexes in DNA Replication: A Problem or a Necessity? *Trends in Genetics* 32, 697–706. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2016.09.004>
- Vannier, J.-B., Pavicic-Kaltenbrunner, V., Petalcorin, M.I.R., Ding, H., Boulton, S.J., 2012. RTEL1 Dismantles T Loops and Counteracts Telomeric G4-DNA to Maintain Telomere Integrity. *Cell* 149, 795–806. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.03.030>
- Vanpouille-Box, C., Alard, A., Aryankalayil, M.J., Sarfraz, Y., Diamond, J.M., Schneider, R.J., Inghirami, G., Coleman, C.N., Formenti, S.C., Demaria, S., 2017a. DNA exonuclease Trex1 regulates radiotherapy-induced tumour immunogenicity. *Nat Commun* 8, 15618. <https://doi.org/10.1038/ncomms15618>
- Vanpouille-Box, C., Alard, A., Aryankalayil, M.J., Sarfraz, Y., Diamond, J.M., Schneider, R.J., Inghirami, G., Coleman, C.N., Formenti, S.C., Demaria, S., 2017b. DNA exonuclease Trex1 regulates radiotherapy-induced tumour immunogenicity. *Nature Communications* 8, 15618. <https://doi.org/10.1038/ncomms15618>
- Vanpouille-Box, C., Formenti, S.C., Demaria, S., 2017c. TREX1 dictates the immune fate of irradiated cancer cells. *Oncol Immunology* 6, e1339857. <https://doi.org/10.1080/2162402X.2017.1339857>
- Vesela, E., Chroma, K., Turi, Z., Mistrik, M., 2017. Common Chemical Inductors of Replication Stress: Focus on Cell-Based Studies. *Biomolecules* 7, 19. <https://doi.org/10.3390/biom7010019>
- Vítor, A.C., Huertas, P., Legube, G., de Almeida, S.F., 2020. Studying DNA Double-Strand Break Repair: An Ever-Growing Toolbox. *Front. Mol. Biosci.* 7, 24. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2020.00024>
- Vujanovic, M., Krietsch, J., Raso, M.C., Terraneo, N., Zellweger, R., Schmid, J.A., Tagliatalata, A., Huang, J.-W., Holland, C.L., Zwicky, K., Herrador, R., Jacobs, H., Cortez, D., Ciccia, A., Penengo, L., Lopes, M., 2017. Replication Fork Slowing and Reversal upon DNA Damage Require PCNA Polyubiquitination and ZRANB3 DNA Translocase Activity. *Molecular Cell* 67, 882-890.e5. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.08.010>

- Wallace, S.S., 2002. BIOLOGICAL CONSEQUENCES OF FREE RADICAL-DAMAGED DNA BASES. *Free Radical Biology & Medicine*, Vol. 33, No. 1, pp. 1–14, 2002 14.
- Wan, B., Yin, J., Horvath, K., Sarkar, J., Chen, Y., Wu, J., Wan, K., Lu, J., Gu, P., Yu, E.Y., Lue, N.F., Chang, S., Liu, Y., Lei, M., 2013. SLX4 Assembles a Telomere Maintenance Toolkit by Bridging Multiple Endonucleases with Telomeres. *Cell Reports* 4, 861–869. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2013.08.017>
- Wang, H., Jiang, H., Van De Gucht, M., De Ridder, M., 2019. Hypoxic Radioresistance: Can ROS Be the Key to Overcome It? *Cancers* 11, 112. <https://doi.org/10.3390/cancers11010112>
- Wei, P.-C., Chang, A.N., Kao, J., Du, Z., Meyers, R.M., Alt, F.W., Schwer, B., 2016. Long Neural Genes Harbor Recurrent DNA Break Clusters in Neural Stem/Progenitor Cells. *Cell* 164, 644–655. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.12.039>
- Weichselbaum, R.R., Liang, H., Deng, L., Fu, Y.-X., 2017. Radiotherapy and immunotherapy: a beneficial liaison? *Nat Rev Clin Oncol* 14, 365–379. <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2016.211>
- West, A.P., Khoury-Hanold, W., Staron, M., Tal, M.C., Pineda, C.M., Lang, S.M., Bestwick, M., Duguay, B.A., Raimundo, N., MacDuff, D.A., Kaech, S.M., Smiley, J.R., Means, R.E., Iwasaki, A., Shadel, G.S., 2015. Mitochondrial DNA stress primes the antiviral innate immune response. *Nature* 520, 553–557. <https://doi.org/10.1038/nature14156>
- West, S.C., Blanco, M.G., Chan, Y.W., Matos, J., Sarbajna, S., Wyatt, H.D.M., 2015. Resolution of Recombination Intermediates: Mechanisms and Regulation. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 80, 103–109. <https://doi.org/10.1101/sqb.2015.80.027649>
- Wilhelm, T., Ragu, S., Magdalou, I., Machon, C., Dardillac, E., Técher, H., Guitton, J., Debatisse, M., Lopez, B.S., 2016a. Slow Replication Fork Velocity of Homologous Recombination-Defective Cells Results from Endogenous Oxidative Stress. *PLoS Genet* 12, e1006007. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1006007>
- Wilhelm, T., Ragu, S., Magdalou, I., Machon, C., Dardillac, E., Técher, H., Guitton, J., Debatisse, M., Lopez, B.S., 2016b. Slow Replication Fork Velocity of Homologous Recombination-Defective Cells Results from Endogenous Oxidative Stress. *PLoS Genet* 12, e1006007. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1006007>
- Willaume, S., Rass, E., Fontanilla-Ramirez, P., Moussa, A., Wanschoor, P., Bertrand, P., 2021a. A Link between Replicative Stress, Lamin Proteins, and Inflammation. *Genes* 12, 552. <https://doi.org/10.3390/genes12040552>
- Willaume, S., Rass, E., Fontanilla-Ramirez, P., Moussa, A., Wanschoor, P., Bertrand, P., 2021b. A Link between Replicative Stress, Lamin Proteins, and Inflammation. *Genes* 12, 552. <https://doi.org/10.3390/genes12040552>
- Willis, N., Rhind, N., 2009. Regulation of DNA replication by the S-phase DNA damage checkpoint. *Cell Div* 4, 13. <https://doi.org/10.1186/1747-1028-4-13>
- Wilson, J.S.J., Tejera, A.M., Castor, D., Toth, R., Blasco, M.A., Rouse, J., 2013. Localization-Dependent and -Independent Roles of SLX4 in Regulating Telomeres. *Cell Reports* 4, 853–860. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2013.07.033>
- Wolf, C., Rapp, A., Berndt, N., Staroske, W., Schuster, M., Dobrick-Mattheuer, M., Kretschmer, S., König, N., Kurth, T., Wiczorek, D., Kast, K., Cardoso, M.C., Günther, C., Lee-Kirsch, M.A., 2016a. RPA and Rad51 constitute a cell intrinsic mechanism to protect the cytosol from self DNA. *Nat Commun* 7, 11752. <https://doi.org/10.1038/ncomms11752>
- Wolf, C., Rapp, A., Berndt, N., Staroske, W., Schuster, M., Dobrick-Mattheuer, M., Kretschmer, S., König, N., Kurth, T., Wiczorek, D., Kast, K., Cardoso, M.C., Günther, C., Lee-Kirsch,

- M.A., 2016b. RPA and Rad51 constitute a cell intrinsic mechanism to protect the cytosol from self DNA. *Nature Communications* 7, 11752. <https://doi.org/10.1038/ncomms11752>
- Wood, M., Quinet, A., Lin, Y.-L., Davis, A.A., Pasero, P., Ayala, Y.M., Vindigni, A., 2020. TDP-43 dysfunction results in R-loop accumulation and DNA replication defects. *Journal of Cell Science* jcs.244129. <https://doi.org/10.1242/jcs.244129>
- Woodrick, J., Gupta, S., Camacho, S., Parvathaneni, S., Choudhury, S., Cheema, A., Bai, Y., Khatkar, P., Erkizan, H.V., Sami, F., Su, Y., Schärer, O.D., Sharma, S., Roy, R., 2017. A new sub-pathway of long-patch base excision repair involving 5' gap formation. *The EMBO Journal* 36, 1605–1622. <https://doi.org/10.15252/embj.201694920>
- Wu, W., Bhowmick, R., Vogel, I., Özer, Ö., Ghisays, F., Thakur, R.S., Sanchez de Leon, E., Richter, P.H., Ren, L., Petrini, J.H., Hickson, I.D., Liu, Y., 2020. RTEL1 suppresses G-quadruplex-associated R-loops at difficult-to-replicate loci in the human genome. *Nat Struct Mol Biol* 27, 424–437. <https://doi.org/10.1038/s41594-020-0408-6>
- Wyatt, H.D.M., Laister, R.C., Martin, S.R., Arrowsmith, C.H., West, S.C., 2017. The SMX DNA Repair Tri-nuclease. *Molecular Cell* 65, 848-860.e11. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.01.031>
- Xie, A., Kwok, A., Scully, R., 2009. Role of mammalian Mre11 in classical and alternative nonhomologous end joining. *Nat Struct Mol Biol* 16, 814–818. <https://doi.org/10.1038/nsmb.1640>
- Yan, C.T., Boboila, C., Souza, E.K., Franco, S., Hickernell, T.R., Murphy, M., Gumaste, S., Geyer, M., Zarrin, A.A., Manis, J.P., Rajewsky, K., Alt, F.W., 2007. IgH class switching and translocations use a robust non-classical end-joining pathway. *Nature* 449, 478–482. <https://doi.org/10.1038/nature06020>
- Yang, H., Wang, H., Ren, J., Chen, Q., Chen, Z.J., 2017. cGAS is essential for cellular senescence. *Proc Natl Acad Sci USA* 114, E4612–E4620. <https://doi.org/10.1073/pnas.1705499114>
- Yang, Y.-G., Lindahl, T., Barnes, D.E., 2007. Trex1 Exonuclease Degrades ssDNA to Prevent Chronic Checkpoint Activation and Autoimmune Disease. *Cell* 131, 873–886. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.10.017>
- Yeeles, J.T.P., Janska, A., Early, A., Diffley, J.F.X., 2017. How the Eukaryotic Replisome Achieves Rapid and Efficient DNA Replication. *Molecular Cell* 65, 105–116. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.11.017>
- Yeo, J.E., Lee, E.H., Hendrickson, E.A., Sobek, A., 2014. CtIP mediates replication fork recovery in a FANCD2-regulated manner. *Human Molecular Genetics* 23, 3695–3705. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddu078>
- Ying, S., Minocherhomji, S., Chan, K.L., Palmari-Pallag, T., Chu, W.K., Wass, T., Mankouri, H.W., Liu, Y., Hickson, I.D., 2013. MUS81 promotes common fragile site expression. *Nat Cell Biol* 15, 1001–1007. <https://doi.org/10.1038/ncb2773>
- Young, S.J., Sebald, M., Shah Punatar, R., Larin, M., Masino, L., Rodrigo-Brenni, M.C., Liang, C.-C., West, S.C., 2020. MutS β Stimulates Holliday Junction Resolution by the SMX Complex. *Cell Reports* 33, 108289. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.108289>
- Yu, L., Liu, P., 2021. Cytosolic DNA sensing by cGAS: regulation, function, and human diseases. *Sig Transduct Target Ther* 6, 170. <https://doi.org/10.1038/s41392-021-00554-y>
- Zellweger, R., Dalcher, D., Mutreja, K., Berti, M., Schmid, J.A., Herrador, R., Vindigni, A., Lopes, M., 2015a. Rad51-mediated replication fork reversal is a global response to genotoxic treatments in human cells. *Journal of Cell Biology* 208, 563–579. <https://doi.org/10.1083/jcb.201406099>

- Zellweger, R., Dalcher, D., Mutreja, K., Berti, M., Schmid, J.A., Herrador, R., Vindigni, A., Lopes, M., 2015b. Rad51-mediated replication fork reversal is a global response to genotoxic treatments in human cells. *The Journal of Cell Biology* 208, 563–579. <https://doi.org/10.1083/jcb.201406099>
- Zeman, M.K., Cimprich, K.A., 2014. Causes and consequences of replication stress. *Nat Cell Biol* 16, 2–9. <https://doi.org/10.1038/ncb2897>
- Zevini, A., Olganier, D., Hiscott, J., 2017a. Crosstalk between Cytoplasmic RIG-I and STING Sensing Pathways. *Trends in Immunology* 38, 194–205. <https://doi.org/10.1016/j.it.2016.12.004>
- Zevini, A., Olganier, D., Hiscott, J., 2017b. Crosstalk between Cytoplasmic RIG-I and STING Sensing Pathways. *Trends in Immunology* 38, 194–205. <https://doi.org/10.1016/j.it.2016.12.004>
- Zhang, J., Walter, J.C., 2014. Mechanism and regulation of incisions during DNA interstrand cross-link repair. *DNA Repair* 19, 135–142. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2014.03.018>
- Zheng, L., Zhou, M., Chai, Q., Parrish, J., Xue, D., Patrick, S.M., Turchi, J.J., Yannone, S.M., Chen, D., Shen, B., 2005. Novel function of the flap endonuclease 1 complex in processing stalled DNA replication forks. *EMBO Rep* 6, 83–89. <https://doi.org/10.1038/sj.embor.7400313>
- 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>