



HAL
open science

Régulation de la formation des nucléofilaments Rad51 par les complexes de paralogues de Rad51 chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*

Chloé Dupont

► **To cite this version:**

Chloé Dupont. Régulation de la formation des nucléofilaments Rad51 par les complexes de paralogues de Rad51 chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*. Génétique. Université Paris-Saclay, 2024. Français. NNT : 2024UPASL009 . tel-04844562

HAL Id: tel-04844562

<https://theses.hal.science/tel-04844562v1>

Submitted on 18 Dec 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.

Régulation de la formation des nucléofilaments Rad51 par les complexes de paralogues de Rad51 chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*

Regulation of Rad51 nucleofilament formation by Rad51 paralog complexes in Saccharomyces cerevisiae

Thèse de doctorat de l'université Paris-Saclay

École doctorale n°577, Structure et Dynamique des Systèmes Vivants (SDSV)
Spécialité de doctorat : Biologie moléculaire et cellulaire
Graduate School : Life Sciences and Health. Référent : Faculté des sciences d'Orsay

Thèse préparée dans l'unité de recherche « **Stabilité génétique, cellules souches et radiations** » (Université Paris-Saclay, INSERM, CEA), sous la direction de **Eric COIC**, directeur de recherche, et le co-encadrement de **Laurent MALOISEL**, chercheur

Thèse soutenue à Paris-Saclay, le 16 février 2024, par

Chloé DUPONT

Composition du Jury

Membres du jury avec voix délibérative

Fabienne MALAGNAC Professeure, Université Paris-Saclay	Présidente
Frédéric BAUDAT Directeur de recherche CNRS, IGH Montpellier	Rapporteur & Examineur
Aurèle PIAZZA Chargé de recherche, HDR, ENS Lyon	Rapporteur & Examineur
Valérie BORDE Directrice de recherche CNRS, Institut Curie	Examinatrice
Josée GUIROUILH-BARBAT Chargée de recherche, Institut Cochin	Examinatrice

Titre : Régulation de la formation des nucléofilaments Rad51 par les complexes de paralogues de Rad51 chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*

Mots clés : Recombinaison Homologue, Filaments Rad51, Paralogues de Rad51, Réparation de l'ADN, Rad52, Srs2

Résumé : La recombinaison homologue (RH) est une des voies majeures de réparation des dommages de l'ADN telles que les cassures double brin (CDB). Cette voie est également impliquée dans le redémarrage des fourches de réplication bloquées à une lésion. Une étape clé de cette voie de réparation consiste en la formation de filaments nucléoprotéiques formés de la recombinase Rad51 sur de l'ADN simple brin (ADNsb). Ces nucléofilaments sont responsables de la recherche d'homologie et de l'invasion d'un ADN intact et semblable à l'ADN endommagé afin de l'utiliser comme matrice pour la synthèse réparatrice. La formation de ces nucléofilaments est finement régulée. Chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*, la formation des filaments Rad51 est assurée par les régulateurs positifs que sont la protéine médiatrice Rad52 et les deux complexes composés de protéines paralogues de Rad51, le complexe Rad55-Rad57 et le complexe SHU. Ils jouent également un rôle de protection de ce nucléofilament face au régulateur négatif Srs2 dont ils contrebalancent les effets de désassemblage. Pour mieux comprendre le mécanisme de régulation du nucléofilament Rad51, une connaissance plus approfondie des interactions complexes intervenant entre ces multiples acteurs est nécessaire.

Durant ma thèse, nous avons cherché à déterminer la structure des complexes de paralogues de Rad51 en association avec les filaments de Rad51. Pour cela, nous avons combiné une approche bio-informatique structurale, basée sur des alignements de séquences et la structure publiée de Rad51, avec des expériences de double-hybride de levure (Y2H).

Cette stratégie nous a permis de proposer pour la première fois un modèle pour l'organisation des complexes de paralogues de Rad51, les complexes Rad55-Rad57 et SHU, en association avec la recombinase Rad51. Ce modèle a été validé par des analyses génétiques de mutations perturbant chaque domaine d'interaction. Dans notre modèle, Rad55-Rad57 adopte une structure similaire à celle d'un dimère de Rad51 et n'interagit qu'avec l'extrémité 5' des filaments de Rad51 et uniquement par l'intermédiaire de la sous-unité Rad57. Nos analyses génétiques suggèrent que le rôle principal de l'interaction entre Rad55-Rad57 et Rad51 est de protéger les filaments Rad51 contre la translocase Srs2. De l'autre côté de Rad55-Rad57, Rad55 interagit avec la sous-unité Csm2 du complexe SHU par son extrémité N-terminale. Il est intéressant de noter que nos analyses génétiques ont révélé que SHU et l'extrémité N-terminale de Rad55 sont indispensables pour la réparation des CDB. Ils sont en revanche impliqués dans la réparation des brèches simple-brin induites par les UV. Nous proposons que le complexe SHU stabilise la liaison de Rad55-Rad57 sur les brèches simple-brin, favorisant ainsi une meilleure stabilité des filaments de Rad51. Ainsi, les filaments Rad51 seraient plus résistants à l'activité déstabilisatrice de l'hélicase anti-recombinase Srs2 et permettraient à la RH de rivaliser avec d'autres voies de tolérance aux dommages de l'ADN impliquant des ADN polymérases translésionnelles responsables de l'incorporation de mutations. Nos données permettent de proposer un modèle d'installation du filament Rad51 par les complexes de paralogues, Rad55-Rad57 et SHU, en collaboration avec Rad52.

Title : Regulation of Rad51 nucleofilament formation by Rad51 paralog complexes in *Saccharomyces cerevisiae*

Keywords : Homologous Recombination, Rad51 filament, Rad51 paralogs, DNA repair, Rad52, Srs2

Abstract : Homologous recombination (HR) is one of the major repair pathways for DNA damage such as double-strand breaks (DSBs). This pathway is also involved in restarting replication forks stalled by DNA lesion. A key step in this repair pathway involves the formation of nucleoprotein filaments formed by Rad51 recombinase on single-stranded DNA (ssDNA). These nucleofilaments are responsible for homology search and invasion of an intact DNA similar to the damaged DNA in order to use it as a template for repair synthesis. The formation of these nucleofilaments is tightly regulated. In the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*, the formation of Rad51 filaments is ensured by positive regulators such as the Rad52 mediator protein and the two complexes composed of Rad51 paralogue proteins, the Rad55-Rad57 complex and the SHU complex. They also play a role in protecting this nucleofilament from the negative regulator Srs2 by counterbalancing its disassembly effects. To gain a better understanding of the regulatory mechanism of the Rad51 nucleofilament, we need a more detailed understanding of the complex interactions between these multiple players.

During my thesis, we aimed at determining the structure of Rad51 paralog complexes in association with Rad51 filaments. To do this, we combined a structural bioinformatics approach, based on sequence alignments and the published structure of Rad51, with yeast two-hybrid (Y2H) experiments.

This strategy allowed us to build for the first time a model for the organisation of Rad51 paralog complexes, the Rad55-Rad57 and SHU complexes, in association with the Rad51 recombinase. This model was further validated by genetic analysis of mutations disrupting each interaction domain. In our model, Rad55-Rad57 adopts a similar structure than a dimer of Rad51 and it interacts only with the 5'-end of Rad51 filaments and only through the Rad57 subunit. Our genetic analyses suggest that the major role of the interaction between Rad55-Rad57 and Rad51 is to protect Rad51 filaments against the Srs2 translocase. On the other side of Rad55-Rad57, Rad55 interacts with the Csm2 subunit of the SHU complex through its N-terminal end. Interestingly, our genetic analyses revealed that SHU and the N-terminal end of Rad55 are dispensable for DSB repair. However, they are involved in the repair of UV-induced single-strand breaks. We propose that the SHU complex stabilizes the binding of Rad55-Rad57 on ssDNA gaps, thereby promoting enhanced stability of Rad51 filaments. Thus, Rad51 filaments would be more resistant to the destabilising activity of the Srs2 translocase and would allow HR to compete with alternative gap filling pathways involving error-prone translesion DNA polymerases. Our data allow us to propose a model for the installation of the Rad51 filament by paralog complexes, Rad55-Rad57 and SHU, in collaboration with Rad52.

Remerciements

Je souhaite, en premier lieu, adresser mes remerciements à l'ensemble des membres du jury d'avoir accepté d'évaluer mes travaux de thèse : Fabienne MALAGNAC, présidente du jury, Frédéric BAUDAT et Aurèle PIAZZA, rapporteurs, ainsi que Valérie BORDE et Josée GUIROUILH-BARBAT, examinatrices. Je vous remercie pour nos échanges enrichissants et vos remarques constructives à l'égard de mon projet de thèse.

Je remercie également chacun des membres de mon comité de thèse, Frédéric DEVAUX, Arnaud DE MUYT et Zhou XU, d'avoir suivi avec intérêt l'avancement de mes travaux. Je vous remercie pour nos discussions scientifiques, vos judicieux conseils et vos encouragements qui m'ont permis de progresser au mieux dans ce projet.

Je tiens à remercier tout particulièrement mon directeur de thèse, Eric COIC, pour m'avoir accueillie dans son laboratoire dès mon stage de M2 ainsi que mon co-encadrant, Laurent MALOISEL, pour m'avoir accompagnée durant ces années. Merci pour la confiance que vous m'avez accordée afin de réaliser ma thèse au sein du LRGM, pour votre disponibilité, vos conseils et suggestions. Je vous remercie également de m'avoir donné l'opportunité de présenter et de défendre mes travaux à l'occasion de divers congrès ou journées scientifiques et surtout, d'avoir partagé avec moi votre passion pour la recherche.

Je souhaite également adresser tous mes remerciements à Emilie MA, la « petite maman » du labo, qui m'a transmis beaucoup de son savoir-faire. Merci pour ton soutien, ton sourire, ta bienveillance au quotidien et pour nos conversations autant professionnelles que personnelles (ces dernières étant le plus souvent centrées sur ma passion pour les fameuses petites briques de construction, passion avec laquelle je t'ai contaminée). Mes pensées vont également à la « petite » Emilie NAVARRO, que j'ai vu évoluer au sein du laboratoire depuis son stage de M1 jusqu'à ses débuts en thèse. Je te souhaite le meilleur pour cette aventure palpitante et espère pouvoir revenir pour être le témoin de ta brillante réussite.

J'adresse également mes remerciements aux autres membres de l'équipe levure du CEA. Karine DUBRANA et Stéphane MARCAND pour vos conseils avisés. Clémentine BROCAS pour ton oreille attentive à toutes mes histoires drôles et parfois un peu plus sérieuses. Rafael COSTA pour ta gentillesse et ta bonne humeur. Sabrina POBIEGA pour tes conseils qui m'ont été bien utiles lorsque mes expériences ne voulaient pas fonctionner correctement. Claire BENEUT, ma « tata » du labo, pour ton soutien et tes nombreux conseils, notamment sur la fin

de thèse, qui ont été très importants pour moi. Merci à vous les filles (et Rafael) pour les repas de plus d'une heure passés à parler de tout et de rien et pour les fous rires qui m'ont fait le plus grand bien quand j'en avais véritablement besoin. Cette aventure n'aurait pas été la même sans vous.

Je n'oublie pas non plus de remercier Alice DESHAYES, mon binôme de labo, une collègue devenue rapidement une amie qui a été un soutien très important au cours de cette aventure. Merci pour les repas qui ont souvent servi d'exutoire pour se vider la tête et pour les soirées passées ensemble dans la drôle atmosphère du 2^{ème} étage. Merci aussi pour les après-midis shopping, pâtisserie, couture ou encore travaux que nous avons passés ensemble. J'espère que l'on pourra en partager encore beaucoup d'autres, que ce soit en France ou ailleurs.

J'adresse également mes remerciements à nos collaborateurs pour leur importante contribution au projet. Merci à Raphaël GUEROIS, bio-informaticien spécialiste des structures protéiques, pour les modèles générés qui ont rendu cette collaboration plus que fructueuse. Je remercie également les membres du CIGEx, et plus particulièrement, Didier BUSSO, Xavier VEAUTE et Amandine BONNET pour vos précieux conseils et votre investissement dans ce projet.

Je remercie bien évidemment Arielle LELLIARD, Aurélie GOURET et Aude LE CLOIREC pour leur aide précieuse dans mes différentes démarches administratives. Et merci à Eléa DIZET qui m'a régulièrement vu débarquer dans son bureau pour toutes sortes de questions ou tout simplement pour venir discuter.

Merci à toutes les personnes que je n'aurai pas citées ici mais qui ont participé, de près ou de loin, au bon déroulement de ma thèse.

J'adresse mes remerciements aux structures et organisations, le CEA, l'Association de Recherche contre le Cancer (ARC) et l'INSERM, qui ont permis de financer cette thèse durant plus de 4 ans.

Enfin, je remercie mes proches, amis et famille, d'être présents à mes côtés (dans les bons et « moins bons » moments) depuis toutes ces années. Merci pour vos encouragements et votre soutien sans faille tout au long de cette folle aventure. J'adresse un immense merci à mes parents pour toute la patience dont ils ont fait (et font encore) preuve, merci de croire en moi et de me pousser à donner toujours le meilleur de moi-même. Merci pour tout...

Table des matières

Résumé	1
Abstract	2
Remerciements	3
Liste des abréviations	8
Introduction	11
I. Stabilité et Plasticité du Génome	12
A. Sources des dommages à l'ADN et mécanismes de réparation ou de tolérance.	12
B. Défaut ou Absence de réparation des dommages à l'ADN	15
II. La Recombinaison Homologue (RH)	16
A. Mécanismes de la recombinaison homologue	18
1. Voie DSBR (Double-Strand Break Repair) ou modèle de Szostak.....	19
2. Voie SDSA (Synthesis-Dependent Strand-Annealing)	20
3. Voie BIR (Break-Induced Replication)	23
4. Voie SSA (Single-Strand Annealing).....	24
5. La RH et les fourches de réplication endommagées.....	26
B. Les protéines impliquées dans la recombinaison homologue	30
1. Résection de l'ADN.....	31
2. Formation et stabilisation des nucléofilaments Rad51	34
a) La protéine de réplication A (RPA).....	34
b) Les recombinases Rad51 et Dmc1	36
c) Les protéines médiatrices Rad52 et BRCA2	44
d) Les paralogues de Rad51	49
3. Invasion de brin et Synthèse réparatrice	59
a) La protéine Rad54 et son homologue Rdh54.....	59
b) Le complexe Swi5-Sfr1	63
c) Les ADN polymérases	64
4. Résolution des intermédiaires de recombinaison	65
a) Les nucléases	66
b) L'hélicase Sgs1	68
c) L'hélicase Mph1	69
d) L'hélicase « anti-recombinase » Srs2.....	70
e) La protéine RADX.....	74

III. Les paralogues de Rad51 dans la régulation de la formation des filaments Rad51..	75
A. Les paralogues de Rad51 protègent les filaments Rad51 face à l'activité déstabilisatrice de l'hélicase Srs2	76
B. Les paralogues de Rad51 sont impliqués dans la prise en charge des brèches simple-brin post-réplcatives	80
C. Les paralogues de Rad51 humains et cancers	84
Projet	89
Résultats	93
I. Modèle structural des complexes de paralogues de Rad51 en association avec Rad51 (Etabli par Raphaël Guérois)	94
II. La formation du complexe Rad55-Rad57 est essentielle pour la stabilisation des filaments nucléoprotéiques Rad51 et leur protection contre l'anti-recombinase Srs2	96
1) Validation de l'interface entre Rad55 et Rad57 par la technique du double-hybride	96
2) Les extrémités N-terminale et C-terminale non-conservées de Rad55 ne participent pas à l'interaction avec Rad57	100
3) La formation du complexe Rad55-Rad57 détermine la fonction de Rad55 et de Rad57 dans la réparation des cassures double-brin de l'ADN.....	101
4) La formation du complexe Rad55-Rad57 est requise pour le recrutement de Rad51 à une CDB.....	104
5) La formation du complexe Rad55-Rad57 est requise pour la protection des filaments Rad51 contre Srs2	106
6) La formation du complexe Rad55-Rad57 est requise pour la réparation post-réplcative des brèches simple-brin de l'ADN	107
7) La toxicité des filaments Rad51 dans la voie SSA dépend de la formation d'un complexe Rad55-Rad57 stable.....	112
8) La formation d'un complexe Rad55-Rad57 stable est responsable des fréquences élevées de recombinaison dans le mutant <i>srs2Δ</i>	115
9) La toxicité associée aux intermédiaires post-synaptiques de la RH n'est pas supprimée par <i>rad55-D143K</i>	117
III. Les deux complexes de paralogues de Rad51, SHU et Rad55-Rad57, interagissent entre eux et facilitent la prise en charge des brèches simple-brin par la recombinaison homologue	119
1) Validation de l'interface entre Csm2 et Rad55 par la technique du double-hybride	119
2) Le complexe SHU et son interaction avec Rad55-Rad57 ne sont pas essentiels pour la réparation des CDB mitotiques de l'ADN.....	121
3) La formation du mégacomplexe SHU-Rad55-Rad57 participe à la réparation post-réplcative des brèches simple-brin de l'ADN	125

4) Le mégacomplexe SHU-Rad55-Rad57 participe à la formation d'intermédiaires toxiques lors de la RH induites aux UV.....	129
IV. L'interaction entre Rad55-Rad57 et le motif FVTA de Rad51 participe en collaboration avec Rad52 à la protection des filaments Rad51 contre Srs2.....	130
1) Validation de l'interface entre Rad57 et Rad51 par la technique du double-hybride	130
2) Les CDB sont efficacement réparées dans le mutant <i>rad57-Q207K</i> de perte d'interaction entre le complexe Rad55-Rad57 et Rad51.....	133
3) La protection des filaments Rad51 contre Srs2 est compromise dans le mutant <i>rad57-Q207K</i>	135
4) La prise en charge des brèches simple-brin de l'ADN par la recombinaison homologue est retardée mais fonctionnelle dans le mutant <i>rad57-Q207K</i>	139
5) L'interaction entre Rad55-Rad57 et le motif FVTA de Rad51 participe à la formation d'intermédiaires toxiques lors de la RH induite aux UV.....	142
Matériels et Méthodes.....	144
Discussion.....	155
I. L'association d'AlphaFold2 et de tests double-hybride permet l'identification rapide de résidus impliqués spécifiquement dans les interactions protéine-protéine au sein d'un complexe.....	156
II. La formation du complexe Rad55-Rad57 est essentielle pour la formation et la stabilisation des filaments Rad51.....	158
III. La formation du mégacomplexe SHU-Rad55-Rad57 facilite spécifiquement la réparation des brèches simple-brin de l'ADN dans les cellules végétatives	161
IV. L'interaction entre Rad55-Rad57 et Rad51 protège les filaments Rad51 en collaboration avec Rad52	166
Bibliographie.....	171

Liste des abréviations

ADN = Acide Désoxyribonucléique

ADNsb ou db = ADN Simple-Brin ou Double-Brin, respectivement

ALT = Voie de Prolongation Alternative des Télomères (Alternative Lengthening of Telomeres)

ATP ou ADP = Adénosine Triphosphate ou Diphosphate, respectivement

BER = Réparation par Excision de Base (Base Excision Repair)

BIR = Réplication Induite par les Cassures (Break-Induced Replication)

CG = Conversion Génique

ChIP = Immunoprécipitation de la Chromatine (Chromatin Immunoprecipitation)

CO = Crossing-Over

Co-IP = Co-Immunoprécipitation

CSB ou CDB = Cassure Simple ou Double-Brin, respectivement

Cryo-EM = Cryo-microscopie électronique (Cryo-Electron Microscopy)

DBD = Domaine de Fixation à l'ADN (DNA Binding Domain)

DDT = Tolérance aux Dommages à l'ADN (DNA Damage Tolerance)

djH = Double Jonction de Holliday

D-Loop = Boucle de Déplacement (Displacement Loop)

dNTP = Désoxyribonucléoside Triphosphate

DSBR = Réparation des Cassures Double-Brin (Double-Strand Break Repair)

HU = Hydroxyurée

Kb = Kilobase

kDa = KiloDalton

LOH = Perte d'Hétérozygotie (Loss Of Heterozygosity)

MMEJ = Jonction d'Extrémités Médiée par Micro-homologie (Microhomology-Mediated End-Joining)

MMS = Méthanesulfonate de méthyle (Methyl Methanesulfonate)

MMR = Réparation des Mésappariements (Mismatch Repair)

MRX/MRN = Complexe MRE11-RAD50-XRS2/NBS1

NER = Réparation par Excision de Nucléotide (Nucleotide Excision Repair)

NHEJ = Jonction d'Extrémités Non-Homologues (Non-Homologous End-Joining)

Nt = Nucléotides

Pb = Paire de bases

qPCR = PCR quantitative

RH = Recombinaison Homologue

RMN = Résonance Magnétique Nucléaire

ROS = Dérivés Réactifs de l'Oxygène (Reactive Oxygen Species)

SDSA = Appariement de Brin Dépendant de la Synthèse (Synthesis-Dependent Strand-Anneling)

SEI = Invasion Simple-Brin (Single-End Invasion)

SMC = Maintenance Structurale des Chromosomes (Structural Maintenance of Chromosomes)

SSA = Appariement des simples brins (Single-Strand Anneling)

STL = Synthèse Translésionnelle

TS = Changement de Matrice (Template Switch)

UV = Ultra-Violets

Espèces

C. elegans = *Caenorhabditis elegans*

E. coli = *Escherichia coli*

S. cerevisiae = *Saccharomyces cerevisiae*

S. pombe = *Schizosaccharomyces pombe*

Notations

Allèle sauvage = *ALLELE*

Allèle muté = *allèle*

Protéine de mammifère = PROTEINE (par exemple : RAD51)

Protéine de levure = Protéine (par exemple : Rad51)

Introduction

I. Stabilité et Plasticité du Génome

A. Sources des dommages à l'ADN et mécanismes de réparation ou de tolérance

L'acide désoxyribonucléique (ADN) est le support de l'information génétique nécessaire au bon fonctionnement des cellules. Il est donc essentiel d'assurer sa stabilité pour la survie cellulaire mais également pour garantir la pérennité des espèces grâce à une transmission fidèle de ce patrimoine génétique aux générations suivantes. Cependant, l'ADN d'une cellule subit plusieurs milliers de dommages par jour, mettant en péril cette stabilité. Ces dommages sont engendrés soit par des sources exogènes (rayons UV, rayons X, produits chimiques) ou endogènes (produits du métabolisme cellulaire) et sont à l'origine de cassures simple ou double-brin (respectivement, CSB ou CDB) ou de modifications de base. Ces dommages peuvent également être générés de façon programmée et sont alors nécessaires pour certains processus physiologiques comme, par exemple, lors de la recombinaison méiotique dans les cellules reproductrices, lors de la recombinaison V(D)J nécessaire à la production d'une large diversité d'anticorps ou encore lors de la commutation du type sexuel chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*.

Les agents endommageant l'ADN sont nombreux et les lésions générées sont de nature très diverse. Par exemple, l'exposition des cellules aux rayonnements ultra-violet (UV) provoquent la formation de liaisons covalentes entre deux bases pyrimidiques adjacentes, générant des pontages intra-brins. Les radiations ionisantes induisent des cassures de l'ADN, soit de manière directe, soit au travers de la production de dérivés réactifs de l'oxygène (reactive oxygen species en anglais, ROS). Les agents alkylants, tel que le méthanesulfonate de méthyle (MMS), génèrent des dommages à l'ADN. D'autre part, les cellules peuvent être soumises à des stress endogènes comme la production de ROS par le métabolisme cellulaire entraînant la création de sites abasiques.

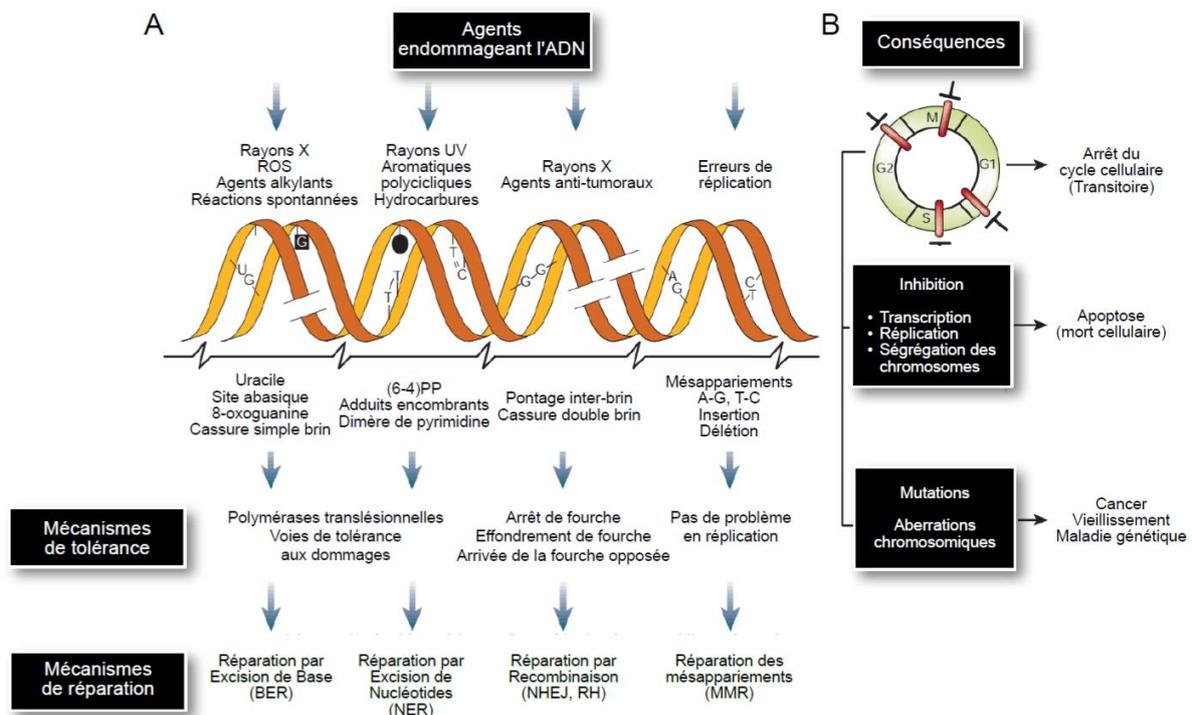


Figure 1. Mécanismes de tolérance et de réparation des dommages de l'ADN et conséquences associées aux défauts de réparation des dommages (adapté de Hoeijmakers, 2001; Branzei & Foiani, 2010)

- (A) Exemples d'agents endommageant l'ADN (en haut), les types de lésions associées (au milieu) et les mécanismes de tolérance et de réparation impliqués en fonction des dommages (en bas).
- (B) Effets à court terme des dommages sur la progression du cycle cellulaire (en haut) et sur le métabolisme cellulaire (au milieu). Effets à long terme des dommages de l'ADN qui engendrent l'apparition de mutations ou d'aberrations chromosomiques (en bas).

Pour maintenir l'intégrité génétique des cellules et restaurer l'information génétique, les cellules ont su développer divers systèmes de réparation capables de reconnaître ces dommages et de les réparer (Figure 1A). Il existe de nombreuses voies de réparation des dommages à l'ADN. La réparation par excision de bases (base excision repair en anglais, BER) élimine les bases endommagées comme les sites abasiques ou les CSB. L'excision de nucléotides (nucleotide excision repair en anglais, NER) supprime les lésions volumineuses qui déforment la structure hélicoïdale de l'ADN tels que les dimères de pyrimidines. La réparation des mésappariements (mismatch repair en anglais, MMR) prend en charge les bases mal appariées qui sont principalement générées par des erreurs associées à la réplication et prévient ainsi la transmission de mutations au travers de la division cellulaire. La jonction d'extrémités non-homologues (non-homologous end-joining en anglais, NHEJ) est un mécanisme de réparation des CDB qui peut se révéler infidèle, dès lors que les extrémités sont dégradées avant d'être jointes, entraînant alors une perte d'information. Le mécanisme de jonction d'extrémités médiée par micro-homologie (microhomology-mediated end-joining en anglais, MMEJ ou

NHEJ alternatif) pourrait expliquer le manque de fidélité de réparation décrit précédemment pour le NHEJ. En effet, ce mécanisme nécessite une résection des extrémités 5' de l'ADN autour du site de cassure afin de pouvoir hybrider de courtes séquences homologues. La voie de la recombinaison homologue (RH), voie à laquelle je me suis intéressée durant ma thèse, est une voie de réparation fidèle des cassures de l'ADN. Cette dernière voie permet également de sauver les fourches de réplication dont la progression est altérée par une barrière physique.

Si les dommages persistent avant l'entrée en phase de synthèse (S) du cycle cellulaire ou s'ils surviennent lors de cette phase, l'étape de réplication s'en trouve affectée puisque les ADN polymérase répliquatives se retrouvent bloquées dans leur progression au niveau des lésions. Ces ADN polymérase possèdent un site actif hautement sélectif et donc contraignant qui ne leur permet pas de répliquer des bases endommagées. Pour prévenir le blocage des fourches et compléter la réplication du génome, les cellules vont alors utiliser des voies alternatives appelées voies de tolérance aux dommages de l'ADN (ou DNA Damage Tolerance en anglais, DDT) (Branzei & Foiani, 2010; Gao et al., 2017). Ces voies DDT permettent de contourner les lésions grâce à un réamorçage des fourches de réplication en aval des dommages. Les lésions seront ensuite corrigées tardivement en phase S ou bien lors de la phase G2. Ces voies DDT reposent sur deux mécanismes distincts. La voie de synthèse translésionnelle (STL) dispose de diverses polymérase translésionnelles qui, à la différence des polymérase répliquatives, sont moins fidèles en raison de leur site actif plus flexible (Goodman & Woodgate, 2013; L. Zhao & Washington, 2017). Elles sont ainsi capables d'incorporer des nucléotides face à des bases altérées par diverses modifications. Ces polymérase agissent soit directement lors de la synthèse, soit en arrière des fourches de réplication. Du fait que la STL introduit des mutations dans le génome, elle est qualifiée de voie de tolérance aux dommages mutagène. Contrairement à la STL, la voie de changement de matrice (ou Template Switch en anglais, TS) et la RH sont des voies fidèles de tolérance aux dommages qui ne conduisent pas à de la mutagenèse. En effet, ces voies utilisent la chromatide sœur nouvellement synthétisée comme matrice pour réparer le plus fidèlement possible la lésion (Branzei & Szakal, 2016). Ces voies de tolérances sont abordées plus en détails dans la section II.A.5.c.

En amont des voies de réparation et de tolérance, la signalisation des dommages joue un rôle crucial dans le maintien de la stabilité génétique et notamment dans l'activation de points de contrôle. Les points de contrôle sont présents à chaque phase du cycle cellulaire : en phase G1, en phase S et en phase G2/M, et s'assurent de la bonne intégrité de l'information génétique avant chaque transition de phases. Si la présence d'un dommage est détectée dans

une des phases du cycle, le point de contrôle correspondant est activé et entraîne le ralentissement ou l'arrêt du cycle cellulaire, offrant à la cellule le temps nécessaire pour réparer les séquences d'ADN lésées avant de reprendre sa progression. Cela assure une coordination de la réparation des dommages avec la progression dans le cycle cellulaire et prévient le passage d'une cellule endommagée vers les phases critiques du cycle que sont la réplication de l'ADN et la mitose. L'activation des points de contrôle du cycle cellulaire déclenche une cascade de signalisation qui, par l'intermédiaire de différents facteurs, favorise la transcription de gènes impliqués dans la réparation, stimule leur activité et assure leur recrutement au site des dommages, notamment au travers de modifications post-traductionnelles (Jackson & Bartek, 2009 ; Ciccia & Elledge, 2010).

B. Défaut ou Absence de réparation des dommages à l'ADN

Les conséquences d'un défaut de signalisation des dommages ou bien d'une altération des différentes voies de réparation sont variées et sont généralement désastreuses tant pour la viabilité cellulaire que pour la survie de l'organisme en général.

La présence de lésions de l'ADN impacte fortement les processus biologiques essentiels que sont la transcription et la réplication du génome (Figure 1b). En effet, la détection de ces dommages par les voies de signalisation conduit au blocage de chacun de ces processus, induisant le ralentissement ou l'arrêt transitoire du cycle cellulaire. L'efficacité des mécanismes de réparation est alors indispensable pour permettre aux cellules de reprendre leur progression dans le cycle. Cependant, lorsque des lésions mal ou non réparées persistent, elles provoquent alors l'effondrement de la fourche de réplication ou encore l'arrêt de la transcription. Ainsi, lorsque les lésions sont trop importantes, la cellule enclenche le mécanisme de mort cellulaire programmée ou apoptose (Hoeijmakers, 2001).

L'incapacité des cellules à détecter ou à réparer les dommages peut également être source d'instabilité génétique à l'origine du développement de cellules tumorales ou bien de maladies génétiques (Hoeijmakers, 2001, 2009; S. P. Jackson & Bartek, 2009). L'accumulation de dommages non réparés peut conduire à l'apparition de mutations ou d'aberrations chromosomiques au niveau des gènes essentiels au bon fonctionnement des mécanismes de réparation. Ces mutations vont alors provoquer la dérégulation de ces gènes, ce qui peut se traduire par la perte de gènes suppresseurs de tumeurs ou bien par la surexpression de gènes oncogènes, induisant alors le développement de cellules cancéreuses à l'origine de la

tumorigenèse. Ainsi, des défauts des différents mécanismes de réparation sont associés à la prédisposition à de nombreux cancers ou au développement de nombreuses maladies génétiques héréditaires. Par exemple, des mutations des gènes *XP* impliqués dans la voie NER sont à l'origine du développement de cellules cancéreuses responsables du Xeroderma Pigmentosum ; des mutations dans les gènes *BRCA1* ou *BRCA2* prédisposent au développement de cancers du sein ; le cancer colorectal lié au syndrome HPNCC est dû à la mutation de gènes retrouvés dans la voie MMR (pour revues : Hoeijmakers, 2001; Tiwari & Wilson, 2019).

Les dommages à l'ADN sont donc généralement considérés comme dangereux vis-à-vis de la stabilité génétique. Paradoxalement, les effets de ces dommages ne sont pas toujours délétères. En effet, les modifications génétiques sont également des moteurs de l'évolution soumis à la sélection naturelle et sont, par conséquent, à l'origine de la biodiversité. Ces modifications permettent ainsi l'adaptation des différentes espèces aux variations de l'environnement au cours des générations.

Ainsi, pour assurer un juste équilibre entre stabilité du génome et diversité, une régulation précise des processus de réparation est primordiale. Lors de ma thèse, je me suis intéressée au mécanisme de réparation des dommages par RH et plus particulièrement aux gènes impliqués dans la régulation d'une des étapes clé de ce processus, la formation des nucléofilaments composés de multiples monomères de la recombinaise RAD51.

II. La Recombinaison Homologue (RH)

Le mécanisme de recombinaison, retrouvé chez tous les organismes, est caractérisé par un échange ou transfert d'information génétique entre deux molécules d'ADN. Le processus de RH consiste en l'appariement d'un fragment d'ADN endommagé avec une séquence homologue intacte utilisée comme matrice lors de la synthèse réparatrice. Si les séquences sont localisées au même locus, on parle de recombinaison allélique. En revanche, si elles sont situées à deux locus différents, on parle alors de recombinaison ectopique. La RH est l'une des voies majeures de réparation des cassures de l'ADN et elle est également impliquée dans le redémarrage des fourches de réplication bloquées à une lésion. Toutefois, les rôles de la RH ne se limitent pas à la réparation des dommages de l'ADN dans les cellules végétatives.

Bien que mes travaux de thèse se concentrent exclusivement sur la RH mitotique, la RH remplit également une fonction essentielle lors de la méiose. La RH méiotique est initiée par la formation de CDB induites en des points chauds par l'enzyme Spo11. Ainsi, durant la première

division méiotique, également appelée division réductionnelle, la RH assure l'appariement correct des chromosomes homologues en créant une connexion physique entre ces derniers. Cette étape est requise pour la bonne ségrégation de chacune des paires de chromosomes et garantit une répartition parfaite du matériel génétique dans chaque gamète. D'autre part, la résolution des intermédiaires de recombinaison formés joue également un rôle crucial dans l'échange réciproque de matériel génétique entre les chromosomes « maternels » et « paternels » et participe ainsi à la diversité génétique (pour revue : Ito & Shinohara, 2023).

Chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*, la RH est également essentielle à la commutation du type sexuel. Ce mécanisme permet à une cellule haploïde en croissance végétative de donner naissance à des cellules filles de signes opposés. Les cellules sœurs de types sexuels différents peuvent ensuite fusionner et produire des zygotes diploïdes qui pourront à leur tour se multiplier par bourgeonnement. Cette capacité à engendrer des diploïdes à partir de cellules haploïdes confère un certain avantage aux levures qui sont alors capables de mieux réparer les dommages à l'ADN. En effet, dans les cellules diploïdes, la chromatide sœur mais également le chromosome homologue peuvent être utilisés comme matrice pour la réparation des CDB (pour revue : Haber, 2012).

La RH assure également la stabilité des télomères au travers de la voie de prolongation alternative des télomères (ou voie ALT, Alternative Lengthening of Telomeres), notamment dans les cellules où aucune activité télomérase n'est détectée. Cependant, le mécanisme de la voie ALT est encore mal compris (pour revue : Hou et al., 2022).

Le mécanisme de RH est donc impliqué dans de nombreux processus cellulaires essentiels et nécessite, par conséquent, d'être très finement régulé. En effet, une recombinaison incontrôlée engendre inévitablement diverses complications tels qu'une perte d'hétérozygotie (ou loss of heterozygosity en anglais, LOH) ou encore des réarrangements chromosomiques délétères entre séquences répétées et dispersées dans le génome (So et al., 2017; Wright et al., 2018). Un manque de contrôle de la RH peut également être associé au phénomène de toxicité provoqué par la formation de structures de recombinaison néfastes pour les cellules tels que des intermédiaires de recombinaison non résolus ou encore des structures nucléoprotéiques stériles, bloquées et non éliminées (Fabre et al., 2002; Shah et al., 2010; Esta et al., 2013; Keyamura et al., 2016). De ce fait, plusieurs facteurs permettent de limiter les événements de recombinaison. D'une part, la taille et la divergence des séquences homologues à recombiner ainsi que des modifications épigénétiques de l'ADN influent fortement sur l'efficacité de recombinaison (Fujitani et al., 1995; Fujitani & Kobayashi, 1999; Colot & Rossignol, 1999). D'autre part, de

nombreuses protéines contribuent au contrôle du processus de recombinaison et leur mutation peut altérer dangereusement le mécanisme de réparation par RH.

Dans cette seconde partie de l'introduction, je présenterai, dans un premier temps, les différents mécanismes proposés à ce jour pour expliquer le processus de réparation des dommages de l'ADN par RH. A la suite de ces mécanismes, je décrirai les gènes impliqués dans la voie de RH.

A. Mécanismes de la recombinaison homologue

D'après les premières études menées sur la ségrégation méiotique de marqueurs phénotypiques chez les champignons filamenteux et la levure, l'échange d'information génétique observé lors de la RH aboutit à deux types de produits différents : la conversion génique (CG) ou les crossing-over (CO).

La CG est définie par un transfert unilatéral de l'information génétique entre les deux molécules d'ADN homologues. Cela se traduit par la perte d'un allèle porté par une chromatide d'un chromosome remplacé par un autre allèle venant d'une chromatide du chromosome homologue. Ainsi, la CG conduit à la duplication d'un des allèles et permet d'expliquer les ségrégations non mendéliennes des marqueurs en méiose et en mitose. Les CO correspondent à un échange réciproque d'informations entre les deux molécules d'ADN homologues. Les CO sont caractérisés par des réarrangements de marqueurs flanquant les régions échangées qui suivent alors les lois mendéliennes.

Les premières études génétiques ont montré que les événements de CG et de CO étaient fréquemment associés (Fogel & Hurst, 1967; Fogel & Mortimer, 1969; Hurst et al., 1972). Ainsi, l'existence d'un mécanisme commun permettant d'expliquer à la fois l'apparition de la CG et des CO est alors apparue comme une évidence.

Depuis le premier modèle de Robin Holliday (Holliday, 1964), de nombreux modèles ont été proposés afin d'expliquer le mécanisme complexe de la RH. Ces mécanismes sont séparés en trois voies distinctes : la conversion génique retrouvée notamment dans les voies DSBR et SDSA, la voie BIR et la voie SSA.

1. Voie DSBR (Double-Strand Break Repair) ou modèle de Szostak

Inspiré des premiers modèles de recombinaison proposés par Robin Holliday (Holliday, 1964) et par Meselson et Radding (Meselson & Radding, 1975), le modèle proposé par Szostak dans les années 1980, également appelé voie de réparation des CDB (ou Double-Strand Break Repair, DSBR), suggère que les intermédiaires d'ADN formés à la suite d'une CDB initiatrice sont à l'origine des produits de CG, associés ou non aux CO, observés lors de la RH (Orr-Weaver et al., 1981; Szostak et al., 1983).

Dans ce modèle, le processus de réparation par RH, présenté dans la figure 2a, se divise en trois phases distinctes : présynaptique, synaptique et postsynaptique. La phase présynaptique, ou phase d'initiation, consiste en la formation d'une CDB suivie de la résection de l'ADN au niveau du site de cassure. Le modèle d'origine postulait une dégradation des deux brins de chacune des extrémités de la cassure (5'-P et 3'-OH). Or, il a été observé que cette étape de résection présente une polarité 5'-3', générant des fragments d'ADN simple-brin (ADNsb) 3' sortants (White & Haber, 1990; Sun et al., 1991). Ces extrémités 3' sortantes sont ensuite prises en charge par un système enzymatique capable de scanner le génome afin de détecter une séquence homologue intacte au brin lésé qui servira de matrice pour initier la synthèse réparatrice. Afin de réparer les cassures, la RH utilise comme matrice soit la chromatide sœur lors des phases S et G2, soit le chromosome homologue dans les cellules diploïdes. Lors de la phase synaptique, une fois la région homologue identifiée, le fragment d'ADNsb 3' envahit la molécule d'ADN double-brin (ADNdb) et s'apparie au brin complémentaire, résultant en la formation d'un hétéroduplex d'ADN et d'une structure intermédiaire appelée boucle de déplacement (ou Displacement loop, D-loop). La dernière étape de la RH, ou phase post-synaptique, correspond à la synthèse réparatrice du brin lésé au sein de la D-loop. Cette synthèse utilise comme matrice le brin complémentaire et permet de restaurer l'information génétique endommagée par la cassure à partir de l'extrémité 3' envahissante. De plus, cette étape de synthèse s'accompagne d'un déplacement de la D-loop. Une fois l'étape de synthèse étendue au-delà de la région lésée, la seconde extrémité de la cassure est capturée par la D-loop et s'apparie au brin déplacé, conduisant à la formation d'un second hétéroduplex d'ADN. Le brin déplacé sert à son tour de matrice lors d'une deuxième réaction de polymérisation. La ligation des régions d'ADN néosynthétisé aux extrémités 5' aboutit à la formation d'une structure appelée double jonction de Holliday (djH) (Szostak et al., 1983). Des structures branchées correspondant à des djH ont été détectées physiquement lors de la méiose par électrophorèse en gels bidimensionnels, confortant le modèle de Szostak

(Collins & Newlon, 1994; Schwacha & Kleckner, 1994, 1995, 1997). Enfin, les djH peuvent être prises en charge par deux mécanismes différents, la résolution ou la dissolution. En fonction du clivage des jonctions, la résolution des djH conduit à la formation de produits de CG, associés ou non à des événements de CO, tandis que la dissolution des djH, assurée par un complexe hélicase-topoisomérase, ne génère pas de CO. Les hétéroduplex d'ADN, formés lors de l'étape d'envahissement ou de capture de la seconde extrémité, sont composés de deux brins d'origine parentale différente. Ces brins peuvent ne pas être rigoureusement complémentaires et donc présenter des mésappariements. En fonction de leur réparation par le système MMR, ces mésappariements peuvent résulter en des événements de CG où l'une des informations parentales est remplacée par l'information génétique du second parent.

Le modèle DSBR suggère donc que la résolution aléatoire des djH résulte en un nombre équivalent d'événements de conversion associés ou non aux CO, ce qui a bien été constaté dans les expériences de Szostak (Szostak et al., 1983). Or, dans certains cas, la proportion des produits de CO est inférieure à celle des événements de CG, voire même rare dans les cellules mitotiques (pour revue : Pâques & Haber, 1999; Symington, 2002). Cela s'explique notamment par le fait que la production de CO peut entraîner des pertes d'hétérozygotie ou des réarrangements chromosomiques délétères pour la cellule, notamment si cela survient dans les cellules somatiques. Par conséquent, la voie DSBR n'étant pas la voie majoritairement retrouvée dans les cellules végétatives, l'existence d'un modèle alternatif ne générant que des événements de conversion a émergé.

2. Voie SDSA (Synthesis-Dependent Strand-Annealing)

Chez la levure *S. cerevisiae*, la commutation du type sexuel est un processus rarement associé aux CO (Nasmyth, 1982; McGill et al., 1989). Initié par l'induction d'une CDB par l'endonucléase HO (*homothallic switching endonuclease*) au niveau d'une séquence spécifique située au locus *MAT*, ce changement de type sexuel résulte en un échange unilatéral entre les séquences receveuses $Y\alpha$ ou $Y\alpha$ et les séquences donneuses *HML α* et *HMR α* , toutes localisées sur le chromosome III (Strathern et al., 1982; Kostriken et al., 1983). Les cellules *MAT α* ont alors la possibilité de commuter spécifiquement en cellules *MAT α* et réciproquement. Ce processus promeut donc la génération d'événements de CG de manière unidirectionnelle.

La réparation d'une CDB par excision d'éléments P transposables chez *Drosophila melanogaster* présente également une faible fréquence de CO (Gloor et al., 1991; Nassif et al., 1994). Un modèle alternatif au DSBR, appelé modèle d'appariement de brin dépendant de la

synthèse (ou Synthesis-Dependent Strand-Annealing, SDSA) a ainsi pu être proposé (Nassif et al., 1994). Ce modèle alternatif permet de rendre compte de la faible association des événements de CG avec des CO observés également chez d'autres organismes comme la bactérie *Escherichia coli* ou encore le champignon *Ustilago maydis* (Mueller et al., 1996; Ferguson & Holloman, 1996).

D'un point de vue mécanistique, les premières étapes du modèle SDSA sont similaires à celles décrites précédemment dans le modèle DSBR et mènent à la formation de la D-loop et à l'initiation de la synthèse réparatrice (Figure 2b). Une fois la synthèse suffisamment étendue au-delà de la région lésée, le brin envahissant est déplacé et peut s'hybrider avec la seconde extrémité 3' sortante issue de la cassure, entraînant la dissolution de la D-loop. Le brin néosynthétisé est alors utilisé comme matrice pour permettre la polymérisation de l'extrémité 3' non envahissante. Enfin, la ligation des brins restaure l'information génétique portée par la molécule d'ADN sans produire de CO. Ainsi, le modèle SDSA est un modèle considéré comme conservatif dans lequel, généralement, seule la molécule receveuse, contenant l'ADN nouvellement synthétisé, est modifiée et non la molécule donneuse ayant servi de matrice lors de la synthèse (Pâques et al., 1998).

Ainsi, la différence entre les deux modèles réside dans le fait que, contrairement à la voie DSBR, la voie SDSA n'implique ni formation ni résolution de djH, prévenant la production de CO (Porter et al., 1993; Gilbertson & Stahl, 1996; H. H. Nelson et al., 1996). Cela a été conforté par la détection d'une nouvelle structure intermédiaire branchée à trois brins, les invasions simple-brin (ou Single-End Invasion, SEI) (Hunter & Kleckner, 2001). Bien qu'étant de potentiels précurseurs à la formation de djH, ces structures SEI peuvent également être considérées comme des structures intermédiaires spécifiquement résolues par la voie SDSA.

Il est à noter que les modèles DSBR et SDSA ne seraient pas exclusifs. En effet, les travaux de Allers et Lichten ont révélé que, de manière surprenante, les événements de CG apparaissaient avant les produits de CO et non simultanément durant la méiose, suggérant que la voie DSBR est à l'origine de la production de CO tandis que la voie SDSA est majoritairement responsable des événements de conversion (Allers & Lichten, 2001).

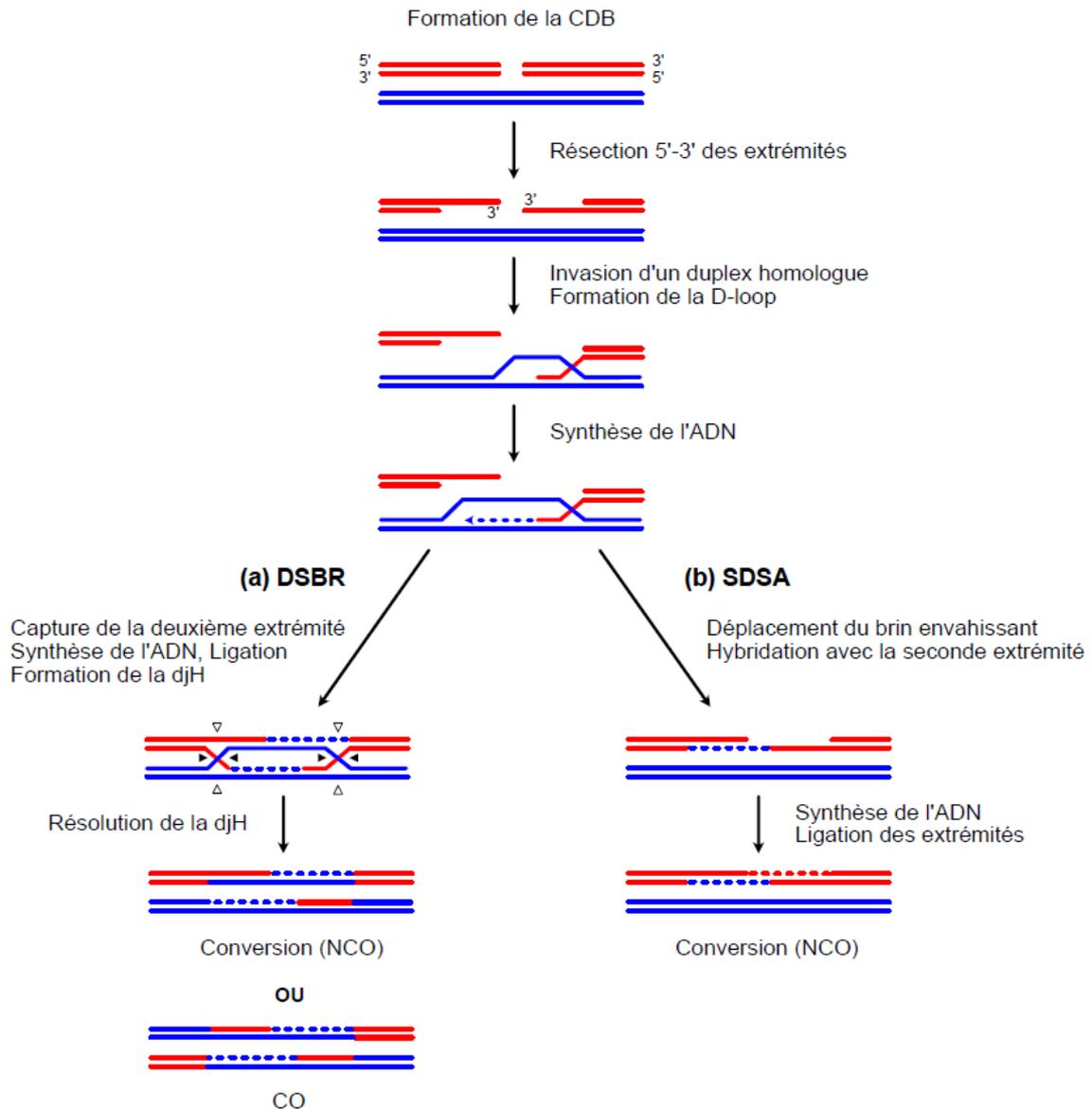


Figure 2. Modèles pour la réparation des CDB par les voies de CG : les voies DSBR et SDSA (d'après San Filippo et al., 2008)

Le processus de réparation d'une CDB est initié par une étape de résection 5'-3' de l'ADN localisé autour du site de cassure (en rouge). L'une des extrémités 3' procède à la recherche d'homologie puis à l'invasion d'une molécule d'ADN intacte et homologue (en bleu). Cette étape d'envahissement entraîne la formation de la D-loop, initiant la synthèse réparatrice.

(a) Dans le modèle DSBR, la seconde extrémité 3' de la cassure s'apparie avec le brin déplacé de la D-loop, induisant un deuxième événement de polymérisation. La ligation des extrémités génère la formation d'une djH dont la résolution peut conduire à la formation de produits de conversion (NCO, triangles blancs) ou des produits de CO (triangles noirs).

(b) Dans le modèle SDSA, une fois la synthèse suffisamment étendue, le brin envahissant est déplacé de la D-loop et s'hybride avec la seconde extrémité de la cassure. Les lacunes sont comblées par synthèse de l'ADN puis la ligation réunit les extrémités 5' et 3' afin de reformer la continuité de la molécule, sans générer de CO.

3. Voie BIR (Break-Induced Replication)

Dans les modèles DSBR et SDSA présentés précédemment, les événements de conversion observés en croissance végétative sont de l'ordre de quelques kilobases (kb), selon les systèmes génétiques utilisés lors des différentes études. Cependant, des événements de conversion de longueurs nettement plus importantes, allant de quelques centaines de kb jusqu'à des bras de chromosome entier, ont été constatés (Esposito, 1978; Golin & Esposito, 1984; Malkova et al., 1996). Ces événements ont également été observés lors des études de Malkova et Morrow qui sont à l'origine du modèle de réplication induite par les cassures (ou Break-Induced Replication, BIR) (Malkova et al., 1996; Morrow et al., 1997).

Le modèle décrivant la voie BIR est inspiré des mécanismes de recombinaison induite par la réplication retrouvés chez le bactériophage T4 et la bactérie *E. coli* (Mosig, 1987; Kogoma, 1997). Chez les eucaryotes, la voie BIR est impliquée dans la prise en charge des CDB dont la seconde extrémité est perdue ou absente, l'homologie n'étant alors présente que d'un seul côté de la cassure. La voie BIR pourrait ainsi avoir un rôle important dans le redémarrage des fourches de réplication endommagées par une CDB (Cortés-Ledesma & Aguilera, 2006; Mayle et al., 2015; S. Li et al., 2021). Par ailleurs, cette voie pourrait également intervenir dans le maintien de l'intégrité des télomères en absence des télomérases (Le et al., 1999; Lydeard et al., 2007; Dilley et al., 2016; Roumelioti et al., 2016; Batté et al., 2017).

Comme les voies précédentes, la réparation d'une CDB par la voie BIR nécessite une résection 5'-3' de l'ADN avant de procéder à la recherche d'homologie puis à l'invasion d'un duplex homologue (Figure 3). La synthèse de l'ADN peut alors s'étendre sur des centaines de kb jusqu'à l'extrémité du chromosome grâce à l'intervention de protéines impliquées dans la machinerie de réplication utilisée lors de la synthèse en phase S des brins codants et transcrits (Lydeard et al., 2007, 2010). Toutefois, la machinerie de réplication reformée est incomplète et montre une mutagenèse importante.

La voie BIR possède sa propre structure intermédiaire appelée bulle migratrice, détectée physiquement par électrophorèse en gels bidimensionnels (Saini et al., 2013). La synthèse de l'ADN, qui entraîne la migration de cette bulle, résulte en l'héritage conservatif des deux brins néosynthétisés. De ce fait, ce mécanisme aboutit à la perte de l'information génétique portée par le chromosome endommagé à partir de la cassure (Donnianni & Symington, 2013; Saini et al., 2013; Wilson et al., 2013). Par ailleurs, la synthèse asynchrone des brins continus et discontinus conduit à l'accumulation d'ADNs_b derrière la bulle migratrice et rend la voie BIR hautement mutagène (Deem et al., 2011; Saini et al., 2013; Sakofsky et al., 2014; Osia et al.,

2022). De plus, la bulle migratrice est une structure peu stable qui conduit à des changements de matrice fréquents et génère donc plusieurs cycles d'invasion, de synthèse et de dissociation (C. E. Smith et al., 2007; R. P. Anand et al., 2014). Par conséquent, la voie BIR induit des réarrangements chromosomiques complexes (Bosco & Haber, 1998; Deem et al., 2008; C. E. Smith et al., 2009; Pardo & Aguilera, 2012; R. P. Anand et al., 2014; Vasan et al., 2014; Sakofsky et al., 2015; Elango et al., 2019). Ainsi, à la différence des voies DSBR et SDSA, la voie BIR est une voie de réparation conduisant à la perte de l'information génétique présente sur le brin endommagé.

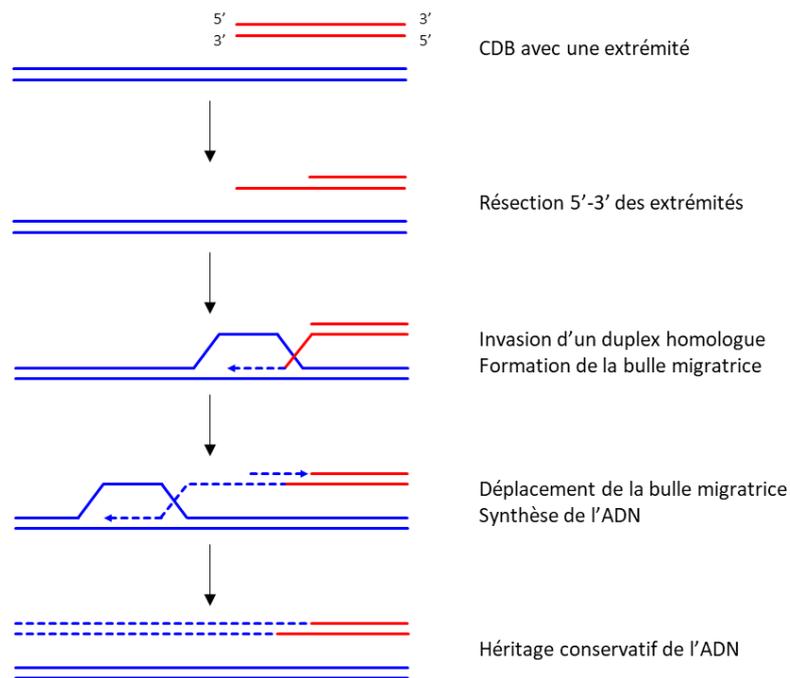


Figure 3. Modèle pour la réparation des CDB par la voie BIR (d'après Elango et al., 2018)

Le processus de réparation d'une CDB est initié de la même manière que pour les voies précédentes : résection 5'-3', recherche d'homologie, invasion d'un duplex homologue et initiation de la synthèse réparatrice. La bulle migratrice alors formée permet d'étendre la synthèse du brin continu qui servira de matrice à la polymérisation du brin discontinu. Cette synthèse entraîne l'accumulation d'ADNsb à l'arrière de la bulle migratrice. En l'absence d'une seconde extrémité de la CDB, la synthèse progresse jusqu'à l'extrémité du chromosome et aboutit à l'héritage conservatif du chromosome nouvellement synthétisé et, par conséquent, à une perte d'information.

4. Voie SSA (Single-Strand Annealing)

Tandis que les voies précédemment décrites reposent toutes sur l'invasion d'une molécule homologue afin d'assurer la réparation de l'ADN endommagé, il existe un mécanisme alternatif de recombinaison dans lequel cette étape d'invasion n'est pas requise mais où l'appariement de brins complémentaires est essentiel. Cela signifie que, chez la levure, ce mécanisme est indépendant de la recombinaison Rad51, protéine responsable de la recherche

d'homologie et de l'invasion de brin (voir la section B.2.b). En revanche, ce mécanisme nécessite la protéine Rad52, une protéine majeure de la RH (voir la section B.2.c). Ainsi, la voie d'appariement des simples brins (ou Single-Strand Annealing, SSA), proposée à l'origine pour expliquer le mécanisme de réparation des CDB chez les mammifères et conservée chez tous les eucaryotes, est retrouvée lorsqu'une CDB survient au niveau d'une séquence unique, située entre deux séquences répétées orientées dans le même sens et présentes sur le même chromosome (F.-L. Lin et al., 1984; Maryon & Carroll, 1991; Fishman-Lobell et al., 1992).

Le modèle de réparation d'une CDB par la voie SSA est présenté dans la figure 4. Comme pour les voies précédentes, le processus de réparation est initié par une étape de résection de polarité 5'-3'. Lorsque la résection est suffisamment étendue pour découvrir les séquences répétées situées de part et d'autre de la CDB, ces régions s'apparient en générant la formation de queues d'ADNs 3' sortantes. Ces queues d'ADNs sont clivées par l'action de nucléases afin d'initier la synthèse réparatrice puis la ligation des extrémités. Par conséquent, le mécanisme SSA est un processus non conservatif qui résulte en la perte des séquences localisées entre les répétitions ainsi que d'une des répétitions.

L'efficacité de réparation par la voie SSA dépend fortement de la taille des régions répétées mais également de la distance séparant les répétitions. Ainsi, seulement 0,4% des cellules survivent lorsque la taille des répétitions est inférieure à 30 paires de bases (pb). Néanmoins, l'efficacité de réparation par SSA augmente progressivement avec la taille des régions, passant à 50% de survie cellulaire avec des régions homologues de 200 pb et pouvant atteindre jusqu'à 100% d'efficacité lorsque les régions mesurent au minimum 400 pb (Sugawara et al., 2000). Ce mécanisme reste également très efficace même lorsque les répétitions sont séparés de 15 kb ou 25 kb (Rudin et al., 1989; Vaze et al., 2002).

D'autre part, les expériences de Fishman-Lobell ont mis en évidence que, bien qu'indépendantes, les voies de CG et SSA sont en concurrence pour la prise en charge des CDB située entre deux séquences répétées. Cependant, les événements de délétion étant plus nombreux que les produits de CG, la voie SSA serait la voie majoritairement utilisée (Fishman-Lobell et al., 1992).

En résumé, tandis que les voies DSBR et SDSA sont initiées lorsque les deux extrémités de la CDB sont disponibles, les voies BIR et SSA sont deux voies requises à la réparation de CDB dans des conditions particulières. De plus, à la différence des mécanismes de CG, les voies BIR et SSA opèrent au travers de mécanismes non conservatifs associés à une perte

d'information génétique. Par conséquent, les voies de CG semblent être plus favorables à la préservation de l'intégrité génétique que les voies BIR et SSA.

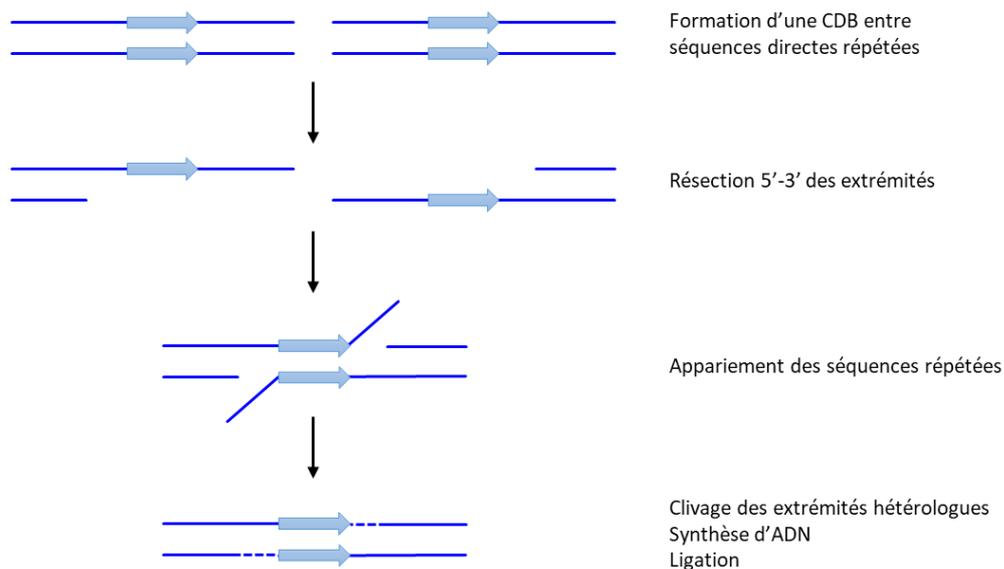


Figure 4. Modèle pour la réparation des CDB par la voie SSA (d'après Krogh & Symington, 2004) Dans le modèle SSA, la résection étendue des extrémités permet d'exposer les régions d'homologie (flèches bleues) présentes sur le même chromosome. Les régions homologues s'apparient, induisant la perte de l'information génétique située entre les répétitions et la perte d'une des répétitions.

5. La RH et les fourches de réplication endommagées

Durant la phase S, l'accumulation de lésions de l'ADN, qu'elles soient d'origine exogène ou endogène, met en péril l'intégrité des fourches de réplication et, par conséquent, compromet la synthèse de l'ADN. En effet, la présence d'obstacles, tels que des bases endommagées, des complexes protéines-ADN, des structures secondaires de l'ADN ou encore la déplétion en dNTP due à un agent génotoxique comme l'hydroxyurée (HU), provoque le ralentissement, voire l'arrêt des fourches de réplication. Ce phénomène, appelé stress réplcatif, impacte dangereusement la stabilité génétique et est associé au développement de cellules cancéreuses (pour revue : Gaillard et al., 2015). Il est donc crucial qu'une bonne coordination soit mise en place entre les processus de réplication et de réparation de l'ADN afin que les dommages qui pourraient entraver la progression des fourches de réplication soient efficacement réparés ou ignorés. Le rôle des mécanismes de réparation est donc de garantir une transmission sans défaut et complète de l'information génétiques aux cellules filles lors de la mitose.

Afin d'assurer la réplication complète du génome, les cellules ont développé plusieurs systèmes capables de contourner les lésions pour éviter le blocage des polymérase réplcatives et par conséquent celui complet des fourches de réplication. Un premier mécanisme de contournement est associé à un réamorçage de la synthèse derrière la lésion qui dépend en partie de la polymérase PrimPol chez les mammifères (Bianchi et al., 2013; Kobayashi et al., 2016). Chez la levure, la protéine responsable du réamorçage n'a pas encore été identifiée. Ce redémarrage des fourches en aval de la lésion induit la formation d'ADNsb, également qualifié de brèche, sur le brin néosynthétisé (ou daughter-strand gap) (Fabre et al., 2002; Lettier et al., 2006; Lopes et al., 2006; R. P. Wong et al., 2021). La prise en charge de ces portions d'ADNsb est assurée par les voies de DDT, abordées dans la section I.A. Ces voies de DDT reposent sur deux mécanismes distincts : l'utilisation de polymérase translésionnelles *via* la voie de STL (L. Zhao & Washington, 2017), ou l'utilisation d'une matrice homologue, généralement la chromatide sœur, par les voies de TS et de RH (Branzei & Szakal, 2016). Le choix de la voie DDT utilisée pour réparer les dommages laissés derrière la fourche dépend du complexe de processivité des polymérase PCNA, assemblé en forme d'anneau autour de l'ADN (Moldovan et al., 2007). Ce sont plus particulièrement les formes modifiées de PCNA qui influencent ce choix. Chez la levure, les différentes modifications post-traductionnelles de PCNA, présentées dans la figure 5, sont médiées par les complexes Rad6/Rad18 et Rad5-Ubc13/Mms2 (Hoege et al., 2002; Kanao & Masutani, 2017). Ce contrôle par les différentes formes modifiées de PCNA semble conservé chez les eucaryotes supérieurs (L. Fan et al., 2020). Il est à noter que, à la différence de la voie de TS, la voie de RH ne dépend pas des modifications de PCNA.

La mono-ubiquitination de PCNA (PCNA-Ub) par le complexe d'ubiquitine ligase Rad6-Rad18 au niveau de la lysine conservée K164 contribue au recrutement des polymérase translésionnelles au niveau de la lésion (Hoege et al., 2002; Stelter & Ulrich, 2003; Kannouche et al., 2004; Niimi et al., 2008). Chez la levure, ont été référencées la polymérase Pol η codée par le gène *RAD30*, la polymérase Pol ζ dont le site catalytique est codé par le gène *REV3* et associé à un gène accessoire *REV7*, et enfin la polymérase Rev1 (J. R. Nelson et al., 1996a, 1996b). Il en existe quatre supplémentaires chez les vertébrés : les polymérase ι , κ , θ et ν (Goodman & Woodgate, 2013; Sale, 2013; Vaisman & Woodgate, 2017). Les polymérase translésionnelles sont différentes des polymérase réplcatives puisqu'elles sont moins fidèles en raison de leur site actif plus flexible et ne possèdent pas d'activité exonucléase 3'-5' pour corriger les erreurs de synthèse. Ces polymérase sont donc capables de synthétiser à partir d'une matrice de l'ADN endommagé, incorporant des nucléotides face à des bases altérées par

diverses modifications. Ainsi, la faible fidélité de ces polymérases translésionnelles rend la voie STL sujette aux erreurs de synthèse. Par ailleurs, des études menées chez la levure ont permis d'établir que la polymérase Pol ζ , capable notamment de prendre en charge les dimères de pyrimidines induits par les rayons UV, est responsable d'une grande partie de la mutagenèse induite par les dommages mais également spontanée (Lemontt, 1972; Quah et al., 1980). Il est donc essentiel de contrôler le recrutement et l'action des polymérases de la voie STL au profit de voies de tolérance plus fidèles.

L'ajout d'une poly-chaine d'ubiquitine à PCNA-Ub par le complexe Rad5-Ubc13/Mms2 favorise la mise en place d'un changement de matrice par la voie TS au détriment de la voie STL (Hoegge et al., 2002; H. Zhang & Lawrence, 2005). Cette modification supplémentaire de PCNA prévient ainsi la mutagenèse associée à la voie STL (Chiu et al., 2006). Deux modèles ont été proposés pour le mécanisme de changement de matrice. Dans le premier modèle, le changement de matrice mène à la formation d'une jonction entre les chromatides sœurs donnant place à une structure en forme de X, détectée par électrophorèse sur gels bidimensionnels (Branzei et al., 2008; Minca & Kowalski, 2010). Ce changement de matrice repose sur la présence de protéines clé de la RH telles que Rad51 et Rad52 (Liberi et al., 2005; González-Prieto et al., 2013). Le mécanisme liant PCNA poly-ubiquitiné et la RH n'est pas compris. Une fois la chromatide sœur envahie, elle sert alors de matrice lors de la synthèse d'ADN assurée par la polymérase Pol δ (Vanoli et al., 2010). D'autre part, la sumoylation de PCNA favorise le recrutement de l'hélicase Srs2, présentée dans la section B.4.d, qui supprime les événements de RH pour des raisons qui demeurent méconnues (Papouli et al., 2005; Pfander et al., 2005; Branzei et al., 2008; Karras et al., 2013). Le second modèle de changement de matrice suggère une réversion de fourche, conduisant à la formation d'une jonction à quatre brins, similaire à une jonction de Holliday et qualifiée de « patte de poulet » (Neelsen & Lopes, 2015; Berti et al., 2020). Ce remodelage représente un second mécanisme de contournement des dommages. Chez les mammifères, la réversion de fourches est un modèle de stabilisation des fourches bloquées assez prisé qui nécessite d'être plus amplement exploré. D'un point de vue mécanistique, il a été proposé que la régression de fourche impliquerait divers acteurs, y compris la recombinase RAD51 dont la fonction précise dans ce remodelage reste à être caractérisée (Neelsen & Lopes, 2015; Zellweger et al., 2015; Quinet et al., 2017; Bhat & Cortez, 2018). Les fourches remodelées seraient ensuite protégées contre l'activité de dégradation des nucléases par RAD51 et certains de ses régulateurs tels que la protéine médiatrice BRCA2 (voir la section B.2.c) et les protéines paralogs de RAD51 (voir la section

B.2.d) (Hashimoto et al., 2010; Schlacher et al., 2011; Somyajit et al., 2015; Mijic et al., 2017). De manière intéressante, l'implication de l'activité catalytique de RAD51 dans la réversion de fourche demeure un sujet d'étude tandis qu'il semble établi que cette activité n'ait aucun effet sur la fonction de protection (Mason et al., 2019; Thomas et al., 2023). Enfin, il a été proposé que le redémarrage de fourches réversées pourrait être assuré par une invasion de brin par RAD51, créant une structure semblable à une D-loop (Petermann et al., 2010; Mason et al., 2019). Le redémarrage de la synthèse reposerait alors sur la voie de réplication dépendante de la recombinaison (RDR), dépendante du recrutement des protéines de la RH (Hashimoto et al., 2010).

Ainsi, les brèches simple-brin peuvent être prises en charge par les différentes voies de DDT. Cela suggère que ces voies sont capables de se compenser lorsque l'une d'elles est défaillante. Par exemple, l'absence de Rad51 impacte peu la survie cellulaire après exposition aux UV. En revanche, la délétion concomitante de la sous-unité Rev3 de la polymérase Pol ζ induit une forte sensibilité des cellules diploïdes aux UV, mettant clairement en évidence l'existence d'une compensation entre les voies STL et RH (Tellier-Lebegue et al., 2017). Néanmoins, il existe une balance entre les voies STL et RH qui régule le niveau de mutagenèse. Une augmentation de la fréquence de mutagenèse induite par la voie STL est observée dans les cellules déficientes pour *RAD51* et *RAD52* (Kunz et al., 1998). L'existence d'une compétition entre ces voies a longtemps été étudiée chez la bactérie *E. coli* ainsi que chez la levure (W. Ma et al., 2013; X. Xu et al., 2013; Fuchs, 2016; Fujii et al., 2018; Maloisel et al., 2023). Plus récemment, l'équipe de Vincent Pagès a démontré qu'un défaut d'installation du filament RecA, protéine orthologue à Rad51 chez *E. coli*, favorise le recrutement de la voie STL (Laureti et al., 2022). De plus, cette étude a également mis en évidence le rôle crucial de protéines médiatrices dans l'installation et la stabilisation des filaments RecA. Ces résultats sont en corrélation avec ceux obtenus lors d'études portant sur des protéines médiatrices capables de stabiliser les filaments Rad51 chez la levure *S. cerevisiae* (X. Xu et al., 2013; Maloisel et al., 2023). Ces études montrent également que ces protéines contrôlent le taux de mutagenèse induite par la voie STL.

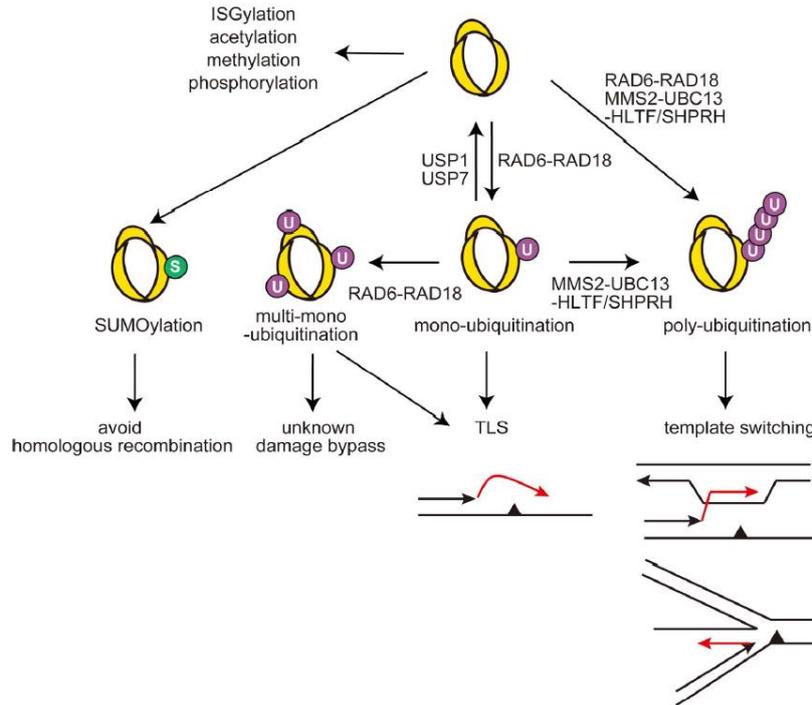


Figure 5. Les modifications post-traductionnelles de PCNA et leurs conséquences (Kanao & Masutani, 2017)

La mono-ubiquitination de PCNA par le complexe enzymatique Rad6-Rad18 mène à l'engagement dans la voie de STL. Le changement de matrice est initié par la poly-ubiquitination de PCNA *via* divers enzymes. Enfin, la SUMOylation de PCNA inhibe la recombinaison homologue, notamment *via* le recrutement de l'hélicase Srs2.

B. Les protéines impliquées dans la recombinaison homologue

Chez les eucaryotes, un grand nombre de protéines interviennent dans les différents mécanismes de réparation des dommages à l'ADN par RH et participent à la régulation des nombreuses étapes du processus.

Le groupe d'épistasie du gène *RAD52* regroupe une large partie de ces protéines, identifiées initialement chez la levure au travers d'expériences de sensibilité aux radiations ionisantes (Game & Mortimer, 1974). Le groupe d'épistasie de *RAD52* comprend les gènes suivants : *MRE11*, *XRS2*, *RAD50*, *RAD51*, *RAD52*, *RAD54*, *RDH54/TID1*, *RAD55*, *RAD57* et *RAD59*. Ces gènes, hautement conservés au sein des eucaryotes, sont impliqués plus particulièrement dans les étapes précoces de la RH que sont la résection de l'ADN, la recherche d'homologie, l'invasion du duplex homologue et l'initiation de la synthèse réparatrice. Cependant, bien que ces protéines se retrouvent classées dans un même groupe, leurs fonctions divergent dans la régulation du processus de RH.

Il existe d'autres acteurs impliqués dans la régulation du processus de RH qui n'appartiennent pas au groupe d'épistasie *RAD52* que je décrirai également.

1. Résection de l'ADN

Le processus de RH, bien mieux caractérisé pour la réparation des CDB, débute par une étape de résection 5'-3' de l'ADN localisé autour de la cassure. Cette résection est divisée en deux étapes avec, en premier lieu, une initiation du processus de résection sur une courte distance, suivie par une résection étendue. Des expériences de biologie moléculaire et des analyses d'imagerie sur cellules vivantes ont permis de déterminer que la cinétique de résection de l'ADN est en moyenne de 4 kb/h et qu'elle peut s'étendre sur plusieurs centaines de nucléotides (Fishman-Lobell et al., 1992; Vaze et al., 2002; Zhu et al., 2008).

Le premier acteur à détecter et à fixer la CDB est le complexe *MRE11-RAD50-XRS2* (MRX) chez la levure ou le complexe *MRE11-RAD50-NBS1* (MRN) dans les cellules de mammifères (Lisby et al., 2004; Lisby & Rothstein, 2009). La capacité du complexe MRX/MRN à lier la CDB lui permet de maintenir les deux extrémités de la cassure à proximité l'une de l'autre (L. Chen et al., 2001; Jager et al., 2001; Lobachev et al., 2004). La fixation du complexe MRX/MRN à la CDB est également nécessaire au recrutement des protéines de signalisation des dommages telles que les kinases Tel1 chez la levure et ATM chez les mammifères (D'Amours & Jackson, 2002; J.-H. Lee & Paull, 2005; Deshpande et al., 2014; Cassani et al., 2019). Enfin, le complexe MRX/MRN est requis pour l'initiation de la résection 5'-3' de l'ADN (figure 6a).

Selon de récentes expériences de cryo-microscopie électronique (cryo-EM), *MRE11*, *RAD50* et *XRS2/NBS1* forment un hétéropentamère stable, composé de deux copies de la sous-unité *MRE11-RAD50*, hautement conservée au sein du vivant, associées à une copie du gène *XRS2/NBS1* uniquement retrouvé chez les eucaryotes (Rotheneder et al., 2023). La protéine Mre11 est la sous-unité catalytique composée de cinq motifs phosphoestérase, conservés dans sa partie N-terminale, essentiels à ses activités endonucléase et exonucléase 3'-5' (Paull & Gellert, 1998; Trujillo et al., 1998; Usui et al., 1998; Trujillo & Sung, 2001). Il est intéressant de noter que l'activité enzymatique de Mre11 est à l'opposé de la résection 5'-3' nécessaire à l'initiation de la réparation. La protéine Rad50, appartenant à la famille des SMC (pour Structural Maintenance of Chromosomes), régule l'activité de Mre11 grâce à sa capacité de liaison et d'hydrolyse de l'ATP. La dimérisation de Mre11 avec Rad50 stimule l'hydrolyse de l'ATP par cette dernière, à l'origine d'un changement conformationnel de la sous-unité Mre11-Rad50 vers un état actif permettant d'exposer les sites nucléases de Mre11 à l'ADN (H. S. Lim et al., 2011; Möckel et al., 2012; Cannavo et al., 2019). Enfin, la protéine Xrs2/Nbs1 est responsable de la localisation nucléaire du complexe MRX/MRN (Carney et al., 1998;

Tsukamoto et al., 2005). De plus, Xrs2/Nbs1 interagit avec Mre11 et Tel1/ATM au travers de sa partie C-terminale tandis que sa partie N-terminale contient un domaine FHA nécessaire au recrutement de l'endonucléase Sae2/CtIP au niveau de la CDB (Nakada et al., 2003; You et al., 2005; Williams et al., 2009; H. Wang et al., 2013; J. Liang et al., 2015; J. Oh et al., 2016). La phosphorylation de Sae2/CtIP par Tel1/ATM stimule l'activité endonucléase du complexe MRX/MRN (Lengsfeld et al., 2007; Cannavo & Cejka, 2014; R. Anand et al., 2016, 2019; Cannavo et al., 2018). Ainsi, la résection est initiée, dans un premier temps, par une incision interne de l'ADN du côté 5' proche de la CDB suivie d'une résection 3'-5' de l'ADN afin de générer de courtes extrémités 3' sortantes de quelques centaines de nucléotides (Garcia et al., 2011; Reginato et al., 2017; W. Wang et al., 2017; Cannavo et al., 2019).

La résection peut ensuite s'étendre sur plusieurs dizaines de kb à partir des courtes extrémités 3' sortantes. Cette résection extensive, présentée dans la figure 6b, est assurée par deux voies indépendantes qui reposent soit sur l'exonucléase Exo1, soit sur la nucléase/hélicase Dna2 associée au complexe Sgs1-Top3-Rmi1 (ou BLM-TOP3-RMI1 chez les mammifères) (Mimitou & Symington, 2008; Zhu et al., 2008; Cannavo et al., 2013). Des expériences d'immunoprécipitation de la chromatine (ChIP) ont révélé que le complexe MRX/MRN et la protéine Sae2/CtIP, indépendamment de leur activité nucléase, favorisent le recrutement des protéines Exo1 et Dna2 au niveau de la CDB (Shim et al., 2010). La capacité de déroulement des brins d'ADN du complexe MRX/MRN faciliterait ce recrutement (Cannon et al., 2013; Gobbini et al., 2018).

L'une des voies de résection extensive dépend de Exo1, caractérisée *in vitro* par une activité exonucléase 5'-3' spécifique de l'ADNdb et par une activité endonucléase 5' (Szankasi & Smith, 1992; Fiorentini et al., 1997; Tran et al., 2004). Exo1 a pour substrat préférentiel l'ADNdb présentant une extrémité 3' sortante, substrat généré par le complexe MRX/MRN et Sae2/CtIP (Cannavo et al., 2013; Reginato et al., 2017). Le complexe MRX/MRN-Sae2/CtIP stimule donc l'activité exonucléase 5'-3' de Exo1 en créant une structure sur laquelle Exo1 peut se fixer avec une forte affinité (Nicolette et al., 2010; Gobbini et al., 2018). La dégradation de l'ADN par Exo1 est également stimulée par la protéine de réplication A (RPA), qui en se fixant à l'ADNsb formé, prévient *in vitro* la formation de complexe Exo1-ADNsb indésirables tout en favorisant la dégradation 5'-3' de l'ADNdb (Cannavo et al., 2013). Par ailleurs, la voie Exo1 peut se substituer au complexe MRX dans le processus de maturation des extrémités 5' comme le suggère notamment la surexpression du gène *EXO1*, capable de supprimer les défauts de sensibilité aux agents génotoxiques des mutants *mre11Δ*, *rad50Δ* et *xrs2Δ* (Lewis et al., 2002).

L'autre voie de résection extensive dépend de l'activité hélicase de Sgs1/BLM, qui appartient à la famille des hélicases RecQ, stimulée par son interaction avec Top3 et Rmi1, et de l'activité nucléase de Dna2 (Gravel et al., 2008; Zhu et al., 2008; Niu et al., 2010). Sgs1 et Dna2 interagissent physiquement *in vitro*, ce qui a amené à suggérer un modèle dans lequel Sgs1/BLM catalyse l'ouverture de l'ADNdb en transloquant sur l'ADN de 3' en 5' afin de générer des extrémités 5' flottantes clivées par Dna2 grâce à son activité endonucléase (Cejka, Cannavo, et al., 2010). En addition du complexe MRX/MRN, RPA joue également un rôle dans le chargement de Dna2 et de Sgs1 sur l'ADNsb et module leur activité (Nimonkar et al., 2011; H. Chen et al., 2013). La présence de RPA sur l'ADNsb 3' sortant stimule le déroulement de l'ADN par Sgs1 et inhibe la dégradation des brins 3' sortants par Dna2 au profit du clivage des extrémités 5' (Cejka, Cannavo, et al., 2010; Nimonkar et al., 2011; H. Yan et al., 2011; Xue et al., 2019).

Ainsi, ces deux voies de résection extensives conduisent à la formation d'extrémités d'ADNsb 3' sortantes de plusieurs dizaines de kb nécessaires au processus de RH dans les cellules mitotiques. Des études approfondies sont nécessaires pour clarifier les caractéristiques du contrôle de la résection comme par exemple, la longueur des régions dégradées.

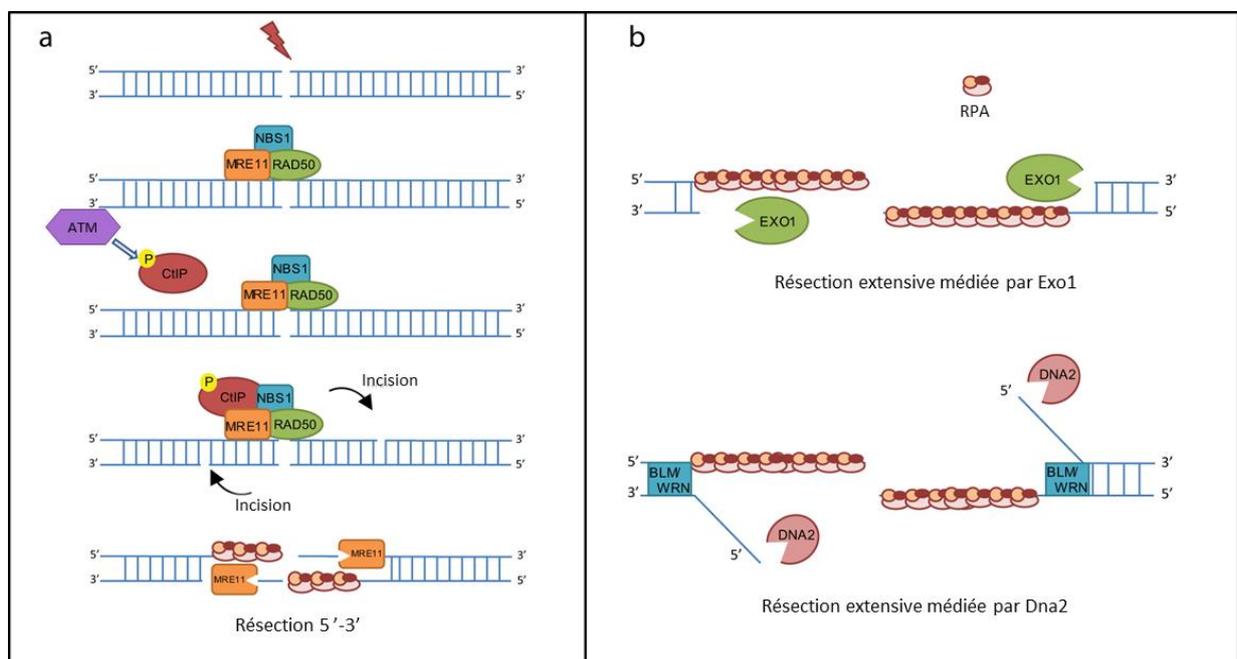


Figure 6. Modèle du mécanisme de résection de l'ADN chez les mammifères (adaptée de F. Zhao et al., 2020)

- (a)** Initiation de la résection par le complexe MRN et Sae2/CtIP phosphorylée.
(b) Extension de la résection par les voies Exo1 ou Dna2-Sgs1/BLM.

Après résection de l'ADN, l'une des étapes clé de la RH consiste en la formation de filaments composés de multiples monomères de la recombinaise Rad51, protéine essentielle au processus de recombinaison, sur l'ADNsb nouvellement formé. Cette formation est rendue possible grâce à l'intervention de nombreuses protéines.

2. Formation et stabilisation des nucléofilaments Rad51

a) La protéine de réplication A (RPA)

RPA est la première protéine à fixer les extrémités d'ADNsb nouvellement formées (Gasior et al., 1998; Wolner et al., 2003; Lisby et al., 2004). RPA est une protéine SSB (single-strand DNA-binding) présentant une forte affinité de liaison pour l'ADNsb, avec une constante de dissociation de l'ordre de 10^{-9} à 10^{-11} M (Kim et al., 1994; Iftode et al., 1999; R. Chen & Wold, 2014), et une affinité plus faible pour l'ADNdb et l'ARN (Fairman & Stillman, 1988; Wold & Kelly, 1988; Brill & Stillman, 1989; Kim et al., 1992; Sugiyama et al., 1997; Sung, 1997a). RPA sert ainsi de signal de détection de l'ADNsb. Cela permet d'activer les différents points de contrôle qui induisent alors un ralentissement du cycle cellulaire suffisant pour réparer les dommages (L. Zou & Elledge, 2003; Choi et al., 2010). De ce fait, la capacité de RPA à lier fortement l'ADNsb explique probablement le fait que cette protéine soit impliquée dans de nombreux processus du métabolisme de l'ADN telles que la réplication, la réparation ou encore la recombinaison (Wold, 1997; Y. Zou et al., 2006; Caldwell & Spies, 2020). Il apparaît alors évident que RPA est un gène essentiel à la survie cellulaire. Seul le rôle de RPA dans la recombinaison sera traité par la suite.

RPA est un complexe hétérotrimérique stable et abondant, hautement conservé parmi les eucaryotes. RPA est composé de trois sous-unités de 70, 32 et 14 kDa, codées respectivement par les gènes essentiels *RFA1*, *RFA2* et *RFA3* chez la levure (Brill & Stillman, 1991) et par les gènes essentiels *RPA70*, *RPA32* et *RPA14* chez l'Homme (Wold, 1997). Chacune de ces sous-unités contient un ou plusieurs domaines de fixation à l'ADN (ou DNA Binding Domain, DBD) qui présentent différentes fonctions (figure 7). RPA se lie à l'ADNsb majoritairement au travers des DBD de la plus grande sous-unité du complexe, soit RPA70 chez l'Homme et RFA1 pour la levure (Alani et al., 1992; Bochkareva et al., 2002) et cette fixation se fait de manière dynamique et séquentielle avec une polarité 5'-3' (Laat et al., 1998; Iftode & Borowiec, 2000; Kolpashchikov et al., 2001; J. Fan & Pavletich, 2012; Yates et al., 2018). L'interaction de RPA avec d'autres protéines impliquées dans les différents processus du métabolisme de l'ADN est médiée par les DBD des sous-unités RFA1/RPA70 et RFA2/RPA32 (Fanning et al., 2006). En

réponse aux dommages, la sous-unité RFA2/RPA32 subit de multiples modifications post-traductionnelles qui modulent ses interactions avec les autres protéines ainsi que sa fixation à l'ADNsb (Brush & Kelly, 2000; Binz et al., 2003; Maréchal & Zou, 2015). Concernant la plus petite sous-unité de RPA, il semblerait que sa fonction principale réside dans le fait d'assurer la trimérisation du complexe. Néanmoins, l'absence de chacun des gènes du complexe est associée à un défaut de viabilité des cellules.

Bien que ces gènes n'appartiennent pas au groupe d'épistasie de *RAD52*, ils jouent un rôle crucial dans la RH. En effet, des mutations des gènes du complexe RPA sont notamment associées à des défauts de RH (Heyer et al., 1990; Longhese et al., 1994; Firmenich et al., 1995; Umezumi et al., 1998; J. Smith & Rothstein, 1999; Soustelle et al., 2002).

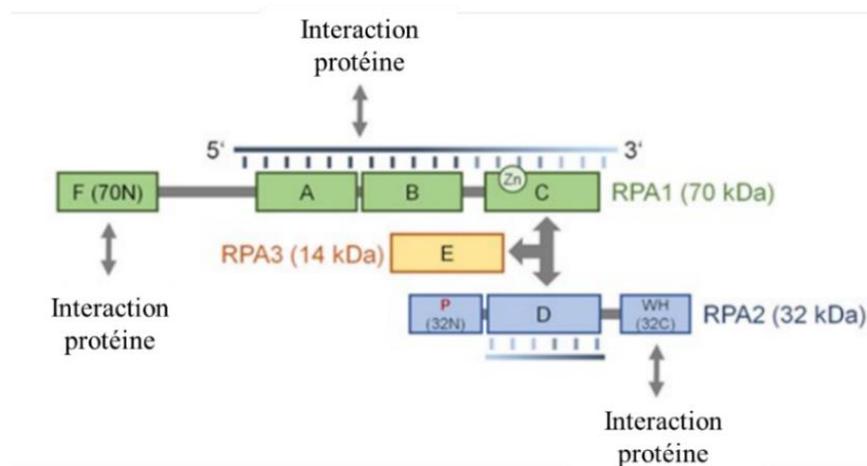


Figure 7. Représentation schématique des différentes sous-unités de RPA (Dueva & Iliakis, 2020) Les domaines DBD-A, DBD-B et DBD-C de RPA1 ainsi que le domaine DBD-D de RPA2 sont impliqués dans la liaison à l'ADN avec une affinité plus ou moins forte, comme présentée par le gradient. Les domaines DBD-A, DBD-B et DBD-F de RPA1 en addition de la région C-terminale de RPA2 interviennent dans les interactions avec d'autres protéines. Les modifications post-traductionnelles de RPA sont portées par la région N-terminale de RPA2. Les domaines DBD-C de RPA1, DBD-D de RPA2 et l'unique domaine DBD-E de RPA3 permettent la trimérisation du complexe.

Lors de la RH, RPA fixe rapidement les extrémités d'ADNsb 3' sortantes formées lors de la résection de l'ADN localisé autour de la CDB afin de les protéger de l'activité de dégradation des exo- et endonucléases présentes dans la cellule (R. Chen & Wold, 2014). La présence de RPA sur l'ADNsb prévient également la formation de structures secondaires qui pourraient inhiber la formation des filaments Rad51, l'une des étapes clés de la RH (Alani et al., 1992; Sugiyama et al., 1997, 1998). Cependant, en plus d'être hautement abondant dans les cellules, RPA présente une affinité pour l'ADNsb nettement supérieure à celle de Rad51 et bloque *in vitro* la formation des nucléofilaments (Sung, 1997a; New et al., 1998; Sugiyama & Kowalczykowski, 2002; X. Wang & Haber, 2004; C. J. Ma et al., 2017; Ding et al., 2023). Cela

peut suggérer que RPA sert de barrière pour éviter un chargement trop important de Rad51 sur l'ADNsb et, par conséquent, prévenir des événements de recombinaison non souhaités. La levée de cette inhibition requiert *in vivo* l'intervention de divers facteurs appelés protéines médiatrices dont l'un des rôles consiste à remplacer RPA par Rad51. Les protéines BRCA2 chez les mammifères, Rad52 chez la levure et les protéines paralogues de Rad51 dans l'ensemble des eucaryotes remplissent ce rôle de médiateurs et seront abordées par la suite dans les sections B.2.c et B.2.d. La nécessité de déplacer RPA a été mise en évidence, par exemple, lors de l'étude *in vitro* du mutant *rfa1-t11*. Ce mutant, capable de lier l'ADNsb de la même manière que la protéine sauvage, montre un ralentissement du déplacement de RPA et, par conséquent, retarde la formation des filaments Rad51, induisant une sensibilité plus aigüe à différents agents génotoxiques ainsi que des défauts de RH (Kantake et al., 2003).

Une fois les nucléofilaments Rad51 formés, ils sont alors capables d'effectuer la recherche puis l'invasion d'une molécule d'ADN intacte homologue à la molécule endommagée afin d'initier la synthèse réparatrice. RPA participe *in vitro* à la stimulation de l'échange de brin réalisé par Rad51, probablement en séquestrant les brins d'ADNsb déplacés lors de l'envahissement pour éviter toute interférence ou bien en maintenant les structures formées lors de la réaction (Heyer et al., 1990; Sung, 1994; Baumann & West, 1997; Sugiyama et al., 1997; Mazin & Kowalczykowski, 1998; Egger et al., 2002; Komen et al., 2002; X. Wang & Haber, 2004). Des expériences de co-immunoprécipitation (co-IP) et des analyses de spectroscopie de résonance magnétique nucléaire (RMN) ont, par ailleurs, amené leurs auteurs à proposer que cette stimulation serait médiée *in vivo* par une interaction physique entre le domaine DBD-A de RPA1 et la région N-terminale de Rad51 (Golub et al., 1998; Stauffer & Chazin, 2004), bien que la protéine SSB de la bactérie *E. coli* semble pouvoir se substituer à RPA, remettant en question la nécessité d'une interaction directe entre les deux protéines (Baumann & West, 1997; Sugiyama et al., 1997). RPA est néanmoins considéré comme un régulateur positif du processus de RH grâce à sa capacité de stabilisation de l'ADNsb sur lequel sera chargé la recombinaise Rad51 mais aussi grâce à son implication dans la stimulation de l'échange de brin par Rad51.

b) Les recombinaises Rad51 et Dmc1

Chez les eucaryotes, deux recombinaises ont été identifiées, Rad51 et Dmc1 (Aboussekhra et al., 1992; Bishop et al., 1992). Rad51, membre du groupe d'épistasie *RAD52*, est une protéine essentielle à la réparation des dommages dans les cellules somatiques, également requise lors de la recombinaison méiotique, tandis que Dmc1 est exprimée

exclusivement lors de la méiose. Lors de ma thèse, je me suis intéressée spécifiquement à la régulation de Rad51 dans les cellules végétatives. Cependant, une brève partie de ce paragraphe sera consacrée à Dmc1.

La recombinaise Rad51 est une protéine hautement conservée dans l'ensemble des eucaryotes et les filaments composés de multiples monomères de Rad51 sur de l'ADNsb jouent un rôle central dans la RH en intervenant dans chacune des trois phases du processus. La protéine Rad51 est l'orthologue de la protéine bactérienne RecA et de la protéine RadA retrouvée chez les archéobactéries (Aboussekhra et al., 1992; Basile et al., 1992; A. Shinohara et al., 1992; Z. Lin et al., 2006). Il est intéressant de souligner que, malgré une importante conservation au sein du vivant, la délétion de cette protéine ne présente pas les mêmes phénotypes en fonction des espèces. Chez la levure, les cellules mutantes *rad51Δ* sont viables mais présentent une forte sensibilité aux radiations ionisantes ainsi que de sévères défauts méiotiques (Symington, 2002). En revanche, l'absence de la protéine Rad51 rend les cellules de mammifères non viables et résulte en une létalité embryonnaire précoce chez la souris ou encore en une accumulation de cassures chromosomiques dans les cellules de poulet arrêtées en G2/M (D. S. Lim & Hasty, 1996; Tsuzuki et al., 1996; Sonoda et al., 1998). Ces différents défauts provoqués par la perte de Rad51 révèlent le rôle fondamental de cette protéine dans la réparation des dommages lors de la RH.

Le gène *RAD51* code pour une protéine de 43 kDa chez la levure et de 37 kDa chez l'Homme. Ces protéines partagent environ 59% d'identité entre elles ainsi qu'une homologie de structure importante avec la protéine ancestrale RecA, représentée dans la figure 8 (Aboussekhra et al., 1992; Basile et al., 1992; A. Shinohara et al., 1992, 1993). Cette homologie de structure se concentre principalement au niveau du domaine catalytique, défini par deux motifs consensus Walker A et B, responsables de la fixation et de l'hydrolyse de l'ATP (A. Shinohara et al., 1992; Benson et al., 1994; Z. Lin et al., 2006). Cette région conservée de Rad51 contient également un domaine impliqué *in vitro* dans la liaison à l'ADNsb ainsi qu'à l'ADNdb, avec une affinité légèrement plus marquée pour l'ADNsb (Ogawa et al., 1993; Sung & Robberson, 1995; Yu et al., 2001). Au-delà de cette homologie structurale, Rad51 présente une région N-terminale spécifique à chaque espèce eucaryote (A. Shinohara et al., 1993). Un domaine additionnel de liaison à l'ADNdb se situe dans la région N-terminale de Rad51 (Aihara et al., 1999).

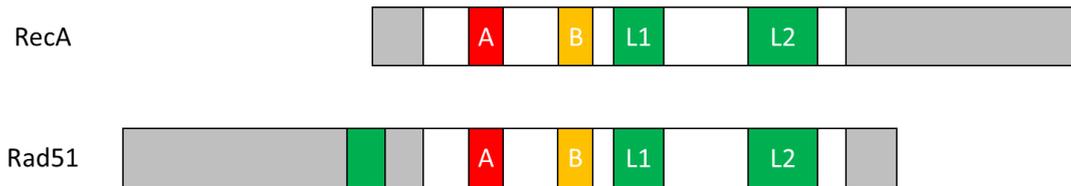


Figure 8. Représentation schématique des recombinaisons RecA et Rad51

La recombinaison Rad51 présente une structure proche de la recombinaison RecA avec un domaine catalytique, également qualifié de cœur canonique (en blanc), contenant les motifs Walker A et B (respectivement en rouge et orange) ainsi qu'un domaine de fixation à l'ADN défini notamment par les loupes L1 et L2 (en vert). Par ailleurs, chacune de ces recombinaisons est composée d'extensions N-terminale et C-terminale spécifiques, de tailles variables (en gris). Rad51 possède un motif de fixation à l'ADN supplémentaire (en vert) dans sa région N-terminale.

Des expériences biochimiques réalisées *in vitro* à l'aide de la recombinaison Rad51 purifiée ont montré que sa capacité à se lier à l'ADNsb et à l'ADNdb conduit à la formation de nucléofilaments semblables à ceux formés par la recombinaison RecA, comme présentés dans la figure 9A (Ogawa et al., 1993; Benson et al., 1994; Sung & Robberson, 1995; Yu et al., 2001). Les études de microscopie électronique et de cryo-EM à haute résolution ainsi que les reconstitutions de structures cristallographiques ont révélé que Rad51 forme des filaments hélicoïdaux sur des régions d'ADN de 18 pb/nucléotides et sont composés en moyenne de six monomères par tour d'hélice, chaque monomère recouvrant trois nucléotides et le pas d'hélice variant entre 90 et 130 Å (figure 9B) (Ogawa et al., 1993; Benson et al., 1994; Yu et al., 2001; Conway et al., 2004; Short et al., 2016). Cette formation dépend, d'une part, d'un motif de polymérisation FVTA (ou FTTA), conservé et identifié dans le domaine catalytique de la recombinaison Rad51, qui viendrait alors s'insérer au niveau d'une région spécifique, qualifiée de poche, du monomère adjacent (Pellegrini et al., 2002; Shin et al., 2003; Conway et al., 2004). D'autre part, la polymérisation du filament Rad51 fait également intervenir des interactions entre les domaines catalytiques des différents monomères (Conway et al., 2004). L'assemblage de ces nucléofilaments, qualifiés de présynaptiques, est initiée par une première étape cinétiquement lente de nucléation conduisant à la formation d'un noyau stable d'environ six monomères sur l'ADN, soit le nombre de monomères nécessaires pour couvrir un pas d'hélice. La deuxième étape consiste en l'élongation rapide de ces filaments par ajout de monomères suivant une polarité 3'-5' (Miné et al., 2007; Modesti et al., 2007; van der Heijden et al., 2007; Hilario et al., 2009; Candelli et al., 2014; C. J. Ma et al., 2017; Belan et al., 2021). La polymérisation coopérative de ces nucléofilaments Rad51 reposerait sur la fixation, et non l'hydrolyse, de molécules d'ATP, localisées à l'interface reliant deux monomères, bien que cela ait été remis en question, ainsi que sur la présence d'ions Mg^{2+} (Bianco et al., 1998; Namsaraev

& Berg, 1998; Bugreev & Mazin, 2004; Conway et al., 2004; Chi, Van Komen, et al., 2006; Schay et al., 2016).

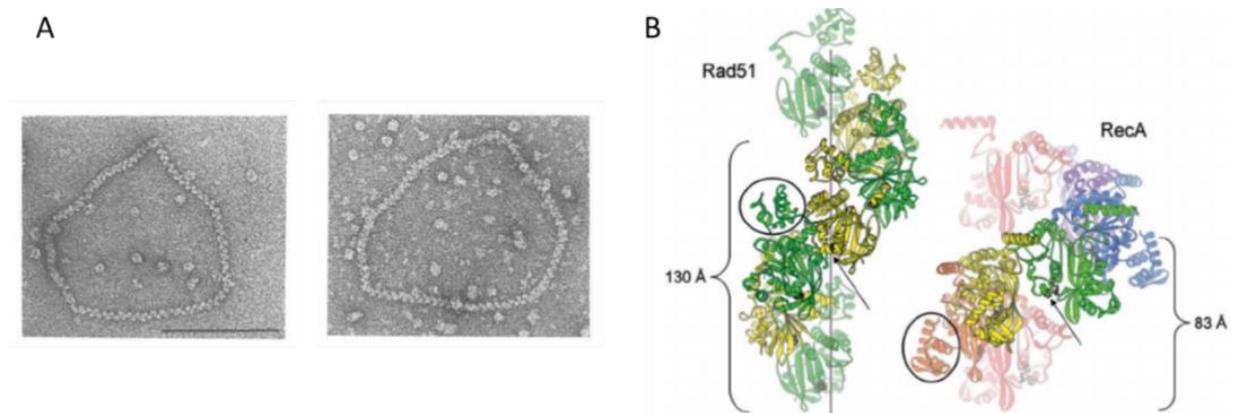


Figure 9. Comparaison des filaments formés par les recombinases Rad51 et RecA

A. Observation par microscopie électronique de filaments formés par la recombinase humaine RAD51 (à gauche) et la recombinase bactérienne RecA (à droite) sur un duplex d'ADN circulaire clivé (Benson et al., 1994)

B. Structures cristallographiques des filaments Rad51 et RecA (Short et al., 2016). Dans les filaments Rad51, les sites de fixation de l'ATP (flèche) sont situés entre deux monomères adjacents tandis que dans les filaments RecA, les sites ATP semblent plus éloignés du monomère adjacent. Les régions entourées correspondent à la région N-terminale de Rad51 et à la région C-terminale de RecA.

Une fois les nucléofilaments présynaptiques Rad51 formés, la recherche d'homologie peut démarrer. Cependant, il est à noter que seuls les filaments formés sur l'ADNsb, et non sur l'ADNdb, sont fonctionnels, ce qui est en accord avec le fait que la RH soit initiée par la résection extensive des extrémités 5' de l'ADNdb ou par la présence d'ADNsb au niveau de fourches de réplication bloquées à une lésion (Sung & Robberson, 1995; Zaitseva et al., 1999). D'autre part, la fixation et l'hydrolyse de l'ATP modulent les fonctions de la recombinase Rad51. L'association de molécules d'ATP stabilise les nucléofilaments présynaptiques et leur confère une forme active étirée, capable de réaliser la recherche et l'invasion d'une séquence d'ADN intacte homologue à la séquence endommagée, étape critique de la RH (Sung & Stratton, 1996; Morrison et al., 1999; Fung et al., 2006; J. Xu et al., 2017; Brouwer et al., 2018; Špírek et al., 2018). L'hydrolyse de ces molécules d'ATP en ADP inactive les nucléofilaments en les rendant plus compacts et favorise leur désassemblage (Namsaraev & Berg, 1998; Robertson et al., 2009; van Mameren et al., 2009; Brouwer et al., 2018; Luo et al., 2023). Cette activité ATPase de la recombinase Rad51 rend compte de la dynamique des nucléofilaments (Donovan et al., 1994; Luo et al., 2023).

La formation de ces nucléofilaments présynaptiques, en présence d'ATP, étire l'ADN entre chaque triplet de nucléotides fixé par un monomère de Rad51 d'environ 150% en comparaison à l'ADN de type B et conduit également à l'ouverture de l'ADNdb (Yu et al., 2001; Danilowicz et al., 2014; J. Y. Lee et al., 2015; J. Xu et al., 2017). Cette conformation de l'ADN facilite la recherche d'homologie et l'appariement des régions homologues lors de l'invasion de brin, processus présenté dans la figure 10. Le domaine d'interaction avec l'ADN de Rad51, divisé en deux sites distincts, semble jouer un rôle important dans l'interrogation du génome et l'appariement de séquences homologues, notamment en permettant la fixation de deux molécules d'ADN de façon simultanée (Prasad et al., 2006; K. Ito et al., 2020; Yang et al., 2020; Reitz et al., 2021). Le site I comprend les boucles conservées L1 et L2 qui se lient à l'ADNsb pour créer le nucléofilament présynaptique tandis que le site II, situé dans la région C-terminale de Rad51, accueille la séquence d'ADNdb donneuse pour procéder à la recherche d'homologie. Le nucléofilament réalise alors un scan du duplex d'ADN de manière transitoire et aléatoire, rendant difficile l'étude du mécanisme et des structures intermédiaires associées *in vivo*. L'activité recombinogène de Rad51 dans différents contextes a été largement étudiée *in vitro* au travers du test d'échange de brin dans lequel une séquence d'ADNsb recombine avec une séquence homologue présente sur un ADNdb circulaire. Les molécules initiales et les structures intermédiaires formées lors de l'échange de brin peuvent être visualisées par électrophorèse sur gel d'agarose (Sung, 1994; Sung & Stratton, 1996). Des analyses *in vitro* sur molécule unique réalisées récemment ont permis de mettre à jour de nouvelles caractéristiques de ce processus. Ces expériences ont notamment démontré que le filament examine des régions de micro-homologie de huit nucléotides au minimum, stabilisant ainsi la capture de l'ADNdb et limitant la recherche d'homologie à uniquement 0,01% du génome (Qi et al., 2015). De plus, une certaine mobilité chromatinienne faciliterait également la recherche d'homologie (Miné-Hattab et al., 2017). Une fois l'homologie trouvée, un joint paranémique stabilise la structure formée par l'association du duplex et de l'ADNsb, structure intermédiaire à trois brins également appelée complexe synaptique. Le brin complémentaire du duplex est ensuite transféré vers le site I avant d'être apparié à l'ADNsb par un joint plectonémique, générant un nouvel hétéroduplex également appelé nucléofilament post-synaptique. Cet échange de brin aboutit ainsi à la formation de la D-loop, structure caractéristique de la RH au sein de laquelle est initiée la synthèse réparatrice (pour revue : Renkawitz et al., 2014).

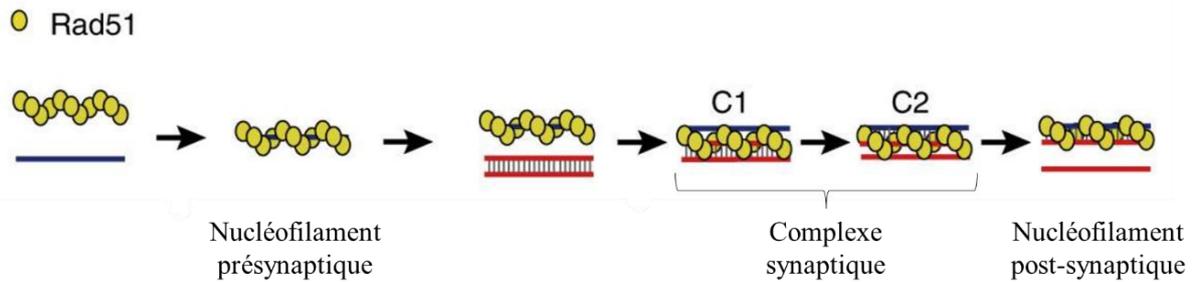


Figure 10. Représentation schématique de la recherche et invasion de brin par Rad51 (adaptée de K. Ito et al., 2020)

Le nucléofilament présynaptique nouvellement formé capture un duplex d'ADN pour initier la recherche d'homologie. Une fois la séquence homologe identifiée, les deux molécules d'ADN forment le complexe synaptique, représenté par deux intermédiaires à trois brins. Dans le premier intermédiaire C1, les deux molécules sont reliées par un joint paranémique transitoire. Dans le deuxième intermédiaire C2, ce joint est rapidement remplacé par un joint plectonémique où les deux brins complémentaires sont enroulés afin de former le nucléofilament post-synaptique. Le déplacement du second brin du duplex initial induit la formation de la D-loop.

Par ailleurs, de nombreuses études ont mis en évidence un lien important entre les processus de recombinaison et de réplication (voir section II.A.5). Du fait de son rôle central dans le mécanisme de la RH, la recombinase Rad51 est par conséquent impliquée dans le processus de réplication du génome (pour revue : Wassing & Esashi, 2021). De récentes expériences réalisées à partir d'un allèle mutant de séparation de fonction du site II de fixation à l'ADN, le mutant *rad51-II3A*, ont permis d'apporter de nouveaux détails concernant le rôle de la recombinase Rad51 en réponse à un stress répliatif. Le mutant *rad51-II3A*, dont la capacité à former efficacement des filaments sur l'ADN demeure inchangée par rapport à la protéine sauvage, présente des défauts de RH *in vitro* et *in vivo* (Cloud et al., 2012; Mason et al., 2019). Des analyses de fibres d'ADN réalisées sur cette souche mutante après traitement au HU ont montré que les fourches de réplication bloquées ne subissent aucun raccourcissement par la nucléase Mre11, contrairement à la souche sauvage. Ainsi, il a été suggéré que la fonction enzymatique de Rad51 ne semble pas nécessaire à la protection des fourches de réplication bloquées à une lésion. D'autre part, ces expériences ont également révélé de manière surprenante que l'activité enzymatique de RAD51 n'apparaît pas essentielle pour la réversion des fourches de réplication. Néanmoins, la capacité de RAD51 à procéder à un transfert de brin semble requise au redémarrage des fourches (Mason et al., 2019). L'implication ainsi que le mécanisme d'action de Rad51 dans la réversion des fourches sont encore mal compris pour l'ensemble des eucaryotes.

De manière très intéressante, plusieurs études ont mis en évidence que, chez les mammifères, RAD51 assure la stabilité génomique également au travers de rôles non

catalytiques. En effet, la fixation et la stabilisation des filaments RAD51 sur l'ADNsb serait suffisante (i) pour prévenir la réparation des CDB par les voies SSA ou Alt-EJ, (ii) pour protéger les fourches de réplication endommagées et/ou remodelées (iii) et pour favoriser le recrutement des polymérase translésionnelles au niveau des brèches laissées derrière les fourches (So et al., 2017; Mason et al., 2019; Cabello-Lobato et al., 2021). Étonnamment, il a été montré au laboratoire que chez la levure, il existe une compétition entre les voies de RH, dépendante de Rad51, et de STL (Maloisel et al., 2023). De ce fait, les différents rôles de RAD51 ne sont pas encore véritablement compris et nécessitent des études plus approfondies.

En conclusion, la recombinaise Rad51 est une protéine centrale dans les processus de recombinaison mitotique et méiotique et elle intervient également dans la prise en charge des fourches de réplication bloquées lors d'un stress réplicatif. De ce fait, la recombinaise Rad51 est un facteur clé dans la préservation de la stabilité du génome. Néanmoins, la formation des nucléofilaments Rad51 peut aussi se révéler dangereuse pour la cellule si elle n'est pas correctement régulée. En effet, des défauts de régulation de ces filaments conduisent à la formation de filaments toxiques ou à une accumulation de filaments Rad51. La toxicité des filaments ou un nombre excessif d'évènements de RH sont associés à une instabilité génétique pouvant mener à la mort cellulaire ou encore au développement de cancers (pour revue : Z. Wang et al., 2022). Il a été récemment proposé que les modifications post-traductionnelles de Rad51 par de multiples kinases en réponse aux dommages de l'ADN modulent l'activité et la stabilité de la recombinaise (G. Lim et al., 2020; Orhan et al., 2021; Woo et al., 2021). En addition à ces modifications, de nombreuses protéines interviennent de manière positive ou négative dans le contrôle de la formation des nucléofilaments. Parmi ces facteurs protéiques, les protéines médiatrices ont pour rôle de faciliter la nucléation des monomères de Rad51 afin de promouvoir l'assemblage des nucléofilaments. Comme expliqué précédemment, dans les conditions biologiques, RPA est le premier facteur à fixer l'ADNsb avec une haute affinité, inhibant l'accrochage des monomères de Rad51 (Sugiyama et al., 1997; Sung, 1997b). Il a été démontré que les protéines médiatrices favorisent le chargement de Rad51 en coordination avec le déplacement de RPA de l'ADNsb. Une fois les nucléofilaments formés, les protéines médiatrices les stabilisent. Des expériences de double-hybride de levure ont mis en évidence des interactions directes entre Rad51 et ces protéines médiatrices (Donovan et al., 1994; Krejci et al., 2001). Cependant, les sites d'interaction de Rad51 avec ses protéines partenaires ne sont pas encore clairement définis. Une étude plus récente menée chez la levure *Schizosaccharomyces pombe* a suggéré l'existence d'un motif acide au sein de Rad51, conservé

chez *S. cerevisiae*, qui pourrait être impliqué dans l'interaction de la recombinaison avec les différentes protéines médiatrices (Afshar et al., 2021).

La recombinaison Dmc1 (pour Disrupted Meiotic cDNA 1), initialement identifiée chez la levure *S. cerevisiae* lors d'un criblage de gènes exprimés spécifiquement lors de la prophase I de méiose, a été retrouvée dans la majorité des espèces eucaryotes étudiées (Bishop et al., 1992; W. Li & Ma, 2006; Z. Lin et al., 2006). Cette protéine est essentielle à la réparation des CDB par recombinaison méiotique et garantit une bonne ségrégation des chromosomes et, par conséquent, une répartition correcte du matériel génétique dans les cellules germinales. Dmc1 est présente en solution sous forme octamérique (Passy et al., 1999) et partage en moyenne 50% d'identité ainsi qu'une homologie de structure, au niveau du domaine catalytique, et de fonctions avec Rad51 (Story et al., 1993; Masson & West, 2001; Z. Lin et al., 2006). Ainsi, à l'image de Rad51, Dmc1 forme des filaments hélicoïdaux sur l'ADNsb et l'ADNdb en présence d'ATP et catalyse l'échange de brin *in vitro* (Z. Li et al., 1997; Masson et al., 1999; E. L. Hong et al., 2001; Sehorn et al., 2004; Sheridan et al., 2008; Yu & Egelman, 2010). Les mutations de Dmc1 sont associées à une myriade de défauts méiotiques. Par exemple, l'absence de Dmc1 dans les cellules de levure induit une altération de la progression du cycle méiotique, une accumulation de CDB non résolues et une formation anormale du complexe synaptonémal, aboutissant à des défauts de ségrégation des chromosomes (Bishop et al., 1992; Schwacha & Kleckner, 1997). Chez la souris, l'ablation du gène *DMC1* provoque la stérilité des individus (Pittman, Cobb, et al., 1998; Yoshida et al., 1998). Les deux recombinaisons Dmc1 et Rad51 sont nécessaires à la viabilité des produits méiotiques et assurent l'efficacité de la recombinaison méiotique au travers de rôles qui sont à la fois complémentaires et indépendants. Selon les études menées chez la levure et *Arabidopsis thaliana*, seule l'activité catalytique de Dmc1 serait essentielle à la recombinaison méiotique tandis que Rad51 régulerait la formation des filaments Dmc1 (Bishop, 1994; A. Shinohara et al., 1997; Bishop, 2012; Cloud et al., 2012; Ines et al., 2013; Singh et al., 2017; Y.-L. Chan et al., 2019; Lan et al., 2020). D'autre part, Dmc1 favorise la production de CO entre chromosomes homologues, en comparaison à Rad51 qui facilite l'échange d'information entre chromatides sœurs (Schwacha & Kleckner, 1997). Cela démontre encore une fois le rôle fondamental de Dmc1 dans la recombinaison méiotique et dans la diversité génétique.

c) Les protéines médiatrices Rad52 et BRCA2

Chez la levure *S. cerevisiae*, la protéine Rad52 est la protéine médiatrice majeure des filaments Rad51. En addition de sa fonction dans les voies de CG, Rad52 joue également un rôle crucial dans les mécanismes de RH indépendants de l'invasion de brin catalysée par Rad51 telles que les voies SSA (Ivanov et al., 1996; Mortensen et al., 1996) et BIR (Malkova et al., 1996; Signon et al., 2001; McEachern & Haber, 2006). Plus récemment, il a été suggéré que Rad52 limiterait *in vitro* et *in vivo* la résection des extrémités 5' médiée par l'hélicase Sgs1 (Z. Yan et al., 2019). Du fait de son rôle essentiel dans l'ensemble des mécanismes de la RH, cette protéine médiatrice se retrouve à la tête du groupe d'épistasie de *RAD52* qui rassemble différents acteurs fondamentaux de la RH (Game & Mortimer, 1974). Par conséquent, l'ablation du gène *RAD52* dans les cellules de levure provoque les phénotypes les plus sévères de tous les gènes du groupe d'épistasie. Les cellules *rad52Δ* sont extrêmement sensibles aux différents agents génotoxiques, notamment aux radiations ionisantes, et présentent des défauts de commutation du type sexuel ainsi que des défauts de RH mitotique et méiotique conduisant à une production de spores non viables (Malone & Esposito, 1980; Resnick et al., 1981; Symington, 2002). Rad52 est conservée dans la majorité des espèces eucaryotes, à l'exception des invertébrés (Lok & Powell, 2012). Toutefois, la délétion du gène codant pour cette protéine ne présente pas toujours les mêmes phénotypes au sein de tous les phylums. En effet, l'absence de *RAD52* dans les cellules de mammifères n'induit que de légers défauts de recombinaison, sans réellement impacter la réparation des dommages de l'ADN, et ne provoque pas de défaut de viabilité ni de stérilité (Rijkers et al., 1998; Yamaguchi-Iwai et al., 1998; Muhammad et al., 2024). Chez les vertébrés, la protéine *RAD52* est donc considérée comme un facteur accessoire, le rôle de protéine médiatrice principale étant assuré par la protéine *BRCA2*.

Malgré ces différences de phénotypes, de nombreuses études ont mis en évidence une importante similitude structurale et fonctionnelle entre les protéines Rad52 des différentes espèces eucaryotes. La protéine Rad52 est divisée en deux régions distinctes. La région N-terminale de Rad52, structurée et hautement conservée, contient un domaine de liaison à l'ADNdb et l'ADNsb, avec une affinité plus marquée pour ce dernier, requis *in vitro* lors de l'appariement de brins catalysé par Rad52 (Mortensen et al., 1996; Reddy et al., 1997; A. Shinohara et al., 1998; Sugiyama et al., 1998; Shi et al., 2009). Cette région est également responsable de l'oligomérisation de la protéine sous forme d'anneau composé de 7 à 11 monomères, observé par microscopie électronique et dont la structure cristallographique est représentée dans la figure 11 (A. Shinohara et al., 1998; Stasiak et al., 2000; Ranatunga et al.,

2001; Kagawa et al., 2002; E. Ma et al., 2021; Deveryshetty et al., 2023; Kinoshita et al., 2023). Cette oligomérisation conduit à l'export de l'anneau du cytoplasme vers le noyau, grâce au signal NLS contenu dans chaque monomère (Plate, Albertsen, et al., 2008). Il a été proposé, *in vitro*, que l'ADN s'enroule autour des anneaux, au sein d'un large sillon chargé positivement, étirant le squelette phosphate de la molécule d'ADN afin de faciliter l'hybridation avec une molécule d'ADN complémentaire (Kagawa et al., 2002; Lloyd et al., 2005; Saotome et al., 2018). Un second domaine d'interaction avec l'ADNdb et l'ADNsb a été identifié dans la région N-terminale de la protéine RAD52 humaine (Kagawa et al., 2008). Ainsi, la région N-terminale est essentielle à l'activité d'appariement de brins de la protéine Rad52 (Asleson et al., 1999). La région C-terminale, peu conservée et intrinsèquement désordonnée, dispose d'un domaine d'interaction avec la protéine RPA (M. S. Park et al., 1996; Hays et al., 1998; A. Shinohara et al., 1998; Sugiyama et al., 1998; D. Jackson et al., 2002; van den Bosch et al., 2002; Plate, Hallwyl, et al., 2008) ainsi que d'un domaine d'interaction avec la recombinase Rad51 (Milne & Weaver, 1993; Shen et al., 1996; Hays et al., 1998; Kagawa et al., 2002). La région C-terminale de Rad52 est également impliquée dans l'interaction entre différents anneaux de Rad52, formant ainsi un multi-complexe essentiel à l'activité de la protéine. De plus, la région C-terminale de Rad52 de la levure *S. cerevisiae* interviendrait également dans l'interaction avec l'ADN, bien que cette interaction soit encore mal comprise (Seong et al., 2008; Khade & Sugiyama, 2016).

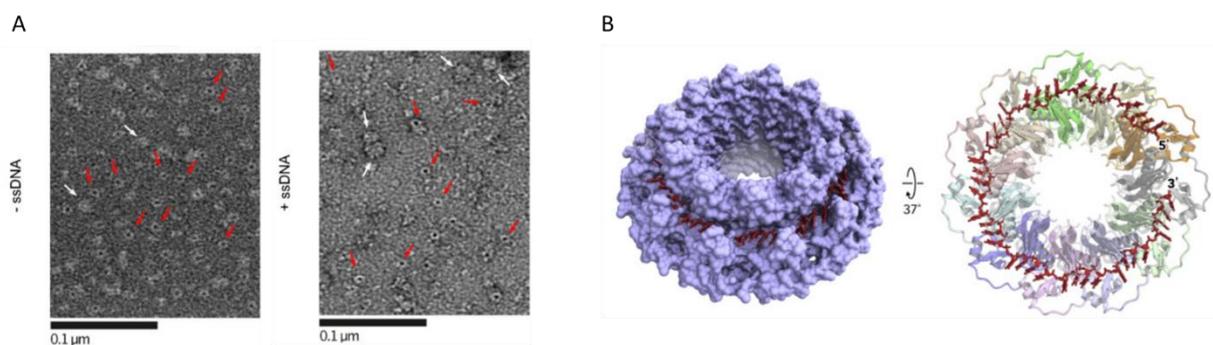


Figure 11. Oligomérisation de la protéine Rad52.

- (A) Visualisation par microscopie électronique d'anneaux formés par la protéine Rad52 de levure en absence (à gauche) ou en présence d'ADNsb de 400 nucléotides (à droite). Les flèches rouges pointent les anneaux avec un canal central tandis que les anneaux bouchés sont signalés par les flèches blanches (E. Ma et al., 2021).
- (B) Représentation tridimensionnelle d'un anneau formés de 11 monomères de RAD52 humaine. A gauche, vue latérale du complexe RAD52-ADNsb. L'ADNsb, représenté sous forme de bâtonnets rouges, est enfoui en profondeur et occupe la majorité de l'espace du sillon chargé positivement de l'anneau RAD52. A droite, vue de haut du complexe RAD52-ADNsb. L'ADNsb de 40 nucléotides s'étend sur 10 des 11 monomères de l'anneau RAD52, chaque monomère étant coloré différemment (Saotome et al., 2018).

Chez la levure *S. cerevisiae*, Rad52 présente deux activités catalytiques majeures. Rad52 assure l'appariement de brins d'ADN complémentaires, en présence ou non de RPA (Mortensen et al., 1996; Sugiyama et al., 1998). Impliquée dans les voies SSA et BIR, des analyses *in vitro* suggèrent que cette fonction de Rad52 est également nécessaire à la capture de la seconde extrémité de la voie SDSA lors de la commutation du type sexuel, ainsi que dans la symétrisation de la D-loop à l'origine des djH de la voie DSBR lors de la RH méiotique (Sugiyama et al., 2006; Y. Wu et al., 2006; Nimonkar et al., 2009; Shi et al., 2009; Sugiyama & Kantake, 2009). Toutefois, la présence de Rad51 peut inhiber l'appariement de brins catalysé par Rad52 (Y. Wu et al., 2008). Cela soutient le fait qu'il existe une compétition entre les voies de réparation dépendantes ou non de Rad51. Rad52 est aidée dans sa fonction d'appariement par la protéine Rad59, identifiée à l'origine lors d'analyses de mutants présentant des défauts de RH mitotique indépendants de Rad51 (Bai & Symington, 1996). Rad52 interagit *in vivo* avec Rad59 au travers de sa région N-terminale, induisant sa localisation aux CDB (Davis & Symington, 2001; Pannunzio et al., 2012). Rad59 partage une homologie de structure avec la région N-terminale de Rad52, nécessaire à la fixation et à l'hybridation de l'ADN mais dépourvue des domaines d'interaction avec RPA et Rad51 (Q. Feng et al., 2007). Ainsi, Rad59 ne peut pas compenser l'absence de Rad52 dans la formation des filaments Rad51, seconde activité majeure de Rad52 dans la RH (Y. Wu et al., 2006).

Rad52 est également une protéine médiatrice essentielle capable de stimuler *in vitro* l'échange de brin par Rad51 en atténuant l'effet inhibiteur de RPA. Il a été montré que cette fonction dépend de l'interaction directe et spécifique de Rad52 avec RPA et Rad51 qui facilite le déplacement de RPA de l'ADNsb par Rad51, bien que cela ait été infirmé par la suite (Sung, 1997a; New et al., 1998; B. Song & Sung, 2000; Sugiyama & Kowalczykowski, 2002; Plate, Hallwyl, et al., 2008; Seong et al., 2008; Gibb et al., 2014; Ding et al., 2023). Rad52 joue un rôle important dans l'installation des filaments Rad51 sur l'ADNsb comme observé par microscopie (Gasior et al., 1998; Lisby et al., 2004). De plus, des expériences de CHIP ont révélé que le recrutement de Rad51 à une CDB unique induite par l'endonucléase HO est aboli dans les cellules déficientes pour Rad52 tandis que le recrutement de Rad52 ne dépend pas de Rad51 (Sugawara et al., 2003; Wolner et al., 2003). Deux motifs de Rad52 participent au recrutement de Rad51, les motifs F₃₁₆VTA et Y₃₇₆EKF, représentés dans la figure 12 (Krejci et al., 2002; Kagawa et al., 2014). Il a été montré au laboratoire que l'interaction Rad52-Rad51 au travers de ces deux motifs ne semble pas essentielle à la formation des filaments mais apparaît cruciale pour leur stabilisation (E. Ma et al., 2018). Cela remet en question la nécessité de l'interaction entre Rad52 et Rad51 dans l'assemblage des filaments.

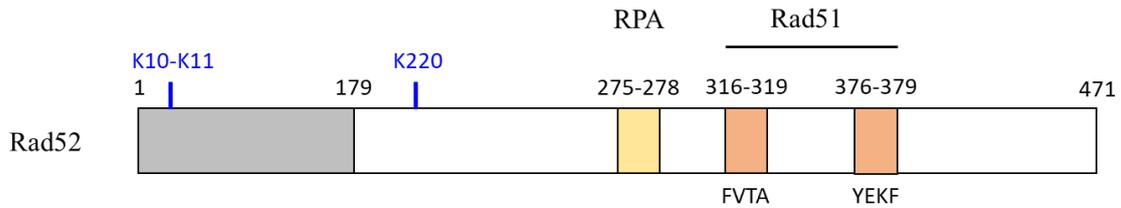


Figure 12. Représentation schématique de la structure de la protéine Rad52 de levure.

La région N-terminale (en gris), conservée et structurée, contient les domaines d'oligomérisation et de fixation à l'ADN ainsi que le signal de localisation nucléaire. La région C-terminale (en blanc), peu conservée et désordonnée, contient un second domaine de fixation à l'ADN ainsi qu'un domaine d'interaction avec RPA (en jaune) et deux motifs identifiés nécessaires pour l'interaction avec Rad51 (en orange). Les résidus en bleu représentent les trois lysines sumoylables de Rad52.

La protéine Rad52 de levure subit de multiples modifications post-traductionnelles qui modulent ses différentes fonctions. Rad52 est constitutivement phosphorylée au cours du cycle cellulaire sur certains résidus sérine et/ou thréonine et elle est également sujette à des événements de phosphorylation additionnels induits lors de la phase S (de Mayolo et al., 2006). La phosphorylation de Rad52 peut être catalysée par la kinase Cdc28 (Aylon et al., 2004; Ira et al., 2004). L'absence de phosphorylation de Rad52 dans le mutant *rad52-T412A* ne perturbe ni son interaction avec RPA ni avec Rad51 et n'impacte pas son activité médiatrice. En revanche, il est apparu que cette phosphorylation de Rad52 facilite l'interaction entre les monomères de Rad52 (G. Lim et al., 2020).

Certaines lysines de la protéine Rad52 peuvent également subir des modifications post-traductionnelles réalisées par la SUMO ligase Siz2 et catalysées par l'enzyme Ubc9, les principales lysines étant représentées dans la figure 12 (Sacher et al., 2006). La sumoylation de Rad52 peut protéger la protéine de la dégradation par le protéasome et également réguler la présence de Rad52 dans le noyau (Sacher et al., 2006). La mono ou di-sumoylation de Rad52, stimulée par la présence d'ADNsb *in vitro*, diminue de façon contradictoire son affinité pour l'ADNsb et l'ADNdb et, par conséquent, sa capacité à appairer des brins complémentaires (Altmannova et al., 2010). D'autre part, la sumoylation de Rad52 intervient dans le choix de la voie de réparation puisqu'elle tend à renforcer l'interaction avec Rad51. Cependant, l'interaction de Rad51 avec Rad52 sumoylée favorise le décrochage des protéines de l'ADNsb. Ainsi, l'absence de sumoylation du mutant *rad52-3KR* prévient sa fonction médiatrice et favorise la voie SSA, indépendante de Rad51. Des données du laboratoire montrent que cette sumoylation prévient la toxicité des filaments Rad51 (Esta et al., 2013).

Chez les mammifères, la fonction médiatrice est assurée par la protéine BRCA2 (pour BRCA2 Cancer 2), RAD52 ne jouant qu'un rôle secondaire. Le gène *BRCA2*, identifié dans les années 1990, appartient à la classe des « gène suppresseurs de tumeurs » dont les mutations prédisposent aux cancers du sein, de l'ovaire et de la prostate, ainsi qu'au syndrome d'anémie de Fanconi (Wooster et al., 1995; Howlett et al., 2002; Jasin, 2002). Ce gène code pour la protéine BRCA2 de 384 kDa, divisée en plusieurs domaines. BRCA2 fixe l'ADN au travers de ses régions N-terminale et C-terminale (Yang et al., 2002; von Nicolai et al., 2016). La partie centrale de la protéine contient 8 motifs BRC conservés, impliqués dans l'interaction avec RAD51 (A. K. C. Wong et al., 1997; P.-L. Chen et al., 1998). Ces motifs BRC partagent un motif FxTA ressemblant au motif favorisant la multimérisation de RAD51 (Pellegrini et al., 2002; Lo et al., 2003). Un domaine supplémentaire situé dans la région C-terminale de BRCA2 interagit avec la forme oligomérisée de RAD51 (Esashi et al., 2007; Appleby et al., 2023). BRCA2 s'associe à son partenaire DSS1, capable d'interagir avec RPA (W. Zhao et al., 2015). BRCA2 favorise ainsi l'assemblage des filaments RAD51 sur l'ADNsb recouvert de RPA et, *in fine*, stimule l'échange de brin par RAD51 (Jensen et al., 2010; J. Liu et al., 2010; Thorslund et al., 2010; Sánchez et al., 2017; Belan et al., 2023). D'autre part, BRCA2 stabiliserait les filaments RAD51 qu'elle a contribué à former en bloquant l'hydrolyse de l'ATP par RAD51 (Carreira & Kowalczykowski, 2011). RAD52 n'est pas essentielle à la RH chez les mammifères. Cependant, la suppression de RAD52 dans des cellules déficientes pour BRCA2 conduit à une létalité synthétique, associée notamment à une diminution du nombre de foyers RAD51 impactant directement l'efficacité de la RH (Z. Feng et al., 2011; Lok et al., 2013). Ce phénomène suggère que l'absence de BRCA2 peut être compensée par RAD52 qui assure une voie de secours pour la viabilité des cellules dans ce contexte particulier, notamment lors de stress répliatif (Mahajan et al., 2019; X. Wu, 2019). De récentes études suggèrent que seule la région N-terminale de RAD52, responsable de l'oligomérisation et de l'activité d'appariement de la protéine, et non sa capacité à interagir avec RAD51, est suffisante pour maintenir la viabilité des cellules déficientes pour BRCA2 (Hanamshet & Mazin, 2020).

De manière intéressante, chez les vertébrés, la délétion de RAD52 est également synthétique létale avec l'absence de XRCC3, une protéine paralogue de RAD51 présentée dans la section suivante (Fujimori et al., 2001). Cela suggère que, dans les cellules de mammifères, RAD52 et les paralogues de RAD51 ont des rôles redondants dans la réparation des dommages par la RH. Cette collaboration a également été observée dans d'autres organismes et requiert d'être approfondie (Gaines et al., 2015; Belan et al., 2021).

d) Les paralogues de Rad51

La formation des nucléofilaments Rad51 repose également sur la présence de complexes composés de protéines paralogues de Rad51. Des gènes paralogues sont, par définition, des gènes homologues descendants d'un gène ancestral et qui ont subi un phénomène de duplication. Ainsi, des gènes paralogues acquièrent des fonctions différentes à celles du gène ancestral.

Des gènes paralogues à la recombinaise Rad51 résultant de la duplication du gène ancestral RecA/RAD51 ont été retrouvés chez tous les eucaryotes (Z. Lin et al., 2006). Malgré une faible identité, Rad51 et ses paralogues sont structurellement proches (figure 13). En effet, les paralogues de Rad51 présentent tous le même « cœur » considéré comme canonique de Rad51, contenant les motifs Walker A et B responsables de la fixation et de l'hydrolyse de l'ATP. Ces paralogues possèdent également des extensions N-terminale et C-terminale qui leur sont propres et qui définissent probablement leur spécificité (J. Liu et al., 2011; Sasanuma et al., 2013). D'un point de vue biochimique, à la différence de Rad51 qui possède la capacité de former des filaments sur l'ADN de manière ATP-dépendante, les arguments en faveur de la formation de filaments par les paralogues sont rares. Cela suggère que les paralogues de Rad51 sont incapables de procéder à des recherches d'homologie comme la recombinaise.

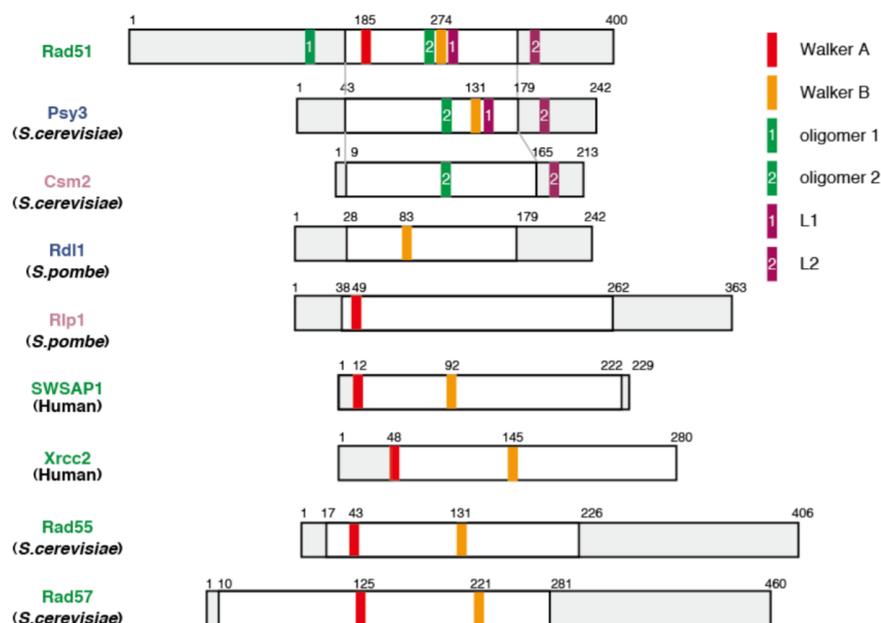


Figure 13. Représentation schématique de la recombinaise Rad51 et de ses paralogues chez les eucaryotes (Sasanuma et al., 2013)

La recombinaise Rad51 et ses paralogues présentent une structure quasi-similaire puisque tous possèdent le cœur canonique de Rad51 (en blanc). Par ailleurs, chaque protéine est composée ou non d'extensions N-terminale et C-terminale spécifiques, de tailles variables (en gris).

Rad55 et Rad57 sont les premières protéines paralogues de Rad51 à avoir été identifiées chez la levure *S. cerevisiae*. Membres du groupe d'épistasie de *RAD52*, l'absence de Rad55 et Rad57 provoque des défauts de recombinaison mitotique et méiotique. Rad55 et Rad57 partagent environ 20 à 30% d'identité avec Rad51, principalement au niveau du cœur canonique (Lovett & Mortimer, 1987; Kans & Mortimer, 1991). Ces protéines possèdent également des extensions N-terminale et C-terminale spécifiques. Rad55 et Rad57, co-purifiées par P. Sung (1997b), existent sous la forme d'un hétérodimère stable dont les simples et doubles mutants confèrent les mêmes phénotypes. Ce complexe ne forme, *a priori*, pas de filament. En effet, des analyses de double-hybride ont montré qu'il n'existe pas d'interaction entre deux Rad55 ni entre deux Rad57 (Hays et al., 1995). De plus, aucun nucléofilament Rad55-Rad57 n'a été détecté par microscopie électronique (J. Liu et al., 2011). Le complexe Rad55-Rad57 possède une activité ATPasique *in vitro*, non stimulée par la présence d'ADN, et, étonnamment, seule la mutation de la lysine conservée du motif Walker A de Rad55 provoque un léger défaut de RH (Johnson & Symington, 1995). Ces résultats, associés à des analyses biochimiques, soutiennent l'absence d'activité recombinase pour le complexe Rad55-Rad57 (Sung, 1997b). Il a été proposé que ce complexe s'associe au filament Rad51 au travers d'une interaction *in vivo* entre Rad55 et Rad51, vraisemblablement transitoire (Hays et al., 1995; Johnson & Symington, 1995; Sung, 1997b). Deux orthologues de Rad55 et Rad57 ont été retrouvés chez la levure *S. pombe*, respectivement Rhp55 et Rhp57. De manière intéressante, dans cet organisme, Rhp51 (orthologue de Rad51) interagit avec Rhp57 *in vivo* (Tsutsui et al., 2001). Malgré ces divergences, ces données suggèrent fortement l'existence d'une interaction entre le complexe Rad55-Rad57 et Rad51. Récemment, des modèles *in silico* pour le complexe Rad55-Rad57 et pour le trimère Rad55-Rad57-Rad51 ont été générés à partir du logiciel AlphaFold (Humphreys et al., 2021). De manière très intéressante, ce dernier modèle suggère que le complexe Rad55-Rad57 se lierait à l'extrémité 5' du filament Rad51, probablement au travers de la sous-unité Rad57. Néanmoins, les différentes interfaces mises en jeu entre Rad55-Rad57 et Rad51 restent méconnues. De plus, ce modèle n'est supporté par aucune étude fonctionnelle et le modèle Rad57-Rad51 est absent des bases de données. L'un des objectifs de ma thèse a donc été de définir les interfaces de Rad55-Rad57 impliquées dans la formation du complexe et dans l'interaction avec Rad51 afin d'approfondir l'étude du ou des rôles de ce complexe dans la régulation de la formation des filaments Rad51. L'interaction entre Rad55 et Rad57 est-elle médiée uniquement par leur cœur canonique ou fait-elle intervenir leur régions spécifiques N-terminale et C-terminale ? Rad55-Rad57 se positionne-t-il véritablement à l'une des extrémités du filament Rad51 et si oui, au travers de quelle(s) interface(s) ?

Malgré une faible abondance cellulaire du complexe Rad55-Rad57 (environ 10% de la quantité totale de Rad51) et une tendance à former des agrégats, les premiers essais de caractérisation des protéines ont mis en évidence que Rad55-Rad57 agit comme un médiateur des filaments Rad51, à l'image de Rad52. Rad55-Rad57 stimule l'échange de brin catalysé par Rad51 en atténuant *in vitro* l'effet inhibiteur de RPA sur la formation des nucléofilaments (Sung, 1997b). Le mécanisme d'action de Rad55-Rad57 reste cependant méconnu puisque, contrairement à Rad52, ce complexe n'interagit pas avec RPA *in vitro* (Hays et al., 1995; Roy et al., 2021). Le complexe Rad55-Rad57 favoriserait donc la formation des filaments Rad51 différemment de Rad52. Par ailleurs, il a été constaté que ces deux régulateurs induisent un effet additif *in vitro* dans la stimulation de l'activité d'échange de brin de Rad51 (Gaines et al., 2015). Cela suggère que Rad52 et le complexe Rad55-Rad57 seraient capables de collaborer dans la régulation de la formation des filaments Rad51. Il reste à déterminer si cette collaboration est médiée par une association directe ou non entre ces deux régulateurs. Une interaction en GST pull-down a bien été observée entre Rad52 et Rad55-Rad57 mais elle n'a jamais été reproduite depuis (Gaines et al., 2015). Pour en revenir au complexe Rad55-Rad57, il a été constaté que son absence induit une diminution des foyers Rad51 dans les cellules méiotiques et mitotiques. Réciproquement, la délétion de *RAD51* conduit à une baisse du nombre de foyers Rad55-Rad57 en réponse aux dommages (Gasior et al., 1998; Lisby et al., 2004; Fung et al., 2006, 2009). De plus, de premières études de ChIP ont suggéré que la délétion de *RAD55* retarde et diminue le recrutement de Rad51 à une CDB unique induite par l'endonucléase HO (Sugawara et al., 2003; Wolner et al., 2003). Ces données proposent que le complexe Rad55-Rad57 participe aux étapes précoces de la RH, et plus précisément à la polymérisation du filament Rad51. Une fois les filaments Rad51 installés sur l'ADNsb, Rad55-Rad57 pourrait contribuer à leur stabilisation en restant associé aux filaments Rad51 (J. Liu et al., 2011). Cette stabilisation pourrait résulter d'une modulation de la flexibilité des filaments sur une courte distance, comme cela a été proposé pour le complexe de paralogues de RAD51, RFS-1/RIP-1, chez le ver *Caenorhabditis elegans* (Taylor et al., 2015). Ce changement de conformation faciliterait l'invasion de brin catalysée par RAD51, en présence d'ATP (Taylor et al., 2015). De récentes expériences sur molécule unique ont montré, néanmoins, que l'interaction entre Rad51 et Rad55-Rad57 est transitoire, l'hydrolyse de l'ATP par Rad55 facilitant la dissociation du complexe Rad55-Rad57 des filaments Rad51 en extension (Roy et al., 2021). En effet, le mutant ATPase de Rad55 stabilise l'association avec le filament Rad51 mais il est également responsable de la sensibilité des cellules mutantes aux radiations ionisantes (Johnson & Symington, 1995). Ainsi, le complexe Rad55-Rad57 jouerait un rôle de

chaperonne moléculaire vis-à-vis des filaments Rad51. Cette fonction de chaperonne semble conservée chez les eucaryotes comme le montre le complexe RFS-1/RIP-1 qui se dissocie rapidement des filaments RAD51 en extension (Belan et al., 2021). Les paralogues de Rad51 pourraient donc participer de manière dynamique à l'élongation et la stabilisation du filament Rad51. Déterminer les régions impliquées dans l'interaction entre Rad51 et ses médiateurs aidera à améliorer la compréhension du ou des rôles des paralogues de Rad51, notamment dans la régulation des étapes précoces de la RH.

Les paralogues de Rad51 de levure ont longtemps été considérés comme des protéines accessoires. En effet, la délétion de *RAD55* ou de *RAD57* entraîne une sensibilité des cellules aux CDB beaucoup moins forte que celle observée pour les mutants du gène *RAD51* de la recombinase ou du gène *RAD52*. Cette sensibilité modérée des mutants *rad55* Δ et *rad57* Δ peut être supprimée soit par la surexpression de *RAD51*, soit par des supprimeurs correspondant à des mutations de *RAD51* entraînant une meilleure affinité pour l'ADN (Hays et al., 1995; Johnson & Symington, 1995; Fortin & Symington, 2002; Fung et al., 2009). Étonnamment, à faible température (20°C), la sensibilité des simples mutants *rad55* Δ et *rad57* Δ aux CDB augmente fortement, devenant alors identique à celle du mutant *rad51* Δ (Lovett & Mortimer, 1987). De plus, la délétion des gènes *RAD55* ou *RAD57* impacte fortement la viabilité des produits méiotiques, suggérant que leur fonction est essentielle à la bonne ségrégation des chromosomes (Lovett & Mortimer, 1987). Le ou les rôles de Rad55-Rad57 dans la formation des nucléofilaments sont donc encore mal compris. En addition de sa fonction médiatrice, il a été proposé que le complexe Rad55-Rad57 protégerait les filaments Rad51 de l'action de démantèlement de Srs2 (voir section III.A).

Par ailleurs, la mutation *rad57* Δ provoque de sévères défauts de recombinaison spontanée entre séquences répétées en position directe et ce défaut n'est pas supprimé par la surexpression de *RAD51* (Mozlin et al., 2008). De plus, tandis que les mutations *rad55* Δ ou *rad57* Δ ne sensibilisent pas les cellules aux UV (Game & Mortimer, 1974), en absence de ces protéines, la fréquence de RH UV-induite est fortement diminuée (Maloisel et al., 2023). Cela suggère que les événements à l'origine de la recombinaison spontanée entre séquences répétées directes et de la RH UV-induite ne seraient pas des CDB mais des brèches simple-brin. Ainsi, Rad55-Rad57 a un rôle accessoire dans la réparation des CDB et un rôle essentiel dans la réparation des brèches simple-brin. Au travers de ce rôle crucial, Rad55-Rad57 participe à la compétition qui existe dans les voies de DDT entre la RH et la STL pour la prise en charge des brèches simple-brin laissées en arrière des fourches de réplication (voir section III.B) (Rattray et al., 2002; Maloisel et al., 2023).

Rad55-Rad57 a également pour fonction de ponter des interactions entre Rad51 et d'autres régulateurs positifs tel que le complexe SHU, second complexe composé de protéines paralogues de Rad51 à avoir été décrit chez la levure (S. Godin et al., 2013). Le complexe SHU (ou PCSS) se présente sous la forme d'un hétérotétramère stable, comprenant les protéines paralogues de Rad51, Csm2, Psy3 et Shu1, associés à la protéine à domaine SWIM, Shu2 (Shor et al., 2005). Les paralogues formant le complexe SHU ne partagent que de faibles pourcentages d'identité avec Rad51, notamment 10% et 13% pour Csm2 et Psy3 respectivement (Tao et al., 2012). Des résultats d'analyses de double-hybride ont montré que la protéine Csm2 interagit avec la protéine Psy3 qui elle-même interagit avec Shu1 et Shu2. Cependant, Csm2 n'interagit ni avec Shu2 ni avec Shu1 (Shor et al., 2005). Csm2 et Psy3 ne sont formés quasiment que du cœur canonique de Rad51 et leurs structures se rapprochent de celle du domaine ATPasique de la recombinaise comme illustré dans la figure 14A (She et al., 2012; Tao et al., 2012; Sasanuma et al., 2013). Ils disposent également d'un domaine de liaison à l'ADN, ressemblant à celui de Rad51 mais indépendant de l'ATP, *via* une extension présente à la fois chez Rad51, Csm2 et Psy3, la boucle « L2 ». Cette structure basique suggère que Csm2 et Psy3 interagissent entre eux comme deux monomères de Rad51 (Tao et al., 2012; Sasanuma et al., 2013). Aucune activité ATPase, ni recombinaise n'ont été détectées pour le complexe SHU à ce jour. D'autre part, bien que Shu1-Shu2 ne soit pas capable de lier l'ADN, un second site d'interaction avec l'ADN se situerait au sein du complexe Psy3-Shu1-Shu2. Cela pourrait permettre d'accrocher, par exemple, de l'ADNdb tandis que le premier site, représenté par Csm2-Psy3, fixerait de l'ADNsb. La fixation à l'ADN est nécessaire à la fonction *in vivo* du complexe SHU et non pas à sa formation (Tao et al., 2012; Rosenbaum et al., 2019). Il est à noter qu'à la différence du complexe Rad55-Rad57, la structure cristallographique du complexe SHU est résolue, représentée dans la figure 14B (S. Zhang et al., 2017). Par ailleurs, des analyses double-hybride ont montré que les complexes de paralogues de Rad51, Rad55-Rad57 et SHU, sont capables de s'associer au travers d'une interaction entre les sous-unités Csm2 et Rad55. Cette association a été confirmée *in vivo* par des expériences de coIP (S. Godin et al., 2013; X. Xu et al., 2013; Gaines et al., 2015). Cette interaction entre les complexes de paralogues de Rad51 permet au complexe SHU d'interagir avec la recombinaise et Rad52 au travers du complexe Rad55-Rad57 (S. Godin et al., 2013; Gaines et al., 2015). Cela suggère que les fonctions du complexe SHU dans la RH vis-à-vis du filament Rad51 dépendraient de sa fixation au complexe Rad55-Rad57. Un complexe SHU a également été identifié chez la levure *S. pombe*. Ce complexe SHU est composé d'une protéine à domaine SWIM, Sws1, homologue à la protéine Shu2 associée, elle

aussi, à des protéines paralogues de Rad51, Rlp1 (proche de XRCC2) et Rdl1 (proche de Psy3 et RAD51D) (Martín et al., 2006).

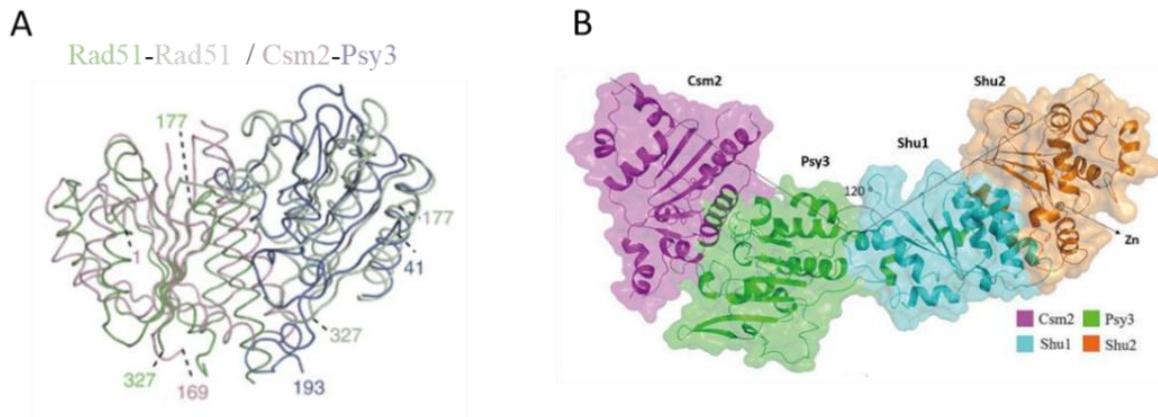


Figure 14. Représentation structurale du complexe SHU

(A) Superposition d'un dimère de Rad51 avec un dimère Csm2-Psy3 (Sasanuma et al., 2013)
 (B) Modèle structural du complexe SHU formé des protéines paralogues de Rad51, Csm2, Psy3 et Shu1 et de la protéine à domaine SWIM, Shu2 (S. Zhang et al., 2017).

Les premiers membres du complexe SHU à avoir été identifiés sont les gènes *CSM2* et *PSY3* dont les délétions induisent, respectivement, des défauts de ségrégation méiotique des chromosomes ou une sensibilité au platine, une substance utilisée dans les traitements des cancers (Rabitsch et al., 2001; H. I. Wu et al., 2004). Il a ensuite été observé que la délétion de chacune des protéines du complexe SHU supprime la croissance ralentie de souches *top3Δ* ainsi que la sensibilité au HU des souches *sgs1Δ* (Shor et al., 2005). Ainsi, les mutations du complexe SHU sont associées à une diminution des événements de recombinaison. De plus, la délétion des membres du complexe SHU est associée à une diminution des produits de méiose viables, phénomènes plus marqués dans les mutants *csm2Δ* et *psy3Δ*, et à un défaut de biais inter-homologues de recombinaison (S. Hong & Kim, 2013; Sasanuma et al., 2013; S. K. Godin et al., 2015). Les mutants du complexe SHU sensibilisent également les cellules à certains agents alkylants tel que le MMS (Shor et al., 2005).

Des études génétiques et biochimiques ont permis de mettre en évidence la participation du complexe SHU dans la régulation des étapes précoces de la RH. En effet, la délétion de *RAD52* mais également celles de *RAD51* et *RAD55* sont épistatiques sur la délétion du complexe SHU, suggérant que ce complexe intervient bien dans la voie de la RH (Shor et al., 2005; Mankouri et al., 2007; S. Godin et al., 2013). Il a également été observé que le complexe SHU favorise la réparation des dommages par les voies de CG dépendantes de Rad51 aux dépens de la voie SSA (S. Godin et al., 2013; Gaines et al., 2015). Pour cela, le complexe SHU facilite *in vitro* la formation des filaments Rad51 sur l'ADNsb recouvert de RPA, de manière

additive avec Rad52 et Rad55-Rad57 (Gaines et al., 2015). Il est à noter que l'activité du complexe SHU dépend exclusivement de son interaction avec le complexe Rad55-Rad57. En effet, la mutation Csm2-F46A induit une perte spécifique d'interaction avec Rad55 et confère aux cellules des phénotypes similaires au mutant *csm2Δ*. De plus, la phosphorylation de Rad55 modulerait son interaction avec Csm2, affectant ainsi l'efficacité de la RH, plus particulièrement dans un contexte de stress répliatif (Bashkirov et al., 2000, 2006; Herzberg et al., 2006; Bonilla et al., 2021). De manière surprenante, le complexe Csm2-Psy3 est suffisant pour stimuler *in vitro* la formation du filament Rad51, ce qui suggère que l'interaction à l'ADN médiée par Csm2-Psy3 intervient dans cette étape. Une fonction potentielle pour le dimère Shu1-Shu2 pourrait être de protéger les filaments contre l'activité déstabilisatrice de Srs2 (voir section III.A). A la différence de Rad52 ou de Rad55-Rad57, l'absence du complexe SHU conduit à une sensibilité modérée à des agents bloquant principalement la réplication tel que le MMS et à aucune sensibilité aux radiations ionisantes. De manière intéressante, la sensibilité des mutants du complexe SHU n'est supprimée ni par la surexpression de *RAD51*, ni de *RAD55-RAD57* (S. Godin et al., 2013). Cela suggère que, à la différence de Rad55-Rad57 qui peut agir dans la réparation des CDB et des brèches simple-brin, le complexe SHU reconnaît des lésions bien plus spécifiques et interviendrait davantage dans un contexte de stress répliatif. En effet, le complexe SHU se fixe de préférence à des structures semblables à des fourches de réplication bloquées ou encore au niveau de lésions pouvant engendrer un blocage de ces fourches tels que des sites abasiques (S. K. Godin et al., 2016; Rosenbaum et al., 2019; Bonilla et al., 2021). Ces données ont permis de suggérer que, comme Rad55-Rad57, le complexe SHU interviendrait également dans la balance entre RH et STL (voir section III.B) (Ball et al., 2009; X. Xu et al., 2013). Cependant, le ou les rôles du complexe SHU dans la recombinaison méiotique et mitotique restent encore mal définis et nécessitent des études plus approfondies.

Quoiqu'il en soit, en prenant en compte les nombreuses données acquises concernant les paralogues de Rad51 chez la levure, nous pouvons proposer l'hypothèse suivante. Dans un contexte de stress répliatif, le complexe SHU se fixerait à une jonction ADNdb-ADNsb semblable à une brèche simple-brin retrouvée en aval de la fourche de réplication. Ce complexe s'associerait ensuite au complexe Rad55-Rad57, lui-même lié à l'extrémité 5' d'un filament Rad51. La formation de ce « mégacomplexe » stabiliserait le filament Rad51, potentiellement en l'ancrant à l'ADN et en modifiant sa conformation. Ces filaments Rad51 pourraient alors résister plus facilement à l'activité déstabilisatrice de Srs2 (section III.A) et pourraient prévenir le recrutement des polymérases translésionnelles (section III.B).

Chez les eucaryotes supérieurs, six protéines paralogues ont été identifiées. RAD51B, RAD51C, RAD51D ont été identifiées par alignement de séquence avec RAD51 (Albala et al., 1997; Dosanjh et al., 1998; Pittman, Weinberg, et al., 1998). XRCC2 et XRCC3 (pour X-ray Repair Cross Complementing) ont été isolées grâce à leur capacité à compléter les défauts de réparation de l'ADN et d'instabilité chromosomique des lignées cellulaires de hamsters *irs1* et *irs1SF* (Tebbs et al., 1995; Tambini et al., 1997; Cartwright et al., 1998). Ces cinq protéines partagent 20 à 30% d'identité avec RAD51 (Thacker, 1999). SWSAP1, dernière protéine paralogue de RAD51 identifiée, présente une importante divergence avec RAD51 et partage environ 24% d'homologie de séquence avec la recombinaise RadA retrouvée chez les archées (T. Liu et al., 2011). Des analyses de double-hybride et de coIP ont révélé que ces paralogues s'assemblent sous forme de trois complexes distincts : le complexe RAD51B-RAD51C-RAD51D-XRCC2 (BCDX2), composé des sous-complexes BC et DX2, le complexe RAD51C-XRCC3 (CX3) et le complexe SHU composé de la protéine paralogue de RAD51, SWSAP1, de la protéine à domaine SWIM, SWS1, et de la protéine SPIDR (SWASP1-SWS1-SPIDR), associées ou non à la protéine PDS5B (Braybrooke et al., 2000; Schild et al., 2000; Masson, Tarsounas, et al., 2001; Masson, Stasiak, et al., 2001; Miller et al., 2002; T. Liu et al., 2011; Martino et al., 2019). RAD51C forme un autre complexe avec les protéines RAD51, BRCA2 et PALB2 (Partner And Localiser of BRCA2) qui favorise le relargage de BRCA2 après nucléation de RAD51 sur l'ADNsb (J.-Y. Park et al., 2014). Comme chez la levure, le complexe SHU peut s'associer aux complexes de paralogues canoniques de RAD51. En effet, SWSAP1 interagit *in vivo* et *in vitro* avec les paralogues de RAD51, excepté XRCC2 tandis que SWS1 s'associe à RAD51D (Martín et al., 2006; T. Liu et al., 2011). Toutefois, les raisons de ces associations ainsi que les régions d'interaction demeurent énigmatiques. De plus, il n'existe aucun modèle pour le complexe SHU. En revanche, des modèles structuraux et une structure cristallographique ont été récemment publiés, respectivement pour les complexes BCDX2 et CX3 (figure 15) (Greenhough et al., 2023; Rawal et al., 2023; Longo et al., 2023). Selon les modèles, la formation du complexe BCDX2 (figure 15A) se rapproche de l'association de multiples monomères de RAD51, sans pour autant former de filaments. Cependant, à la différence des filaments RAD51, les régions N-terminales de chacun des paralogues s'enchevêtrent afin de renforcer les interactions au sein du complexe BCDX2. Concernant le complexe CX3 (figure 15B), le modèle propose deux interfaces d'interaction entre les deux partenaires avec une première interface située entre les deux régions C-terminales des deux protéines et une seconde interface reliant la région N-terminale de XRCC3 avec le domaine C-terminal de RAD51C. Aucune de ces protéines paralogues de RAD51 ne possède le motif de

polymérisation FxxA. Ces modèles ont permis d'initier de premières analyses fonctionnelles afin de mieux appréhender les rôles de ces complexes de paralogues de RAD51 dans la régulation de la RH. Par ailleurs, plusieurs des paralogues de RAD51 pourraient interagir avec la recombinase. Le complexe BC semble s'associer *in vitro* avec RAD51, vraisemblablement au travers de la sous-unité RAD51B (Lio et al., 2003; Greenhough et al., 2023). Un domaine de XRCC3 serait capable d'accueillir le motif de polymérisation FTTA de RAD51, induisant la liaison de CX3 à l'extrémité 5' du filament RAD51 (Schild et al., 2000; Longo et al., 2023). Enfin, SWSAP1 interagit avec RAD51, au travers du motif hautement conservé FxxA situé dans sa région N-terminale (Matsuzaki et al., 2019). Ces différentes interactions potentielles entre RAD51 et ses paralogues suggèrent que, comme chez la levure, ces complexes de protéines stabiliseraient les filaments RAD51 en se positionnant à l'une des extrémités de ces derniers. Ces fixations pourraient elles aussi permettre de protéger les filaments contre l'activité de désassemblage des diverses hélicases (voir section III.A). Cependant, les régions impliquées dans ces interactions restent plus ou moins mal définies, limitant les études fonctionnelles de ces associations.

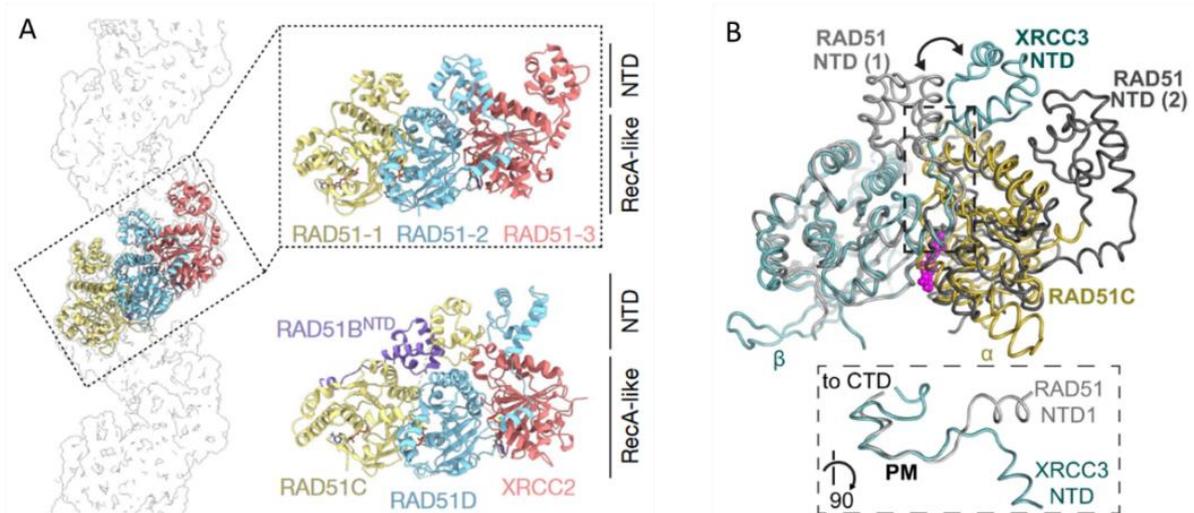


Figure 15. Comparaison structurale des complexes BCDX2 et CX3 avec le filament RAD51

- (A) A l'image de la formation du filament RAD51, les paralogues de RAD51 s'associent *via* les domaines canoniques « RecA-like » et les régions N-terminales de chaque protéine. Ces régions spécifiques des paralogues renforcent les interactions (Greenhough et al., 2023).
- (B) La superposition du complexe CX3 du ver *Alvinella pompejana* avec un dimère de RAD51 de mammifère lié à l'ATP (en rose) révèle une différence de positionnement entre les régions N-terminales de XRCC3 et de RAD51 (Longo et al., 2023).

Chez les mammifères, les paralogues de RAD51 jouent un rôle clé dans le mécanisme de la RH, bien que leurs rôles précis restent mal compris. Les mutations des cinq paralogues canoniques de RAD51 provoquent un défaut de viabilité des embryons de souris (D.-S. Lim & Hasty, 1996) et des défauts de recombinaison (Takata et al., 2001). Plus récemment, il a été observé que l'absence de ces mêmes protéines paralogues de RAD51 dans les cellules U2OS et HEK293 engendre une sensibilité accrue aux dommages à l'ADN et une réduction du nombre de foyers RAD51 formés (Garcin et al., 2019). Enfin, des mutations des paralogues canoniques de RAD51 ont été identifiées dans différents types de cancers (Sullivan & Bernstein, 2018). La délétion de *SWSAP1* est viable mais provoque la stérilité des organismes porteurs de cette mutation (Abreu et al., 2018). Cette infertilité serait la conséquence d'un défaut de formation des foyers RAD51 et DMC1 méiotiques. La baisse des foyers RAD51 est également observée dans les cellules végétatives déficientes pour *SWSAP1* (Martino et al., 2019). Néanmoins, le rôle du complexe SHU humain est encore mal compris.

La caractérisation des complexes BCDX2 et CX3 a montré qu'ils n'intervenaient pas aux mêmes étapes du processus de RH (Chun et al., 2013). En réponse aux dommages, BCDX2 est recruté sur l'ADNsb afin de promouvoir la formation des filaments RAD51 et de stimuler l'échange de brins catalysé par ces filaments en atténuant l'effet inhibiteur de RPA *in vivo* (Sigurdsson et al., 2001; Yokoyama et al., 2004). BCDX2 possède une activité ATPase stimulée par la présence d'ADNsb (Masson, Tarsounas, et al., 2001). Il a alors été proposé que, à l'image du complexe Rad55-Rad57 de levure, la fixation de BCDX2 sur l'ADNsb facilite le recrutement de RAD51 au site de dommage. Puis, l'hydrolyse de l'ATP par BCDX2 conduit à sa dissociation des filaments RAD51, suggérant que ce complexe agirait également comme une chaperonne (Greenhough et al., 2023; Rawal et al., 2023). Il est à noter que, à la différence de Rad55-Rad57, le complexe BCDX2 est capable d'interagir avec RPA lié à l'ADNsb, expliquant sa fonction médiatrice (Rawal et al., 2023). Étonnamment, les complexes DX2 et CX3 seraient capables de former des filaments, différents néanmoins des filaments RAD51, leur permettant potentiellement de catalyser des appariements de brins entre ADNsb et ADNdb *in vitro* (Kurumizaka et al., 2001, 2002). De manière intéressante, les études menées chez la plante ont mis à jour un rôle de XRCC2, RAD51B et RAD51D favorisant le processus de SSA, une voie indépendante de RAD51 (Serra et al., 2013). Ce résultat est en opposition avec le rôle décrit pour les paralogues de Rad51 chez la levure et chez les mammifères qui tendent à favoriser les voies de RH dépendantes de Rad51.

A l'image des paralogues de levures, les complexes de paralogues de RAD51 retrouvés chez les vertébrés seraient également impliqués dans le processus de RH initié par un stress réplicatif. RAD51C, XRCC2 et XRCC3 assurent notamment la protection des brins naissants des fourches de réplication contre la dégradation de l'ADN catalysée par MRE11 (Somyajit et al., 2015). De récentes avancées ont été faites concernant le complexe CX3 à l'aide de la structure cristallographique générée et de variants de RAD51C identifiés dans les cancers (Longo et al., 2023). L'association de CX3 à l'extrémité 5' du filament RAD51 stabilise les filaments sur les fourches de réplication bloquées, potentiellement en le rigidifiant comme cela a été proposé pour les paralogues de *C. elegans*. Il a été constaté qu'une perte partielle d'interaction entre un mutant de RAD51C et XRCC3 résulte en un désassemblage rapide des filaments RAD51, conduisant à un défaut de protection des fourches. En revanche, si l'intégrité de CX3 est maintenue mais que RAD51C n'est plus capable de se lier à l'ADNsb, cela empêche la formation des filaments RAD51 et altère fortement le redémarrage des fourches (Longo et al., 2023). Ces travaux ont ainsi mis à jour les premiers mutants de séparation de fonctions d'une protéine paralogue de RAD51. D'autre part, le complexe SHU humain, SWS1-SWSAP1, pourrait également prendre en charge les brèches simple-brin formées lors du blocage des fourches de réplication. En effet, les mutations de *SWSAP1* et *SWS1* sensibilisent les cellules au MMS, non aux radiations ionisantes, et induisent une diminution des foyers RAD51 (T. Liu et al., 2011). Les fonctions de ces différents complexes nécessitent d'être mieux définies.

Les protéines paralogues de Rad51 sont donc hautement conservées au sein des nombreux phylums eucaryotes. De plus, la présence d'un nombre aussi important de protéines paralogues de Rad51 dans les différents organismes eucaryotes reflète la complexité de la régulation de la formation des filaments Rad51. Cependant, les divergences de phénotypes entre les paralogues des divers organismes mettent en évidence la variabilité dans la nécessité des protéines paralogues dans la formation et la stabilisation des filaments Rad51.

3. Invasion de brin et Synthèse réparatrice

a) La protéine Rad54 et son homologue Rdh54

Les nucléofilaments Rad51, formés à l'aide de protéines accessoires, peuvent ensuite procéder à la recherche d'homologie. Pour cela, ils sont généralement associés à une autre protéine accessoire, la protéine Rad54 qui appartient aux protéines fondamentales du processus de RH. Chez la levure, la délétion de cette protéine provoque de sévères défauts de

recombinaison comparables à ceux observés pour les mutants *rad51Δ* (Schmuckli-Maurer et al., 2003). De plus, les mutants de Rad54 sont déficients dans la production de CG intra ou interchromosomiques (M. Shinohara et al., 1997). La fonction importante de Rad54 au cours du processus de RH est conservée chez les eucaryotes (Kanaar et al., 1996). La délétion de RAD54 chez la souris n'impacte pas la viabilité cellulaire. Cependant, l'ablation de *RAD54* sensibilise les cellules notamment aux radiations ionisantes et à d'autres agents endommageant l'ADN, conduisant à des défauts de recombinaison (Essers et al., 1997, 2002).

Rad54, protéine hautement conservée au sein des eucaryotes, appartient à la famille des hélicases/translocases Swi2/Snf2, responsables du remodelage de chromatine nécessaire à la transcription et à la réplication de l'information génétique (Gorbalenya & Koonin, 1993; Eisen et al., 1995; Alexeev et al., 2003; Ceballos & Heyer, 2011). Cependant, aucune activité hélicase n'a été mise en évidence pour cette protéine (Petukhova et al., 1998; Swagemakers et al., 1998). En revanche, Rad54 est considéré comme un moteur moléculaire de la RH grâce à sa capacité à transloquer sur l'ADN, ce qui lui permet de guider l'invasion de brin réalisée par les filaments Rad51 (figure 16) (Petukhova et al., 1998; Ristic et al., 2001; Mazina & Mazin, 2004; Tavares et al., 2019). Rad54 possède une activité ATPase dépendante de l'ADNdb, essentielle *in vivo* à la fonction de la protéine (Clever et al., 1999; Petukhova et al., 1999; Kiianitsa et al., 2002). Rad54 interagit *in vitro* et *in vivo* avec la recombinase Rad51, plus spécifiquement aux extrémités des filaments, ce qui induit son recrutement aux sites de dommages (Jiang et al., 1996; Clever et al., 1997; Golub et al., 1997; Alexiadis et al., 2004; Raschle et al., 2004; Kiianitsa et al., 2006). En effet, la formation de foyers Rad54 dépend de la présence de Rad51, démontrant que Rad54 intervient dans les étapes tardives de recombinaison, soit après l'assemblage des filaments Rad51 (Mazin et al., 2000; Fabre et al., 2002; Lisby et al., 2004). Rad54 participerait ainsi à la stabilisation et à la protection des filaments Rad51 sur l'ADN *in vitro*, indépendamment de son activité ATPase (Mazin et al., 2003; Wolner et al., 2003; Wolner & Peterson, 2005). Par ailleurs, l'interaction entre Rad54 et Rad51 stimule fortement l'échange de brins catalysé par la recombinase (Petukhova et al., 1998). Des études biochimiques ont révélé que la présence de complexes Rad51-ADN stimule l'activité ATPase de Rad54 *in vivo* (Mazin et al., 2003; Van Komen et al., 2000; Kiianitsa et al., 2002). Cette stimulation est médiée par l'interaction directe et spécifique entre les deux protéines (Clever et al., 1997). L'hydrolyse de l'ATP par Rad54 lui permet de transloquer rapidement sur l'ADNdb à une vitesse d'environ 300 pb par seconde, générant des changements topologiques de l'ADN (Tan et al., 1999; Jaskelioff et al., 2003; Amitani et al., 2006). Cette haute processivité hélicase suggère que

Rad54 forme une structure multimérique qui, potentiellement, entoure l'ADN (Petukhova et al., 1999; Kiianitsa et al., 2006). La translocation de Rad54 entraîne alors la séparation des brins d'ADN localement, facilitant la recherche d'homologie catalysée par Rad51 et, par conséquent, la formation de structures intermédiaires caractéristiques de la RH, les D-loops (Van Komen et al., 2000; Solinger et al., 2001; Alexeev et al., 2003; Mazina & Mazin, 2004; Z. Zhang et al., 2007; Wright & Heyer, 2014; Tavares et al., 2019; Crickard, Moevus, et al., 2020). Ainsi, Rad54 est requise à l'échange de brin catalysé par Rad51 chez la levure. Chez l'Homme, RAD51 forme des D-loops sans RAD54 mais en présence de Ca^{2+} . Toutefois, RAD54 stimule l'activité de RAD51 (Bugreev & Mazin, 2004). Lors de la phase post-synaptique de la RH, l'hydrolyse de l'ATP par Rad54 favorise *in vitro* l'extension des hétéroduplex d'ADN formés lors de l'invasion de brins (Solinger & Heyer, 2001).

Rad54 joue également un rôle de régulateur négatif des filaments Rad51 sur l'ADNdb. Une fois l'homologie trouvée, le filament Rad51 doit être désassemblé afin d'initier la synthèse réparatrice qui intervient lors de l'étape post-synaptique de la RH (Vasianovich et al., 2017). L'hydrolyse de l'ATP par Rad51 facilite le décrochage des monomères de l'ADNdb. Or, Rad51 présente une activité ATPase plus faible que son homologue RecA (Sung, 1994). Il est par conséquent crucial de stimuler la dégradation de l'ATP par Rad51. Rad54 exerce cette stimulation et favorise la dissociation des filaments Rad51 de l'ADNdb une fois l'échange de brin effectué (Solinger et al., 2002; X. Li et al., 2007; X. Li & Heyer, 2009). Cette dissociation semble être favorisée par la phosphorylation de Rad54 (J. Spies et al., 2016; Lengert et al., 2019). Rad54 participe à la migration de branche des structures intermédiaires formées (Bugreev et al., 2006; Mazina et al., 2007; Goyal et al., 2018). Enfin, Rad54 s'associe physiquement aux complexes Mus81-Mms4 chez la levure ou MUS81-EME1 chez les mammifères, ce qui tend à faciliter la résolution des jonctions de Holliday (Interthal & Heyer, 2000; Mazina & Mazin, 2008; Matulova et al., 2009).

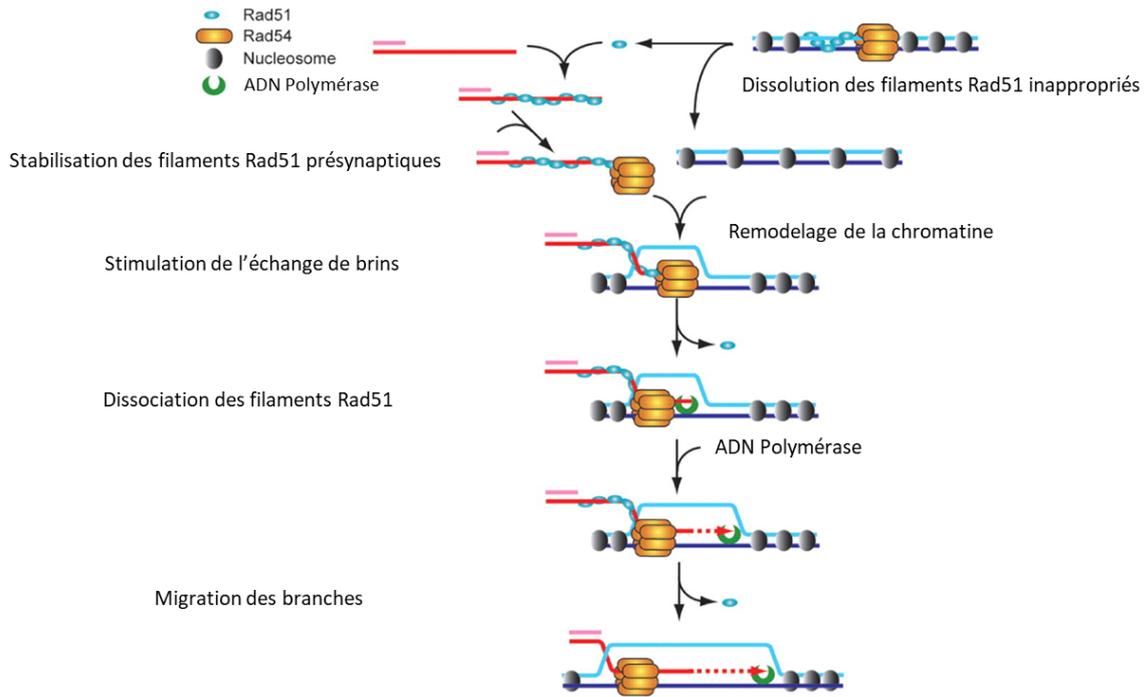


Figure 16. Modèle d'action de Rad54 dans le processus de RH (adaptée de X. Li & Heyer, 2009)

La protéine Rad54 joue deux rôles antagonistes dans la régulation des filaments Rad51. Lors des phases présynaptique et synaptique, Rad54 stabilise les filaments Rad51 et stimule leur activité d'échange de brins. Une fois l'homologie trouvée, Rad54 favorise l'hydrolyse de l'ATP par Rad51 afin de faciliter la dissociation des filaments de l'ADNsb. Les ADN polymérases peuvent alors initier la synthèse réparatrice à partir des extrémités 3'OH envahissantes.

Une protéine homologue à Rad54, nommée Rdh54 (Rad homologue 54) ou Tid1 (Two-hybrid interaction with Dmc1) a été identifiée chez la levure *S. cerevisiae* (Dresser et al., 1997; Klein, 1997; M. Shinohara et al., 1997). A l'image de Rad54, Rdh54 possède une activité ATPase qui lui permet de transloquer sur l'ADNdb, de remodeler la chromatine, de stimuler la formation des D-loops par Rad51 et de dissocier les filaments Rad51 de l'ADNdb (Petukhova et al., 2000; Chi, Kwon, et al., 2006; Nimonkar et al., 2007; Prasad et al., 2007; Kwon et al., 2008; Shah et al., 2010; Keymakh et al., 2022). Rad54 et Rdh54 présentent néanmoins des différences fonctionnelles. Les souches mutantes haploïdes *rdh54Δ* sont peu sensibles aux agents endommageant l'ADN tel que le MMS, à la différence des mutants *rad54Δ* (Klein, 1997; M. Shinohara et al., 1997). En revanche, la combinaison des deux mutants augmente la sensibilité des souches aux dommages de l'ADN, ce qui suggère que ces protéines ont des rôles redondants. Cette sensibilité est par ailleurs supprimée par la délétion de *RAD51*, suggérant la formation d'évènements de recombinaison inappropriés (Shah et al., 2010). D'autre part, Rdh54 semble être davantage spécifique à la méiose, favorisant la réparation des dommages par recombinaison inter-homologue, bien qu'elle soit présente dans les cellules somatiques. Seule Rdh54 interagit avec Dmc1 *in vitro* de façon ATP-dépendante, afin de stimuler la formation des

D-loop par Dmc1 puis sa dissociation une fois l'échange effectué (Dresser et al., 1997; Holzen et al., 2006; Nimonkar et al., 2012; Crickard, Kwon, et al., 2020). Chez les mammifères, la protéine homologue à RAD54 est nommée RAD54B qui, selon les données génétiques, n'est pas l'équivalent de Rdh54 chez la levure (Flaus et al., 2006).

b) Le complexe Swi5-Sfr1

Chez la levure bourgeonnante *S. cerevisiae*, le complexe Mei5-Sae3 est impliqué spécifiquement dans la formation des filaments Rad51 et Dmc1 en méiose (Hayase et al., 2004; Tsubouchi & Roeder, 2004). En revanche, son homologue retrouvé chez la levure *S. pombe*, l'Homme ou encore la souris, le complexe Swi5-Sfr1 (ou SWI5-SFR1/MEI5), intervient également dans la recombinaison dépendante de Rad51 dans les cellules somatiques (Akamatsu et al., 2003, 2007; Yuan & Chen, 2011; Tsai et al., 2012). L'ablation de *SWI5* ou *SFR1* sensibilise les cellules à divers agents endommageant l'ADN et provoque des défauts de recombinaison. Le complexe Swi5-Sfr1 est ainsi considéré comme un régulateur positif participant à la RH, indépendamment et en parallèle des paralogues de Rad51, Rph55-Rph57 (Akamatsu et al., 2007; Argunhan et al., 2020).

Des expériences biochimiques ont montré que Swi5-Sfr1 stimule efficacement *in vitro* l'échange de brin catalysé par la recombinase Rad51, mais également par son homologue spécifique à la méiose Dmc1 (Haruta et al., 2006). Cette stimulation dépend de l'interaction directe et spécifique entre Swi5-Sfr1 et Rad51 qui repose plus particulièrement sur Sfr1. La région N-terminale de Sfr1 possède deux domaines essentiels à l'interaction avec Rad51, détectés par spectroscopie RMN, ainsi qu'un domaine de fixation à l'ADNsb et à l'ADNdb (Haruta et al., 2006; Kuwabara et al., 2012; Argunhan et al., 2020). La région C-terminale de Sfr1 assure la formation du complexe avec Swi5 et, par conséquent, son activité (Kuwabara et al., 2010, 2012). Chez la levure *S. pombe*, Swi5-Sfr1 ne participe pas à la formation des filaments Rad51 à la différence de la souris (Lu et al., 2018). Toutefois, chez les eucaryotes, l'association de Swi5-Sfr1 avec Rad51 stabilise les nucléofilaments Rad51 *in vitro*, de manière ATP-dépendante (Kurokawa et al., 2008; Tsai et al., 2012; Su et al., 2014). De plus, le complexe Swi5-Sfr1 stimule l'hydrolyse de l'ATP par Rad51 à des concentrations substoichiométriques et facilite le relargage de l'ADP (Su et al., 2014; Argunhan et al., 2020). Cela augmente efficacement l'échange de brins catalysé par Rad51. L'élimination de Swi5-Sfr1 dépendrait de l'action de Rph54, homologue de Rad54 (Akamatsu et al., 2007). Récemment, il a été montré

que la phosphorylation de Sfr1 favorise la dissociation du complexe Swi5-Sfr1 des nucléofilaments Rad51 (P. Liang et al., 2023).

Le ou les rôles moléculaires du complexe Swi5-Sfr1 restent encore mal définis, tout comme les potentielles interactions avec les autres régulateurs des filaments Rad51.

c) Les ADN polymérases

La synthèse réparatrice qui suit l'invasion de brin est une étape critique du processus de réparation des dommages de l'ADN par la RH puisqu'elle permet de restaurer l'intégrité de la molécule d'ADN endommagée. Les extrémités 3' qui ont servi à l'envahissement sont alors utilisées comme amorces par les ADN polymérases qui procèdent à la synthèse de l'information génétique. Chez les eucaryotes, des analyses biochimiques ont proposé que plusieurs polymérases, répliquatives et translésionnelles, seraient capables de synthétiser l'ADN à partir d'intermédiaires de recombinaison. Toutefois, selon diverses études génétiques et biochimiques, la polymérase répliquative Pol δ semble être la protéine centrale du processus de synthèse réparatrice retrouvée dans les différentes voies de la RH. Chez la levure, la polymérase Pol δ , membre de la famille B des polymérases, est composée de trois sous-unités. Pol3 est la sous-unité catalytique possédant l'activité polymérase de polarité 5'-3' ainsi qu'une activité exonucléase 3'-5' lui permettant de corriger d'éventuelles erreurs incorporées (Boulet et al., 1989; Simon et al., 1991). Pol3 est associée aux deux sous-unités régulatrices Pol31 et Pol32 nécessaires à la processivité de la réplication (Gerik et al., 1998; Johansson et al., 2001). Les premières études réalisées sur des allèles thermosensibles de la sous-unité Pol3 ont permis de mettre à jour l'implication de la polymérase Pol δ dans la réparation de l'ADN par recombinaison (Fabre et al., 1991). Par la suite, l'identification d'un autre mutant de la sous-unité Pol3 a permis de préciser le rôle de la polymérase Pol δ dans la recombinaison homologue. Le mutant *pol3-ct* (pour C-terminal truncation) n'est pas sensible aux agents endommageant l'ADN et ne présente pas de défaut de viabilité des produits méiotiques. En revanche, bien que la réparation des CDB ne soit pas affectée, les intermédiaires de recombinaison sont plus courts dans le mutant *pol3-ct*. De plus, cette mutation est associée à un défaut de CG méiotique et mitotique ainsi qu'à une diminution de la production de CO (Maloisel et al., 2004, 2008). Des analyses de double-hybride ont montré que la mutation *pol3-ct* entraîne une perte d'interaction avec la sous-unité Pol31 (Brocas et al., 2010). Les différents phénotypes du mutant de *pol3-ct* démontrent le rôle crucial de la polymérase Pol δ dans la RH, favoriser l'élongation des hétéroduplex d'ADN. Ce rôle de la polymérase Pol δ ne peut vraisemblablement pas être

compensé par une autre polymérase. Cela n'exclut pas, cependant, une probable implication d'autres polymérases dans la synthèse de l'ADN lors d'évènements de recombinaison. Pour une fonction optimale, la polymérase Pol δ est associée au facteur de processivité PCNA chargé par la protéine RFC mais également à l'hélicase Pif1 (X. Li et al., 2009; J. Li et al., 2013; Wilson et al., 2013). Des données génétiques et moléculaires ont révélé que l'hélicase Pif1 stimule la synthèse de longs fragments d'ADN par la polymérase Pol δ , notamment dans la voie BIR, en atténuant les contraintes topologiques de l'ADN (Wilson et al., 2013). Cette stimulation serait médiée *in vitro* par PCNA, capable d'interagir à la fois avec Pif1 et la polymérase Pol δ (Buzovetsky et al., 2017). *A contrario*, dans les cellules méiotiques, l'activité de Pif1 serait inhibée *in vitro* afin de limiter la taille des évènements de CG (Vernekar et al., 2021). De manière intéressante, la sous-unité non-essentielle Pol32 de la polymérase Pol δ est également nécessaire à la synthèse dans cette même voie de la RH (Lydeard et al., 2007). Cela peut s'expliquer par le fait que la synthèse de longs fragments d'ADN requière une processivité plus importante de la polymérase Pol δ .

Chez les vertébrés, la polymérase Pol δ est également requise *in vitro* à la synthèse d'ADN lors d'évènements de recombinaison homologue (Sneeden et al., 2013). De plus, il a été observé que la sous-unité POLD3, orthologue humain de Pol32, est également requise *in vivo* à la synthèse de l'ADN dans la voie BIR (Costantino et al., 2014). Néanmoins, l'implication de la polymérase Pol δ dans la RH n'a été que peu étudiée. Par ailleurs, il a été suggéré que la synthèse réparatrice pourrait dépendre de la polymérase translésionnelle Pol η (Kawamoto et al., 2005; McIlwraith et al., 2005).

Malgré ces diverses études, le recrutement de ces polymérases et l'initiation de la synthèse à partir des intermédiaires de recombinaison ne sont encore que partiellement compris.

4. Résolution des intermédiaires de recombinaison

La résolution des intermédiaires de la RH est essentielle à la stabilité des génomes puisqu'elle permet notamment d'assurer une ségrégation correcte des chromosomes. Cette étape fait intervenir de nombreux acteurs telles que des nucléases, également qualifiées de résolvas, qui peuvent ou non générer des CO ainsi que des hélicases qui préviennent la formation de CO.

a) Les nucléases

La résolution des intermédiaires fait intervenir des protéines qualifiées d'endonucléases à structure spécifique (ou structure-selectives endonucleases, SSEs). Ces endonucléases reconnaissent et clivent spécifiquement différentes structures d'ADN. Chez la levure *S. cerevisiae*, l'étape de résolution est réalisée par les complexes Mus81-Mms4 et Slx1-Slx4, la résolvasse Yen1 ou encore le complexe Rad1-Rad10. Chez les mammifères, ces différents acteurs correspondent respectivement aux complexes MUS81-EME1/EME2 et SLX1-SLX4, à la protéine GEN1 et au complexe XPF-ERCC1 (Figure 17).

Les complexes Mus81-Mms4 et Slx1-Slx4 composent la première voie de résolution chez la levure *S. cerevisiae*. La mutation de chacun de ces gènes est synthétique létale avec la mutation *sgs1Δ* (Mullen et al., 2001). Le défaut de viabilité des souches *mus81Δ sgs1Δ* est supprimé par la délétion de *RAD51*, suggérant que ce phénotype est dû à l'accumulation d'intermédiaires de recombinaison toxiques (Fabre et al., 2002; Bastin-Shanower et al., 2003). De plus, Mus81 interagit avec Rad54, confortant son implication dans l'élimination des molécules jointes issues de la RH (Interthal & Heyer, 2000; Matulova et al., 2009). Le complexe Mus81-Mms4 se lie de préférence aux D-loop et aux jonctions de Holliday déjà clivées (Mazón & Symington, 2013; Mukherjee et al., 2014). Cela suggère que ce complexe intervient dans la résolution de structures qui n'ont pas encore subi de ligation. De manière intéressante, les défauts des souches *slx1Δ sgs1Δ* ne sont pas supprimés par la délétion des gènes de la RH. L'implication du complexe Slx1-Slx4 de levure dans la résolution des intermédiaires de RH n'est donc pas clairement établie bien que ce complexe reconnaisse les extrémités d'ADNs 5'. Son orthologue chez les mammifères SLX1-SLX4 clive les jonctions de Holliday (Fricke & Brill, 2003; Fekairi et al., 2009). Chez les vertébrés, les complexes MUS81-EME1/EME2 et SLX1-SLX4 s'associent pour former le complexe MUS-SLX. L'action coordonnée des activités nucléases de MUS81 et SLX1 permet d'éliminer plus efficacement les intermédiaires de recombinaison (Fekairi et al., 2009; Castor et al., 2013; Wyatt et al., 2013).

La seconde voie est représentée par la protéine de levure Yen1 et son orthologue chez les mammifères GEN1 qui appartiennent à la famille des nucléases Rad2/XPG (Ip et al., 2008; Rass et al., 2010). Les études menées sur la protéine GEN1 ont montré que la nucléase se lie spécifiquement aux jonctions de Holliday et réalise une double incision symétrique et coordonnée sur les deux brins opposés de la jonction. De plus, bien que GEN1 existe sous la forme d'un monomère, la dimérisation facilite le clivage (Rass et al., 2010; Y. W. Chan & West, 2015). La souche mutante *gen1Δ* présente des défauts de ségrégation chromosomique et de

viabilité proches des souches *mus81Δ* et *slx1Δ* (Wyatt et al., 2013). Ainsi, chez les mammifères, les jonctions de Holliday sont résolues par deux voies distinctes, la voie MUS-SLX et la voie GEN1. Chez la levure, la délétion de *YEN1* ne provoque pas de défaut de réparation après induction de dommages. En revanche, l'absence de Yen1 augmente la sensibilité des souches mutantes *mus81Δ* ou *mms4Δ* aux dommages de l'ADN tout en diminuant le production de CO (Blanco et al., 2010; Ho et al., 2010; Tay & Wu, 2010; Matos et al., 2011). Ces données suggèrent que Yen1 est capable de compenser la perte de Mus81-Mms4 dans la résolution des intermédiaires.

Les nucléases sont également requises à l'élimination de longues régions non-complémentaires (> 30 nt chez la levure, > 270 nt chez les mammifères) qui peuvent bloquer l'achèvement du processus de réparation. Ces régions empêchent la synthèse et/ou la ligation qui permettent de restaurer l'information génétique. Les régions hétérologues sont retrouvées soit au cours du processus de réparation par SSA, soit dans les voies de type CG (DSBR, SDSA, BIR). Le complexe Rad1-Rad10 (XPF-ERCC1 chez les métazoaires), acteur de la voie NER, intervient dans l'élimination de ces régions (Fishman-Lobell & Haber, 1992; Ivanov & Haber, 1995; Lyndaker & Alani, 2009). Le recrutement de Rad1-Rad10 au niveau des extrémités 3' à éliminer repose sur des interactions directes *in vivo* avec la protéine Saw1 et le complexe Msh2-Msh3 (Bertrand et al., 1998; F. Li et al., 2013; Eichmiller et al., 2018). Le complexe Msh2-Msh3, impliqué dans la réparation des mésappariements, reconnaît spécifiquement les jonctions entre ADNdb et ADNs b et les stabilise (Sugawara et al., 1997; E. Evans et al., 2000; Surtees & Alani, 2006). Saw1 se lie également aux structures d'ADN branchées (F. Li et al., 2008). Ainsi, Msh2-Msh3 et Saw1 recrutent Rad1-Rad10 au niveau de la jonction et facilite le clivage des régions hétérologues par le complexe (Sugawara et al., 1997; F. Li et al., 2013; Diamante et al., 2014; Eichmiller et al., 2018). L'élimination des extrémités non complémentaires par Rad1-Rad10 serait stimulée par la protéine Slx4 phosphorylée, bien que son rôle soit encore méconnu (W.-L. Toh et al., 2010).

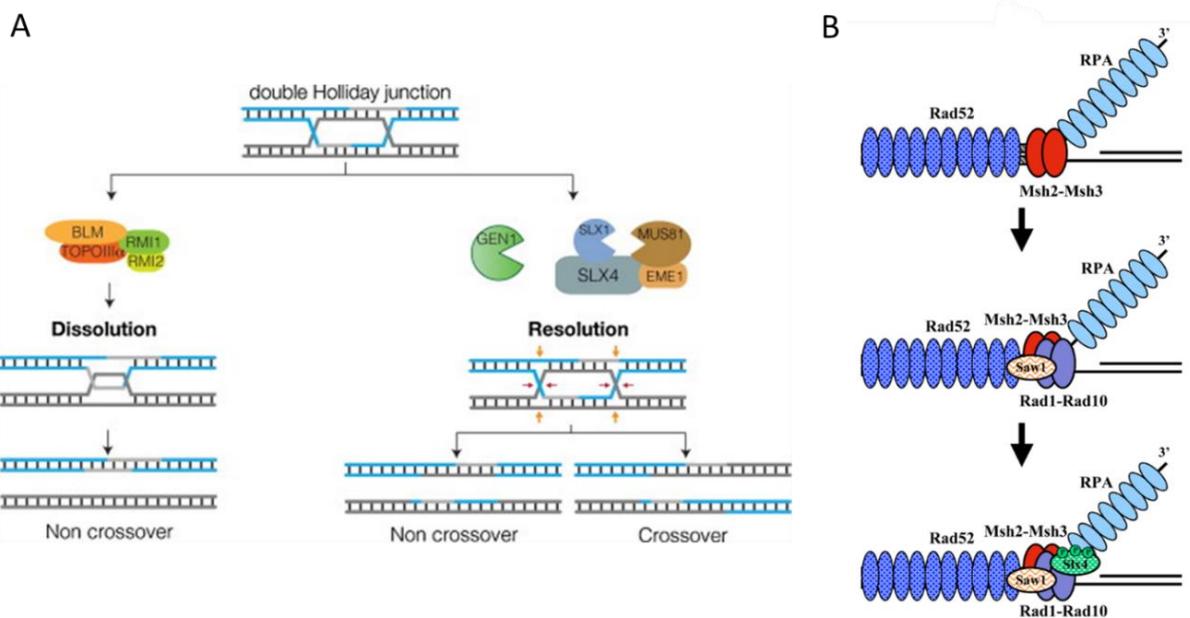


Figure 17. Modèles d'élimination des intermédiaires de RH

- (A) Résolution ou Dissolution des jonctions de Holliday chez les mammifères (Matos & West, 2014)
 Le complexe BTR désassemble les dJH au travers d'un mécanisme appelé « dissolution » qui ne génère pas de CO. Le complexe MUS-SLX élimine les jonctions de Holliday par un clivage endonucléolytique qui produit des CO ou des événements de CG (NCO). GEN1 constitue une voie parallèle de résolution des jonctions de Holliday.
- (B) Elimination des régions hétérologues (Lyndaker & Alani, 2009)
 Le complexe Msh2-Msh3 se fixe à la jonction ADNdb-ADNsb et la stabilise pour faciliter le clivage. Saw1 s'associe au complexe Rad1-Rad10 afin d'induire son recrutement à la jonction. Slx4 phosphorylée se lie à Rad1-Rad10 et favorise le clivage de l'extrémité 3' sortante.

b) L'hélicase Sgs1

Sgs1 (pour Slow Growth Suppressor 1) joue de multiples rôles dans le processus de RH, de la résection extensive des extrémités d'ADN 5' (voir section B.1) à la dissolution des structures intermédiaires de la RH (figure 17). De ce fait, la délétion de Sgs1 dans les cellules provoque une augmentation du taux de recombinaison spontanée, une sensibilité au MMS et une augmentation des échanges entre chromatides sœurs (Gangloff et al., 1994; Watt et al., 1996; Onoda et al., 2000).

La mutation *sgs1*Δ supprime les défauts de croissance et d'instabilité génomique du mutant *top3*Δ (Gangloff et al., 1994). Il a alors été proposé que Sgs1, hélicase de polarité 3'-5' de la famille des hélicases RecQ, agit en association avec la topoisomérase de type 1A, Top3, et son cofacteur, Rmi1. Ces protéines forment ainsi le complexe Sgs1-Top3-Rmi1 (ou STR) capable d'éliminer les structures intermédiaires contenant une ou deux jonctions de Holliday ou encore les D-loops (Gangloff et al., 1994; Watt et al., 1995; Bennett et al., 2000; Chang et

al., 2005; Liberi et al., 2005; Mullen et al., 2005). En effet, le complexe STR présente une affinité pour des structures d'ADN cruciformes, plus spécifiquement pour les jonctions de Holliday. Le complexe STR prend en charge les dJH au travers du mécanisme de dissolution. L'activité hélicase de Sgs1 entraîne la migration des deux branches de la dJH l'une vers l'autre afin de produire une structure hémicaténée. Cette structure est ensuite éliminée grâce à l'activité catalytique de Top3, stimulée par son cofacteur Rmi1 (Cejka, Plank, et al., 2010). Cette dissolution conduit exclusivement à la production de produits de CG (Ira et al., 2003; S. D. Oh et al., 2007; Cejka, Plank, et al., 2010). D'autre part, l'activité topoisomérase de Top3 permet également de dissocier les D-loops, prévenant encore une fois la production de CO (Fasching et al., 2015). Cela est conforté par le fait que la délétion de *SGS1* induit une augmentation des produits de CO dans les cellules somatiques (Ira et al., 2003; Robert et al., 2006). Ainsi, la dissolution des structures intermédiaires semble être le mécanisme privilégié afin d'éviter les CO et de maintenir l'hétérozygotie dans les cellules végétatives.

Il existe de nombreuses hélicases de type RecQ chez les mammifères. L'homologue fonctionnel de Sgs1 est l'hélicase BLM dont les mutations sont responsables du syndrome de Bloom, une maladie génétique rare (Ellis et al., 1995; Watt et al., 1996; Bernstein et al., 2010). A l'image de Sgs1, BLM s'associe au complexe TOPOIIIa-RMI1-RMI2 (complexe BTRR). De nombreuses études ont démontré que le complexe BTR a conservé la fonction de dissolution des dJH (Figure 17) (Karow et al., 2000; L. Wu & Hickson, 2003; Plank et al., 2006; Mankouri & Hickson, 2007; Bizard & Hickson, 2014).

c) L'hélicase Mph1

MPHI (pour Mutator Phenotype 1) code pour une hélicase de polarité 3'-5', membre de la famille des super-hélicases SF2 et ayant pour homologue l'hélicase humaine FANCM. La mutation *mph1Δ* provoque une fréquence élevée de mutations spontanées ainsi qu'une sensibilité des cellules aux agents génotoxiques tel que le MMS (Scheller et al., 2000; Schürer et al., 2004). De plus, la mutation *mph1Δ* est épistatique aux mutations des gènes du groupe d'épistasie RAD52 requis pour la RH. Ces données ont permis de mettre en évidence le rôle de Mph1 dans la réparation des dommages par RH. L'activité hélicase de Mph1 repose sur l'hydrolyse de l'ATP (Prakash et al., 2005). Cela lui permet de dissocier *in vitro* des molécules d'ADN jointes telles que les D-loops pour favoriser la voie SDSA (Prakash et al., 2009). En effet, l'ablation du gène codant pour Mph1 provoque une augmentation de la fréquence des CO, sans pour autant impacter la cinétique de réparation d'une CDB induite par l'endonucléase HO

(Prakash et al., 2009). Mph1 est également capable de transloquer sur l'ADN, ce qui lui permet d'éliminer également les jonctions de Holliday *in vitro* par migration des branches (Zheng et al., 2011). Récemment, un outil a été développé afin de détecter physiquement la formation de D-loop *in vivo*, le D-loop Capture Assay (DLC assay). Cela a notamment permis de mettre en évidence une collaboration entre Mph1 et le complexe STR dans la résolution des D-loops (Piazza et al., 2019). En revanche, cette étude a montré que le complexe Mph1-STR ne prend pas en charge les mêmes structures que l'hélicase Srs2, qui élimine également les D-loops sans produire de CO.

d) L'hélicase « anti-recombinase » Srs2

Srs2 (pour Suppressor of Rad6 Sensitivity) est une hélicase de polarité 3'-5' appartenant à la superfamille I des hélicases SF1 (Rong & Klein, 1993) et partageant une homologie avec les hélicases bactériennes Rep, UvrD et PcrA (Aboussekhra et al., 1989). Les premières études génétiques menées chez la levure *S. cerevisiae* ont révélé l'implication de Srs2 dans les voies post-réplcatives de tolérance aux dommages (ou voies DDT). En effet, le mutant *srs2Δ* est un suppresseur partiel de la radiosensibilité des mutants *rad6Δ* et *rad18Δ* dans lesquels la majorité des voies DDT sont inhibées (Lawrence & Christensen, 1979; Aboussekhra et al., 1989; Schiestl et al., 1990; Friedl et al., 2001). L'absence de Srs2 est également associée à un phénomène d'hyper-recombinaison (Aguilera & Klein, 1988; Rong & Klein, 1993). Ces données suggèrent que l'absence de Srs2 dans les cellules mutantes *rad6Δ* ou *rad18Δ* facilite la prise en charge des lésions bloquant la réplication par la RH (Papouli et al., 2005; Pfander et al., 2005). Ces premières études ont permis de proposer un rôle anti-recombinogène pour Srs2.

A l'image des hélicases de la famille UvrD, Srs2 possède un domaine N-terminal conservé qui contient un motif Walker A, essentiel aux activités ATPase et hélicase de la protéine. En effet, l'ouverture de la molécule d'ADN par Srs2 dépend de l'hydrolyse de l'ATP, stimulée par la présence d'ADNsb (Rong & Klein, 1993; Komen et al., 2003; Krejci et al., 2004). Srs2 est également composée d'une région C-terminale spécifique qui contient des domaines d'interaction avec diverses protéines. Srs2 peut s'associer à PCNA sumoylé et à Rad51, ce qui lui permet d'être recrutée aux fourches de réplication et d'inhiber *in vitro* les réactions catalysées par la recombinase (Krejci et al., 2003; Papouli et al., 2005; Pfander et al., 2005; Armstrong et al., 2012; Jenkins et al., 2019). Srs2 est également capable de se lier à d'autres protéines sumoylées telle que Rad52 au travers du motif conservé SIM (pour SUMO

interaction motif) (Kolesar et al., 2016). Cela suggère que les fonctions de Srs2 ne dépendent pas exclusivement de son interaction avec PCNA (Le Breton et al., 2008; Kolesar et al., 2016).

La fonction anti-recombinogène de Srs2 assure une régulation négative de la RH essentielle à la survie cellulaire. La délétion du gène *SRS2* sensibilise fortement les cellules aux UV et cette sensibilité est supprimée par l'ablation du gène *RAD51*, qui n'est lui-même pas sensible aux UV (Aboussekhra et al., 1992). De plus, la sensibilité au MMS de cellules diploïdes *srs2Δ/srs2Δ* est également partiellement supprimée par plusieurs allèles semi-dominants de *RAD51* dont la réparation des dommages par RH est affectée (Chanet et al., 1996). Enfin, la délétion de *SRS2* est synthétique létale avec la délétion de gènes impliqués dans la recombinaison et/ou la réplication tels que *RAD54* ou *MRC1*. Une fois encore, cette létalité est supprimée par la délétion des gènes *RAD51*, *RAD52*, *RAD55* ou *RAD57*, tous impliqués dans l'assemblage des filaments (Palladino & Klein, 1992; Klein, 2001; H. Xu et al., 2004). Ces données suggèrent que l'activité de Srs2 est cruciale pour éliminer des structures toxiques associées à la recombinaison. La nature de ces intermédiaires de recombinaison toxiques pourrait varier en fonction du contexte. D'une part, ces intermédiaires pourraient correspondre à des nucléofilaments Rad51 stériles et non éliminés, qui conduiraient au blocage de la réplication ou bien à l'impossibilité d'orienter les dommages vers une autre voie de réparation. D'autre part, ces structures pourraient être des molécules jointes formées après envahissement d'un duplex d'ADN homologue et nécessitant Srs2 pour leur résolution. Plusieurs données supportent l'hypothèse des filaments Rad51 toxiques. Dans un mutant *rad54Δ*, la recombinaison est bloquée avant l'étape d'invasion de brin catalysée par Rad51. Le démantèlement des nucléofilaments Rad51 par Srs2 deviendrait alors primordial pour permettre une prise en charge des lésions par une autre voie de réparation. Dans un contexte *mrc1Δ srs2Δ*, l'accrochage des filaments Rad51 bloquerait la réplication de l'ADNsb et par conséquent la progression des fourches. En accord avec cette hypothèse, il a été montré *in vitro* que les nucléofilaments Rad51 inhiberaient le recrutement de PCNA et la synthèse d'ADN médiée par la polymérase Polδ (Vasianovich et al., 2017). L'allèle mutant *rad52-L264P*, isolé au laboratoire, est également capable de supprimer certains défauts de la souche mutante *srs2Δ* telles que la sensibilité aux agents génotoxiques ainsi que la létalité synthétique avec des gènes impliqués dans la recombinaison ou la réplication (Esta et al., 2013). Étonnamment, l'allèle mutant *rad52-L264P* n'est associé à aucun défaut de RH *in vivo* et *in vitro*. Cette suppression résulte en réalité d'une modification de l'activité médiatrice de Rad52 lui permettant de

contourner l'activité de désassemblage de Srs2. Ainsi, cela préviendrait la formation de filaments Rad51 non fonctionnels et par conséquent, toxiques.

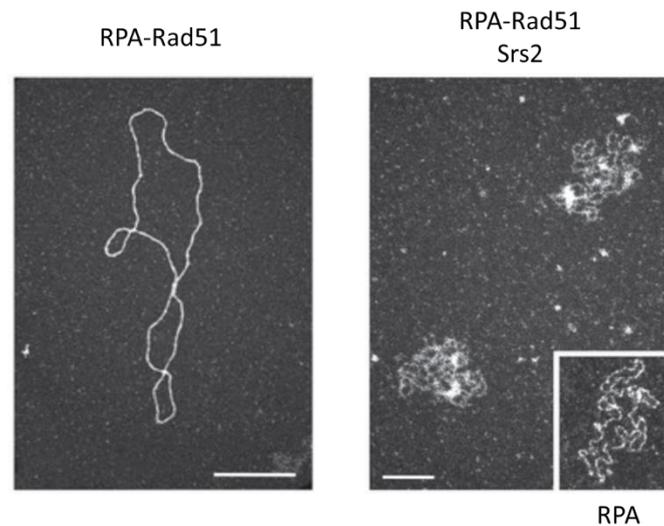


Figure 18. Le désassemblage des filaments Rad51 est catalysé par l'hélicase anti-recombinase Srs2 (E. Ma et al., 2018)

Visualisation *in vitro* par microscopie électronique de la formation du filament Rad51 sur de l'ADNsb viral circulaire ϕ 174 d'une longueur de 5 kb en présence de RPA (à gauche). L'ajout de l'hélicase Srs2 favorise le désassemblage du filament Rad51 (à droite).

Des études biochimiques ont montré que Srs2 catalyse le désassemblage des filaments Rad51 de l'ADNsb *in vitro* et cette dissociation a été visualisée par microscopie électronique (figure 18) (Krejci et al., 2003; Veaute et al., 2003; E. Ma et al., 2018). Ce mécanisme de démantèlement est conservé au sein du vivant comme le prouve le désassemblage efficace *in vitro* des filaments RecA par l'hélicase bactérienne UvrD (Veaute et al., 2005). De manière étonnante, la fonction anti-recombinase de Srs2 ne dépend pas de son activité hélicase. En revanche, Srs2 possède une activité translocase dépendante de l'hydrolyse de l'ATP qui lui confère la capacité de se déplacer sur l'ADNsb avec une polarité 3'-5' (Antony et al., 2009; Qiu et al., 2013; De Tullio et al., 2017). En addition de cette activité translocase, une interaction directe entre la région C-terminale de Srs2 et Rad51 permet une élimination optimale des filaments (Jenkins et al., 2019). Srs2 peut alors stimuler l'hydrolyse de l'ATP par la recombinase et réciproquement. Tout cela fragilise les filaments et les rend plus sensibles au démantèlement avec un taux de dissociation de 50 monomères de Rad51 par seconde *in vitro* (Antony et al., 2009; Kaniecki et al., 2017). En accord avec les données précédentes, un défaut d'interaction entre Rad51 et Srs2 ou bien un défaut de déplacement de Srs2 sur l'ADNsb atténuent le désassemblage des filaments *in vitro* (Antony et al., 2009; Colavito et al., 2009;

Seong et al., 2009). Récemment, l'implication de cette interaction dans le désassemblage des filaments Rad51 a été fortement remise en question. Srs2 possède un motif de type FxxA qui, s'il est muté, provoque une perte totale d'interaction avec Rad51. Or, cette mutation n'affecte ni la viabilité, ni la sensibilité des cellules à des agents génotoxiques (Bronstein et al., 2018; Jenkins et al., 2019). Cela complique la compréhension du mécanisme de démantèlement des filaments Rad51 par Srs2. Quoiqu'il en soit, une fois les filaments Rad51 décrochés de l'ADNsb, RPA se positionne à nouveau sur l'ADNsb et prévient ainsi le réassemblage des filaments Rad51. Srs2 joue donc le rôle de régulateur négatif dans la formation des filaments Rad51, évitant ainsi des événements de recombinaison inappropriés (Chanet et al., 1996; Burgess et al., 2009; Esta et al., 2013). Le désassemblage des filaments Rad51 par Srs2 permettrait d'éliminer les intermédiaires de recombinaison bloqués afin de finaliser la réparation des dommages (Vaze et al., 2002).

Cependant, la fonction d'élimination des filaments Rad51 par Srs2 ne permet pas d'expliquer tous les phénotypes observés pour le mutant *srs2Δ*. Les cellules diploïdes *srs2Δ/srs2Δ* montrent une sensibilité aux UV et aux radiations ionisantes bien plus importante que les cellules haploïdes *srs2Δ* (Aboussekhra et al., 1989). De plus, la perte de l'activité hélicase de Srs2 conduit à un important défaut de viabilité des cellules diploïdes associé à une accumulation de molécules jointes issues de la RH (Keyamura et al., 2016). Enfin, la délétion de *SRS2* est synthétique létale avec l'ablation de *SGS1* et cette létalité est supprimée par la délétion de *RAD51* (Gangloff et al., 2000; Fabre et al., 2002). Ces phénotypes suggèrent que Srs2 n'est pas limitée à l'élimination des filaments Rad51. Elle prendrait également en charge la résolution de structures intermédiaires de recombinaison, vraisemblablement au travers de son activité hélicase. En accord avec un rôle de Srs2 dans les étapes tardives de la RH, la délétion de *SRS2* est létale dans un système de réparation par RH ectopique d'une CDB induite, bien que la cinétique de réparation soit proche de la souche sauvage (Ira et al., 2003). Étonnamment, dans ce système, la délétion de Srs2 induit chez les survivants une baisse des événements de CG. Cela suggère que Srs2 favorise la réparation des dommages par CG, probablement au travers de la voie SDSA (Ira et al., 2003; Robert et al., 2006; Miura et al., 2013). De plus, Srs2 est capable de défaire une large gamme de substrats d'ADN issus soit de la réplication, soit de la réparation (Marini & Krejci, 2012). Ainsi, l'activité hélicase de Srs2 mène à la dissociation de structures semblables à des D-loops en favorisant la CG sans CO (Dupaigne et al., 2008; J. Liu et al., 2017; Piazza et al., 2019). Srs2 favorise donc la réparation des CDB par la voie SDSA, évitant ainsi toute perte d'hétérozygotie dans les cellules

somatiques. Il est à noter que cette fonction dépend de la phosphorylation de Srs2 *in vivo* qui n'est toutefois pas nécessaire au désassemblage des filaments Rad51 (Saponaro et al., 2010).

Chez les mammifères, aucun orthologue de Srs2 n'a été clairement identifié. Cependant, diverses hélicases sont considérées comme de potentiels homologues de Srs2, capables d'agir sur les divers intermédiaires de recombinaison. Dans la famille des hélicases UvrD, l'hélicase FBH1 humaine est capable de compenser certains défauts du mutant *srs2Δ* (Chiolo et al., 2007). De plus, chez les vertébrés, FBH1 défait *in vitro* les nucléofilaments RAD51 (Kohzaki et al., 2007; Fugger et al., 2009; Simandlova et al., 2013). Plus récemment, dans cette même famille d'hélicase UvrD, la protéine PARI a été proposée comme homologue fonctionnel de Srs2, bien qu'elle ne possède pas d'activité hélicase. Néanmoins, à l'image de Srs2, PARI interagit avec la forme sumoylée de PCNA et avec RAD51, ce qui lui permet de supprimer *in vitro* des événements de recombinaison (Moldovan et al., 2012; Burkovics et al., 2016). La fonction de cette protéine n'est pas encore complètement caractérisée. En dehors de la famille UvrD, RTEL1 favorise l'élimination de structures intermédiaires telles que les D-loops (Barber et al., 2008) tandis que les hélicases BLM, RecQL5 ou encore FANCD1 désassemblent les filaments RAD51, inhibant ainsi l'échange de brin (Bugreev et al., 2007; Hu et al., 2007; Sommers et al., 2009; Xue et al., 2021). La protéine FIGL1 interagit avec RAD51 au travers d'un motif FxxA, ce qui lui permet de stimuler l'hydrolyse de l'ATP par la recombinase et *in fine* son déplacement de l'ADNsb (Yuan & Chen, 2013; Matsuzaki et al., 2019). Cependant, cette activité de dissociation de FIGL1 ne dépend pas de sa propre activité ATPase. Enfin, la protéine RADX, présentée dans la section suivante, qui n'est pourtant pas une hélicase, exerce également un contrôle négatif sur la formation des filaments RAD51. Les interactions et les rôles précis de chacun de ces acteurs ne sont pas encore clairement définis. Néanmoins, la conservation des différentes fonctions de Srs2 au cours de l'évolution démontre l'importance d'une régulation négative de la RH pour garantir le maintien de la stabilité génomique.

e) La protéine RADX

La protéine RADX a été récemment caractérisée chez les mammifères comme une protéine régulatrice de la formation des filaments RAD51. Identifiée lors d'un criblage de gènes requis en réponse à un stress répliatif (Dungrawala et al., 2015), le gène *CXorf57* code pour la protéine RADX (pour RPA-related protein, RAD51-antagonist on X-chromosome). Cette protéine présente une similitude de séquence avec la protéine RPA et plus particulièrement avec sa plus grande sous-unité. RADX est ainsi capable de lier l'ADNsb au travers de sa région N-

terminale (Schubert et al., 2017). L'ablation du gène codant pour la protéine RADX entraîne une accumulation de foyers RAD51 au niveau des fourches de réplication après traitement induisant un stress répliatif. Cela suggère que RADX est un régulateur négatif dans la formation des filaments RAD51, capable de bloquer leur formation au travers d'une compétition pour l'ADNsb (Dungrawala et al., 2017; Bhat et al., 2018; Krishnamoorthy et al., 2021). De récentes études *in vitro* sur molécule unique ont mis en évidence que RADX agit sur la condensation de l'ADNsb, y compris lorsque ce dernier est recouvert en excès par la protéine RPA. Cette condensation est nécessaire à l'inhibition de la formation des filaments RAD51 au niveau des fourches de réplication (H. Zhang et al., 2020). D'autre part, des expériences ont révélé que cette inhibition implique une stimulation de l'activité ATPase de RAD51 par RADX (Adolph et al., 2021, 2023). Cette fonction dépend notamment d'une interaction directe *in vitro* entre RADX et la recombinaise RAD51 associée à l'ATP, suggérant que l'addition du cofacteur engendre un changement de conformation du filament RAD51 favorisant l'interaction avec RADX. La déstabilisation des filaments RAD51 par RADX peut être contrecarrée par la présence de BRCA2. Il a notamment été proposé que les motifs BRC de la protéine BRCA2 sont en compétition avec RADX pour l'interaction avec RAD51, supposant un site de fixation commun au niveau de la recombinaise.

III. Les paralogues de Rad51 dans la régulation de la formation des filaments Rad51

Les nucléofilaments Rad51 jouent un rôle crucial dans le mécanisme de RH et, par extension, dans le maintien de la stabilité génomique en assurant une réparation des dommages de grande fidélité. Cependant, le nucléofilament Rad51 est une épée à double tranchant qui peut aussi mettre en péril cette stabilité en provoquant des réarrangements inappropriés ou encore des pertes d'hétérozygotie. De plus, une dérégulation de la RH est responsable du phénomène de toxicité, délétère à la survie des cellules. Cette dichotomie vis-à-vis des filaments Rad51 sous-entend que leur formation nécessite d'être finement régulée au travers d'une balance entre régulateurs positifs et négatifs afin d'éviter une quelconque toxicité ou encore un défaut de recombinaison. Bien que leurs fonctions soient encore mal définies, de nombreuses évidences ont permis de placer les complexes de paralogues de Rad51 dans la catégorie des régulateurs positifs des filaments Rad51.

A. Les paralogues de Rad51 protègent les filaments Rad51 face à l'activité déstabilisatrice de l'hélicase Srs2

La formation des nucléofilaments Rad51 est assurée par les régulateurs positifs que sont BRCA2 chez les mammifères, Rad52 chez la levure et les complexes de paralogues de Rad51 dans l'ensemble des eucaryotes. Une fois formés, les nucléofilaments Rad51 requièrent d'être protégés de l'activité de démantèlement catalysée par diverses hélicases. En effet, en agissant à des temps précoces au cours du processus de recombinaison, les hélicases pourraient empêcher l'assemblage des nucléofilaments Rad51 et *in fine* inhiber les échanges de brins nécessaires à la réparation des dommages par la RH.

Chez la levure *S. cerevisiae*, bien que les rôles des complexes de paralogues de Rad51 soient encore mal compris, il a été suggéré que ces paralogues pourraient protéger les filaments contre l'activité déstabilisatrice de l'hélicase anti-recombinase Srs2. En accord avec cette hypothèse, des analyses génétiques ont montré que la sensibilité au MMS et aux radiations ionisantes des mutants *rad55Δ* ou *rad57Δ* est supprimée partiellement par la délétion de *SRS2* (Fung et al., 2009; J. Liu et al., 2011). Des analyses *in vitro* de GST pulldown réalisées à partir des protéines purifiées ont mis en évidence une interaction entre le complexe Rad55-Rad57 et Srs2 (J. Liu et al., 2011). Il a alors été proposé que Rad55-Rad57, en restant associé aux filaments qu'il a aidé à installer, pourrait jouer un rôle de barrière vis-à-vis de Srs2. Cela empêcherait alors l'accrochage de l'anti-recombinase au filament Rad51, bloquant ainsi la stimulation de l'activité ATPase de la recombinaison et par conséquent son désassemblage (figure 19A). Une autre hypothèse possible suggère que cette stabilisation résulterait soit d'une rigidification, soit d'un changement de conformation des filaments Rad51 médiés par l'accrochage des complexes de paralogues de Rad51 à leur extrémité 5'. Cette modulation de la flexibilité des filaments Rad51 les rendraient alors plus résistants face à l'activité négative de Srs2. Cette rigidification a également été proposée pour le complexe de paralogues de RAD51 retrouvé chez *C. elegans*, RFS-1/RIP-1 (Taylor et al., 2015). Des études menées plus récemment au sein du laboratoire de E. Greene tendent à proposer que ce blocage ne serait pas dû à une interaction physique directe entre le complexe Rad55-Rad57 et l'anti-recombinase Srs2 (Roy et al., 2021). En effet, les expériences réalisées sur molécule unique proposent que le complexe Rad55-Rad57 contrecarre l'effet négatif de Srs2 en assurant un réassemblage rapide du filament après le passage de l'anti-recombinase. D'autre part, à l'inverse de ce qu'a pu proposer l'équipe de WD Heyer (J. Liu et al., 2011), cette récente étude démontre que le complexe Rad55-Rad57 ne fait pas partie intégrante du filament Rad51. En effet, Rad55-Rad57

n'interagit ni avec le complexe RPA-ADNsb, ni avec les filaments Rad51 matures (Roy et al., 2021). Ainsi, Rad55-Rad57 s'associerait de façon transitoire au filament Rad51, facilitant la polymérisation des filaments après nucléation des premiers monomères de Rad51 mais également le réassemblage des filaments après le passage de Srs2. Ce rôle de chaperonne a également été proposé pour le complexe RFS-1/RIP-1 de *C. elegans* (Belan et al., 2021). L'ensemble de ces données permettent de proposer plusieurs hypothèses quant au mécanisme de protection du filament Rad51 par le complexe Rad55-Rad57 : (i) La fixation du complexe Rad55-Rad57 à une extrémité du filament Rad51 formerait une barrière physique infranchissable pour Srs2 ; (ii) L'interaction directe entre les paralogs de Rad51 et le filament conduirait à une modification de la conformation des filaments Rad51 les rendant plus résistants ; (iii) L'interaction transitoire entre le complexe Rad55-Rad57 et la recombinaise Rad51 favoriserait un renouvellement des monomères de Rad51 sur l'ADNsb après démantèlement par Srs2. Le mécanisme de protection nécessite d'être clarifié par des études plus approfondies. Néanmoins, cela démontre bien que la formation des filaments dépend d'une balance entre l'action des régulateurs positifs et négatifs. Cette balance favorise la réparation des dommages de l'ADN par recombinaison tout en prévenant la formation de structures toxiques et/ou des réarrangements chromosomiques délétères pour la cellule. Les données obtenues plus récemment au laboratoire dans la réparation de brèches simple-brin laissées en arrière des fourches de réplication démontrent également cette fonction de protection des filaments Rad51 par le complexe Rad55-Rad57 envers l'anti-recombinaise Srs2 (Maloisel et al., 2023).

L'action négative de Srs2 sur les filaments Rad51 semble également être contrebalancée par le complexe SHU. Des expériences de double-hybride de levure ont montré une interaction *in vitro* entre Srs2 et la sous-unité Shu2 du complexe SHU (T. Ito et al., 2001). Chez la levure *S. pombe*, une interaction semblable a été détectée entre les protéines Srs2 et Sws1, une protéine homologue à Shu2 (Martín et al., 2006). Pour rappel, l'association du complexe SHU avec le filament Rad51 est médiée par Rad55-Rad57 (S. Godin et al., 2013). Il est donc possible que cette interaction entre Srs2 et le complexe SHU puisse servir de barrière physique pour bloquer le démantèlement des filaments Rad51. Des analyses de microscopie à fluorescence ont amené à proposer que Shu1, protéine paralogue de Rad51, régulerait négativement le recrutement de Srs2 aux sites de dommages. En effet, dans les cellules mutants *shu1Δ*, le nombre de foyers Srs2 augmente et ces foyers sont localisés plus fréquemment au niveau de la CDB induite

(Bernstein et al., 2011). Cette fonction de protection du complexe SHU nécessite d'être plus amplement étudiée.

Par la suite, il a été constaté que l'activité anti-recombinase de l'hélicase Srs2 est également contrebalancée par la protéine médiatrice Rad52. Les études menées au laboratoire ont permis, pour la première fois, d'isoler par mutagenèse aléatoire des mutants du gène *RAD52* capables de supprimer la sensibilité au MMS du mutant *srs2Δ* sans affecter le processus de recombinaison (Esta et al., 2013). De manière surprenante, ces expériences ont révélé par la suite que l'interaction directe entre Rad52 et Rad51 n'est pas nécessaire à la formation des filaments *in vivo* (E. Ma et al., 2018). En effet, la mutation Rad52-Y376A, localisée dans le domaine YEKF requis pour l'interaction avec Rad51, induit une sensibilité modérée des cellules aux radiations ionisantes en comparaison des cellules *rad52Δ* ainsi qu'un léger défaut de réparation par RH d'une CDB induite. En revanche, cette interaction participe à la stabilisation des filaments Rad51 et antagonise l'activité déstabilisatrice de Srs2. Ainsi, dans le mutant *rad52-Y376A*, la baisse de recrutement de Rad51 mesurée par ChIP à une CDB induite dépend de la régulation négative de Srs2. Ce résultat a été confirmé notamment par des images de microscopie électronique qui montrent que, en présence de la protéine mutante Rad52-Y376A, les filaments Rad51 sont fragilisés et donc moins protégés contre Srs2 (figure 19B) (E. Ma et al., 2018). Plus récemment, il a également été montré au laboratoire que la région N-terminale de Rad52, pourtant pas impliquée dans l'interaction avec Rad51, participe elle aussi à la stabilisation et à la protection des filaments face à Srs2 (E. Ma et al., 2021).

Ainsi, les régulateurs positifs que sont Rad52 et les complexes de paralogues de Rad51 antagonisent l'action de démantèlement des filaments de Rad51 catalysée par Srs2. Cependant, l'absence de connaissances structurales est un frein à une meilleure compréhension du mécanisme et de la fonction de chacun des complexes de paralogues de Rad51 dans la protection des filaments. D'autre part, aucune évidence ne permet à ce jour de montrer une quelconque collaboration des complexes de paralogues de Rad51 avec Rad52 dans cette fonction précise.

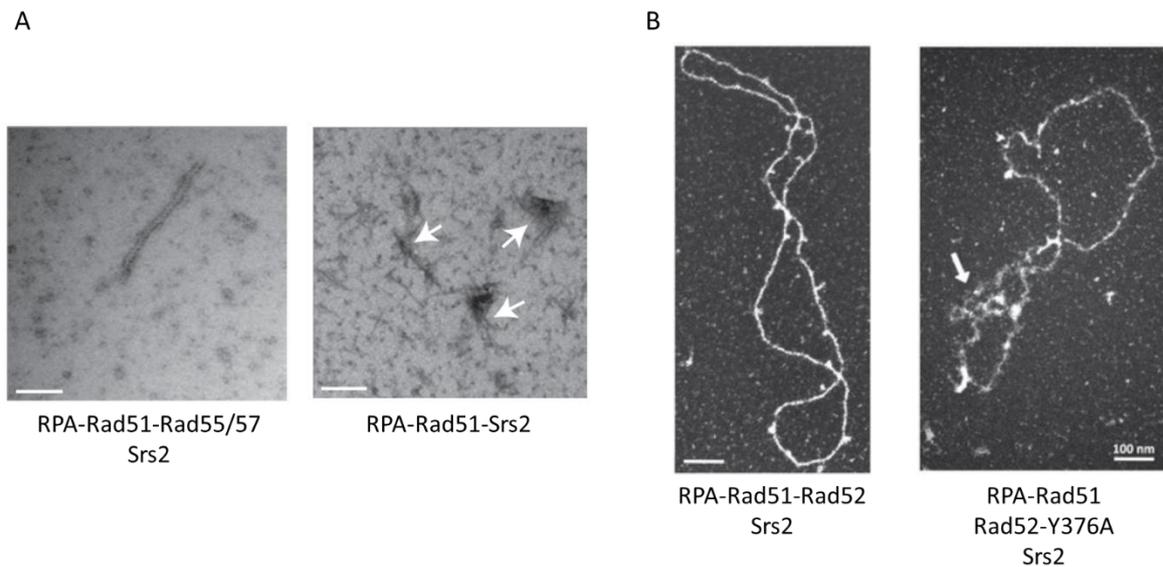


Figure 19. L'activité déstabilisatrice de Srs2 est inhibée par l'association des régulateurs positifs avec le filament Rad51

- (A) Visualisation *in vitro* par microscopie électronique de la formation du filament Rad51 sur de l'ADNsb d'une longueur de 600 nt en présence de RPA, de Rad55-Rad57 et de Srs2 (à gauche). En absence de Rad55-Rad57, les filaments sont déstabilisés et désassemblés par Srs2 (à droite). Les flèches désignent des complexes d'ADNsb-RPA.
- (B) Visualisation *in vitro* par microscopie électronique de la formation du filament Rad51 sur de l'ADNsb viral circulaire ϕ 174 d'une longueur de 5 kb en présence de RPA, de Rad52 et de Srs2 (à gauche). Le défaut d'interaction entre Rad51 et le mutant *rad52-Y376A* fragilise les filaments face à Srs2 (à droite).

Chez les mammifères, peu d'études ont été menées dans le but de déterminer si les paralogues de RAD51 ont conservé ce rôle d'antagoniste face à l'activité déstabilisatrice des anti-recombinases identifiées. Des analyses réalisées récemment sur le complexe SHU humain suggèrent que SWSAP1, protéine paralogue de RAD51, serait capable de réguler négativement et spécifiquement l'activité de l'anti-recombinase FIGNL1 dans le désassemblage des filaments RAD51 (Matsuzaki et al., 2019). Dans les cellules *swsap1Δ*, le défaut de formation des foyers RAD51 induits par des dommages à l'ADN est supprimé par la délétion de *FIGNL1* et non par la délétion des hélicases BLM, PARI ou RTEL1. Cette régulation repose sur une interaction directe entre les deux protéines, médiée par une région de SWSAP1 qui diffère du domaine FxxA responsable de l'interaction avec RAD51 (Yuan & Chen, 2013; Matsuzaki et al., 2019). Ainsi, il est possible qu'en s'associant à la fois à FIGNL1 et à RAD51, SWSAP1 bloquerait l'interaction entre les deux autres protéines, inhibant alors la dissociation des filaments RAD51 de l'ADNsb par FIGNL1 (Matsuzaki et al., 2019). A ce jour, la fonction de protection des filaments RAD51 a été décrite uniquement pour la protéine SWSAP1.

B. Les paralogues de Rad51 sont impliqués dans la prise en charge des brèches simple-brin post-réplcatives

Les paralogues de Rad51 sont considérés comme des acteurs accessoires dans la réparation des CDB du fait de leur sensibilité modérée aux radiations ionisantes qui peut être supprimée par la délétion de *SRS2*. Ainsi, la fonction principale du complexe Rad55-Rad57 dans la réparation des CDB serait de stabiliser les filaments Rad51. De manière surprenante, la délétion de *RAD55* ou de *RAD57* sensibilisent fortement les cellules aux agents alkylants tel que le MMS et affectent la recombinaison spontanée entre séquences répétées entre chromatides sœurs (Mozlin et al., 2008; Fung et al., 2009). D'autre part, bien que les cellules mutantes *rad55Δ* et *rad57Δ* ne soient pas sensibles aux rayons UV, la RH induite par cette exposition est fortement diminuée dans ce contexte génétique (Maloisel et al., 2023). Étonnamment, tous ces défauts persistent dans les cellules déficientes pour *SRS2*, suggérant que le complexe Rad55-Rad57 puisse agir indépendamment de la protection contre Srs2. Il a alors été suggéré que les dommages générés par le MMS, les UV ou encore ceux à l'origine de la recombinaison spontanée entre séquences répétées ne soient pas des CDB mais des brèches simple-brin (Lundin et al., 2005; Lettier et al., 2006; Fung et al., 2009). Ainsi, les paralogues de Rad51 joueraient un rôle plus important dans la réparation de ces brèches plutôt que dans celle des CDB.

Dans un contexte réplcatif, la présence de lésions à l'ADN entrave la progression des polymérases réplcatives et peut ainsi provoquer l'arrêt des fourches de réplcation. Pour assurer la synthèse complète du génome, il est crucial que ces dommages soient « ignorés » grâce à l'action des voies de DDT, présentées dans la section A.5 (Branzei & Psakhye, 2016). Ces voies offrent la possibilité de contourner les dommages durant la phase S en assurant un réamorçage de la synthèse de l'ADN en aval de la lésion. Des fragments d'ADNsb s'accumulent alors en arrière de la fourche de réplcation. La présence de ces brèches simple-brin, qualifiées de « post-réplcatives », a pu être mise en évidence après traitement des cellules aux UV par microscopie électronique et par électrophorèse bidimensionnelle (Lopes et al., 2006). Plus récemment, le marquage de la grande sous-unité de RPA a rendu possible la visualisation par microscopie à fluorescence de ces brèches simple-brin induites par les UV (R. P. Wong et al., 2020). Les voies de DDT, divisées en deux catégories fidèle et infidèle, reconnaissent les mêmes substrats, suggérant des fonctions redondantes pour chacune de ces voies. (Lopes et al., 2006; W. Ma et al., 2013). Il est à noter que les polymérases translésionnelles ont également des substrats spécifiques qui ne peuvent être pris en charge par

la RH. Quoiqu'il en soit, la délétion combinée des gènes de la RH et de ceux codant pour les polymérases translésionnelles augmente de manière synergique la sensibilité des cellules aux agents génotoxiques en comparaison aux simples mutants (McDonald et al., 1997; Rattray et al., 2002; Ball et al., 2009; X. Xu et al., 2013; Tellier-Lebegue et al., 2017). Les données du laboratoire récemment publiées ont confirmé cette redondance entre les voies de DDT. En effet, lorsque les deux voies sont mutées, les foyers RPA induits par les UV s'accumulent dans les cellules qui semblent alors bloquées en G2, synonyme d'un défaut de traitement des brèches (Maloisel et al., 2023). Malgré ces fonctions redondantes, ces deux voies ne tolèrent pas les lésions de la même manière, suggérant qu'elles puissent entrer en compétition pour la prise en charge des brèches simple-brin. Le choix de la voie de DDT pour la prise en charge des brèches simple-brin post-répliquatives reste à être clairement défini.

Le complexe Rad55-Rad57 participe à la balance entre les voies de DDT et favorise la réparation des brèches simple-brin par RH. Les diverses expériences menées jusqu'à présent ont mis en évidence trois fonctions distinctes et essentielles pour Rad55-Rad57. Premièrement, ce complexe intervient dans l'installation et la stabilisation de filaments Rad51 fonctionnels sur des fragments d'ADNsb. En effet, dans les mutants *rad55Δ* et *rad57Δ*, les fréquences de recombinaison spontanée et induite par les UV sont fortement diminuées, presque abolies (Mozlin et al., 2008; Fung et al., 2009; Maloisel et al., 2023) et la résolution des foyers RPA accumulés est retardée (Maloisel et al., 2023). De façon inattendue, la délétion de *SRS2* ne supprime pas les défauts précédemment mentionnés des mutants *rad55Δ* et *rad57Δ*. Cela suggère que l'activité du complexe Rad55-Rad57 dans la réparation des brèches par RH n'est pas restreinte à la protection des filaments Rad51 face à Srs2. Par ailleurs, la forte sensibilité des cellules diploïdes *srs2Δ/srs2Δ* aux rayons UV dépend entièrement de l'activité de Rad55-Rad57 (Aboussekhra et al., 1989; Maloisel et al., 2023). De plus, la mutation *srs2Δ* est associée à un phénotype d'hyper-recombinaison après exposition aux UV, supprimé par la délétion de *RAD55* ou *RAD57*. Ainsi, en absence de Srs2, la stabilisation des filaments Rad51 par les paralogues de Rad51 conduirait à la formation de structures de recombinaison toxiques pour les cellules comme cela a déjà été proposé auparavant (Fabre et al., 2002). La nature de ces événements est encore méconnue. Deuxièmement, l'implication de Rad55-Rad57 dans la formation des filaments Rad51 permet de contrecarrer la voie de STL en régulant notamment la mutagenèse dépendante de l'activité de la sous-unité catalytique Rev3 de la polymérase Polζ (Lemontt, 1971; Quah et al., 1980). En effet, les cellules déficientes pour *RAD55* ou *RAD57* présentent un important phénotype mutateur, spontané ou induit par les UV, qui disparaît avec

la délétion de *REV3* (Rattray et al., 2002; X. Xu et al., 2013; Maloysel et al., 2023). Inversement, la délétion de *REV3* est associée à une augmentation de la recombinaison. Il est intéressant de noter que la sensibilité des cellules mutantes *rev3Δ* aux rayons UV révèle que la recombinaison ne compense pas entièrement la réparation des lésions prises en charge par ces polymérases (Maloysel et al., 2023). Cela suggère qu'il existe une spécificité de lésions exclusivement prises en charge par la voie de STL. Quoiqu'il en soit, le complexe Rad55-Rad57 facilite la formation des filaments Rad51 au niveau des brèches simple-brin induites par les UV, empêchant alors le recrutement des polymérases translésionnelles et, par extension, inhibant la voie de STL. La manière dont les filaments Rad51 bloquent l'accès des polymérases translésionnelles à l'ADNsb reste méconnue. Enfin, de manière intéressante, bien que les cellules mutantes *rad55Δ rev3Δ* soient extrêmement sensibles aux rayons UV, des événements de recombinaison sont à nouveau détectés dans ce contexte génétique. Ces événements restent toutefois moins nombreux que dans la souche sauvage. De plus, la sensibilité des cellules mutantes *rad55Δ rev3Δ* est partiellement supprimée par la délétion de *SRS2* (Maloysel et al., 2023). Cela suggère qu'en absence du complexe Rad55-Rad57, les filaments Rad51 sont capables de se former afin de catalyser l'échange de brin. Cependant, l'absence de Rad55-Rad57 facilite le recrutement de Rev3 qui est alors capable d'inhiber la formation des filaments Rad51. De plus, ces filaments ne sont pas stabilisés ni protégés contre Srs2. Ils sont par conséquent incapables d'inhiber le recrutement des polymérases translésionnelles ou encore incapables de procéder à l'invasion de brin. Ainsi, le complexe Rad55-Rad57 protège également les filaments Rad51 face à l'activité de désassemblage de Srs2 dans un contexte de stress répliatif. Une fois encore, le mécanisme de protection nécessite d'autres études afin d'être mieux appréhendé.

Dans les cellules végétatives, à la différence du complexe Rad55-Rad57, très peu d'évidence ont permis de démontrer à ce jour l'implication du complexe SHU dans la réparation des CDB. En revanche, les cellules déficientes pour le complexe SHU présentent une sensibilité modérée au MMS ainsi qu'à d'autres agents induisant un blocage de la réplication comme la camptothécine et le cisplatine (H. I. Wu et al., 2004; Shor et al., 2005; S. K. Godin et al., 2016). Ce phénotype suggère que l'activité du complexe SHU soit plus spécifique à la réparation par RH des brèches simple-brin post-répliatives. Cette hypothèse est étayée par le fait que le complexe SHU se fixerait préférentiellement *in vitro* à des substrats d'ADN semblables à des fourches de réplication endommagées par une large gamme de lésions alkylantes, allant de l'ADN méthylé à des sites abasiques (S. Godin et al., 2013; S. K. Godin et al., 2016; Rosenbaum et al., 2019; Bonilla et al., 2021). Pour conforter l'implication spécifique du complexe SHU

dans la tolérance aux dommages de l'ADN, des analyses de cytométrie en flux ont permis de détecter un retard de progression dans la phase S des cellules mutantes *shuΔ* en réponse à un traitement au MMS, comparable au retard observé dans les cellules mutantes *rad51Δ* (Mankouri et al., 2007; Ball et al., 2009). Ce défaut est supporté par le retard de reconstitution des chromosomes observé par électrophorèse sur gel bidimensionnel dans les cellules déficientes pour le complexe SHU exposées au MMS (S. K. Godin et al., 2016). Il a également été montré que le complexe SHU favoriserait la RH pour la prise en charge des brèches simple-brin accumulées derrière les fourches de réplication en inhibant la voie de STL (Ball et al., 2009; X. Xu et al., 2013). En effet, la délétion du complexe SHU est également associée à une importante augmentation de la mutagenèse spontanée qui dépend de l'activité de Rev3 (Huang et al., 2003; Shor et al., 2005; Ball et al., 2009; X. Xu et al., 2013). Par ailleurs, la délétion du complexe SHU supprime partiellement l'accumulation de molécules jointes entre chromatides sœurs observées dans les cellules déficientes pour Sgs1 après exposition au MMS (Mankouri et al., 2007). Cela suggère encore une fois que le complexe SHU intervient dans des étapes précoces du processus de RH. En dépit de toutes les expériences déjà menées sur le complexe SHU, le mécanisme par lequel ce complexe favorise la RH dans un contexte de stress répliatif demeure relativement énigmatique, du fait des phénotypes peu marqués des mutants du complexe SHU.

En résumé, les diverses études menées chez la levure ont conduit à proposer un rôle plus important des complexes de paralogues de Rad51 dans la réparation de brèches simple-brin laissées en arrière des fourches de réplication. D'une part, les paralogues de Rad51 favoriseraient la formation et la stabilisation des filaments Rad51 au niveau des brèches simple-brin. D'autre part, ils préviendraient le recrutement des polymérases translésionnelles, inhibant ainsi la voie de STL et la mutagenèse à laquelle elle est associée. Le recrutement des protéines paralogues de Rad51 et leur fonction dans la réparation de ces brèches par RH restent cependant à être déterminés. Par exemple, il serait intéressant de savoir si les protéines paralogues de Rad51 sont capables de s'associer avec d'autres protéines requises spécialement à la résolution des différents types de lésions pouvant enclencher le processus de tolérance aux dommages à l'ADN. Par ailleurs, il est à noter que, dans un contexte de stress répliatif, le complexe Rad55-Rad57 est une fois encore épistatique sur le complexe SHU (S. Godin et al., 2013; X. Xu et al., 2013). Cela suggère que l'activité du complexe SHU dans la RH dépend de son interaction avec le complexe Rad55-Rad57.

Chez les eucaryotes supérieurs, certains paralogues de RAD51 favorisent également la réparation par RH des lésions retrouvées en amont des fourches de réplication. Les mutations du complexe SHU humain, SWS1-SWSAP1-SPIDR, sensibilisent les cellules à des agents alkylants de l'ADN, tels que le MMS ou la mitomycine C, ce qui conduit à un retard et à une diminution des foyers RAD51 en réponse aux dommages ainsi qu'à une baisse d'échange entre chromatides sœurs (Martín et al., 2006; T. Liu et al., 2011; Martino et al., 2019). Ces données suggèrent que les fonctions du complexe SHU sont conservées de la levure à l'Homme. Par conséquent, il a été proposé que le complexe SHU humain, SWS1-SWSAP1-SPIDR, serait spécifique à la tolérance aux lésions alkylantes impactant la réplication de l'ADN (S. Godin et al., 2013; S. K. Godin et al., 2016; Rosenbaum et al., 2019; Bonilla et al., 2021). Par ailleurs, une récente étude a mis en évidence l'implication de la protéine RAD51C dans la tolérance aux dommages à l'ADN (Mohan et al., 2019). RAD51C interagit avec la protéine ALKBH3 requise pour la déméthylation d'adduits tels que le N1-méthyladénine (1meA) et le N3-méthylcytosine (3meC) formés sur l'ADNsb généralement après traitement au MMS. Cette association favorise *in vivo* un enrichissement local de ALKBH3 recrutée spécifiquement par RAD51C au niveau de la lésion. Toutefois, il reste à déterminer si, dans ce contexte de stress répliatif, la protéine RAD51C agit au travers du complexe BCDX2 ou bien du complexe CX3. L'étude de variants de *RAD51* déficients dans leur activité catalytique ont permis de mettre en évidence, dans les cellules de mammifères, la compétition entre la RH et la STL dans la tolérance aux dommages à l'ADN (Lambert & Lopez, 2002). En revanche, l'implication des paralogues de RAD51 dans cette compétition n'a pas encore été clairement établie.

C. Les paralogues de Rad51 humains et cancers

Le mécanisme de RH est l'un des systèmes les plus fidèles de réparation des dommages de l'ADN, ce qui en fait l'un des garants de la stabilité génomique. Il apparait alors évident que l'altération des gènes intervenant au cours du processus de recombinaison peut avoir de lourdes conséquences dans le maintien de cette stabilité. Des mutations des gènes de la RH ont été retrouvées dans le processus de cancérogénèse ainsi que dans plusieurs maladies génétiques prédisposant les individus à certains types de cancers (C.-C. Chen et al., 2018). De ce fait, les régulateurs positifs des filaments RAD51 sont considérés comme des gènes suppresseurs de tumeurs. Les mutations impactant les fonctions de ces gènes sont diverses. Elles peuvent aller du changement d'un unique acide aminé à la méthylation du promoteur conduisant à

l'inactivation du gène. Elles peuvent également prendre la forme de délétions, insertions, translocations provoquant un décalage du cadre de lecture.

Les gènes *BRCA1* et *BRCA2* sont les gènes suppresseurs de tumeurs les plus connus de la RH dont des mutations mono-alléliques confèrent des risques élevés notamment de cancers du sein, de l'ovaire ou encore de la prostate (Mavaddat et al., 2013; Prakash et al., 2015). Par ailleurs, des mutations touchant les deux copies de ces mêmes gènes sont responsables du syndrome d'anémie de Fanconi, une maladie génétique rare caractérisée notamment par une prédisposition élevée à développer certains cancers et des tumeurs solides (Moldovan & D'Andrea, 2009; Nalepa & Clapp, 2018). Les mutations des gènes *BRCA1* et *BRCA2* sont, par conséquent, systématiquement évaluées dans tous les types de cancers. *BRCA1* joue un rôle critique dans le contrôle de la résection de l'ADN tandis que *BRCA2* est la protéine médiatrice majeure des filaments RAD51. De ce fait, l'inactivation ou les mutations des gènes *BRCA1* et *BRCA2* engendrent une altération du mécanisme de recombinaison, notamment en impactant fortement la formation des filaments RAD51 sur l'ADNsb. En absence des filaments RAD51, la réparation des dommages serait plus probablement orientée vers des voies de réparation alternatives mais mutagènes et donc responsables de la prolifération incontrôlée des cellules cancéreuses telles que les voies NHEJ, SSA ou encore STL.

Du fait de leurs multiples rôles vis-à-vis des nucléofilaments RAD51 et dans le bon fonctionnement de la RH en réponse aux dommages de l'ADN, les gènes codant pour les protéines paralogueues de RAD51 sont des acteurs importants dans le maintien de l'intégrité génomique. Par conséquent, les gènes codant pour les protéines paralogueues de RAD51 ont été ajoutés à la classe des gènes suppresseurs de tumeurs. Diverses études ont mis en évidence que des variants hétérozygotes des gènes codant pour les protéines paralogueues canoniques de RAD51 sont associés notamment au développement des cancers du sein ou de l'ovaire (Meindl et al., 2010; Silva et al., 2010; H. Song et al., 2015; Golmard et al., 2017; Boni et al., 2022). Par exemple, des mutations du gène *RAD51C* sont responsables d'environ 3% des cancers de l'ovaire contre 5% pour les mutants du gène *RAD51D* (Pennington et al., 2014). De plus, des mutations associées au syndrome d'anémie de Fanconi (FANCO et FANCU) ont été identifiées comme des mutations hypomorphiques à l'état homozygote des gènes codant pour *RAD51C* et *XRCC2* (Vaz et al., 2010; Shamseldin et al., 2012; Nalepa & Clapp, 2018). A ce jour, aucune étude n'a permis d'identifier de mutants de *SWSAP1* dans le développement de cancers ou de maladies associées à une prédisposition aux cancers. Toutefois, des mutations de sa protéine

partenaire dans le complexe SHU, SWS1, ont été identifiées chez des patients atteints de cancers colorectaux (Spier et al., 2016).

La caractérisation des protéines paralogues de RAD51 s'est révélée complexe. Cette difficulté est notamment due à la létalité embryonnaire précoce des cellules murines déficientes pour les paralogues de RAD51, à la faible abondance cellulaire et au défaut de solubilité des protéines. Ce manque de connaissance a donc rendu difficile l'évaluation des risques de cancers des différents mutants de paralogues de RAD51 identifiés cliniquement. La majorité de ces variants sont par conséquent qualifiés de variants de signification inconnue (ou variants of uncertain significance, VUS). Le développement de nouveaux outils a permis de progresser dans la compréhension des différentes fonctions des protéines de paralogues de RAD51 et par conséquent de mieux appréhender l'impact des mutations dans les cancers. Des analyses réalisées sur des mutations faux-sens localisées à proximité ou au niveau du motif Walker A de RAD51D ont montré un défaut d'interaction avec son partenaire XRCC2 ainsi qu'une diminution de l'efficacité de réparation d'une CDB par recombinaison (Baldock et al., 2019). Par la suite, une cinquantaine de VUS du gène *RAD51C* retrouvés dans différents types de cancers et prédits comme déficients en recombinaison *in silico* ont été étudiés (Prakash et al., 2022). Seulement la moitié de ces variants se sont révélés non viables et défectueux en recombinaison, révélant la limite des algorithmes de prédictions. Par ailleurs, cette étude a également mis en évidence que la conservation des résidus de RAD51 dans les paralogues est importante pour la prédiction des fonctions des variants de paralogues de RAD51 dans les cancers. En effet, la mutation des résidus conservés corrèle avec les défauts de recombinaison observés pour chacun de ces différents variants de RAD51C. Un cluster de mutations a notamment été détecté dans la région la plus conservée qui correspond au motif Walker A de RAD51C. D'une part, les résidus mutés autour de ce motif conduisent à un défaut de formation des complexes BCDX2 et CX3, probablement stabilisés par la fixation de l'ATP entre deux monomères adjacents. D'autre part, les variants retrouvés au sein du motif induisent des défauts de fixation à l'ADN et d'hydrolyse de l'ATP ainsi qu'une diminution des foyers RAD51 et une sensibilité à différents agents thérapeutiques (Prakash et al., 2022). Plus récemment, il a été observé que des variants de RAD51C correspondant à des résidus conservés de RAD51 localisés en dehors du domaine catalytique, impactaient fortement la recombinaison. Les différentes expériences ont permis de montrer que ce phénotype résultait d'une absence de liaison de RAD51C à l'ADN, inhibant ainsi la formation des filaments RAD51 sur l'ADNsb (Rawal et al., 2023).

Ces premières études suggèrent, qu'à l'image des variants des gènes *BRCA1* et *BRCA2*, certaines mutations des gènes de paralogues de RAD51 altèrent le mécanisme de recombinaison. Dans ce contexte, la survie et la prolifération des cellules cancéreuses dépendraient uniquement des voies alternatives mutagènes. Ainsi, les patients atteints de cancers associés à des mutations des paralogues de RAD51 pourraient bénéficier de traitements semblables aux chimiothérapies ciblées déjà utilisées pour traiter les patients déficients pour les gènes *BRCA1* ou *BRCA2*. Ces traitements exploitent ces défauts de recombinaison et reposent sur le concept de létalité synthétique en inactivant spécifiquement les voies de réparation alternatives, sans nuire aux cellules saines (O'Connor, 2015; Stover et al., 2016). Les cellules déficientes pour *BRCA1* ou *BRCA2* sont particulièrement sensibles aux inhibiteurs de l'enzyme poly-ADP-ribose-polymérase (PARP) (Bryant et al., 2005; Fong et al., 2009). Ces inhibiteurs provoquent le blocage de l'enzyme PARP1, impliquée dans la voie Alt-EJ, sur l'ADNsb ce qui engendrent une accumulation importante de lésions toxiques, menant à terme au phénomène d'apoptose. Ainsi, ces thérapies permettent de cibler spécifiquement les cellules déficientes pour la RH et ne présentent qu'une toxicité négligeable pour les cellules ou tissus normaux.

Il arrive malheureusement que les cellules acquièrent une résistance aux traitements par inhibiteurs de PARP, les rendant alors totalement inefficaces (Noordermeer & van Attikum, 2019). Il a été suggéré que cette résistance puisse dépendre d'une restauration de fonctions des gènes auparavant déficients en recombinaison. Ce phénomène est dû à l'apparition de mutations secondaires, également appelée réversion. Récemment, des chercheurs sont parvenus à développer une molécule capable d'inhiber l'interaction entre BRCA2 et RAD51 (Scott et al., 2021). Cette molécule agit en synergie avec les inhibiteurs de PARP, ce qui rend les cellules cancéreuses de nouveau sensibles aux chimiothérapies. Il est également apparu que des mutations dans les gènes des paralogues de RAD51 seraient également potentiellement responsables de la résistance des cellules cancéreuses aux différents agents thérapeutiques (Kondrashova et al., 2017). Il est possible d'imaginer que le ciblage des protéines paralogues de RAD51 pourrait servir à rendre de nouveau sensibles les cellules devenues résistantes aux traitements par inhibiteurs de PARP.

Ces différentes données soulignent l'importance de progresser dans la caractérisation des structures et des fonctions des complexes de paralogues de RAD51 et de déterminer leur mode d'interaction avec les filaments RAD51 dans l'optique de concevoir de nouvelles stratégies thérapeutiques anti-cancéreuses. Néanmoins, un grand nombre de variants de paralogues demeurent des VUS et il est fort probable que tous les variants de paralogues de

RAD51 n'aient pas encore été tous identifiés. Par conséquent, des analyses moléculaires précises des différents variants des gènes paralogues de RAD51 sont nécessaires pour garantir une réponse optimale aux stratégies thérapeutiques anti-cancéreuses.

Projet

Chez la levure *S. cerevisiae*, les protéines paralogues de Rad51 ont longtemps été considérées comme des protéines accessoires. En effet, il a été démontré que des cellules n'exprimant pas Rad55, Rad57 ou des protéines du complexe SHU sont beaucoup moins sensibles aux dommages de l'ADN que celles n'exprimant pas Rad51 ou Rad52 (Symington et al., 2014). Rad55-Rad57 est à la fois impliqué dans la réparation des CDB et dans le mécanisme de tolérance aux dommages de l'ADN (DDT en anglais). SHU semble n'être impliqué que dans le mécanisme de DDT (X. Xu et al., 2013). Quoiqu'il en soit, le rôle majeur des complexes Rad55-Rad57 et SHU serait de protéger les filaments Rad51 notamment contre l'action déstabilisatrice de l'hélicase anti-recombinase Srs2 (J. Liu et al., 2011; Bernstein et al., 2011). Cependant, il a été montré au laboratoire que Rad55-Rad57 possède également plusieurs rôles indépendants de Srs2 (Maloisel et al., 2023).

L'absence d'une connaissance précise de la structure des complexes de paralogues de Rad51 en association avec le filament Rad51 rend difficile l'étude de leurs différents rôles. Il n'existe aucune structure cristallographique du complexe Rad55-Rad57 à ce jour. Cependant, une structure du complexe Rad55-Rad57 en association avec la recombinaise Rad51 a été générée *in silico* à l'aide du logiciel Alphafold2 (Humphreys et al., 2021). Ce modèle est en accord avec les interactions précédemment observées *in vivo* et *in vitro* (Hays et al., 1995; Johnson & Symington, 1995; Sung, 1997b; J. Liu et al., 2011). Toutefois, ce modèle *in silico* n'est associé à aucune étude fonctionnelle. La structure du complexe SHU est résolue (S. Zhang et al., 2017) et une interaction directe entre les deux complexes de paralogues de Rad51 a été identifiée (Gaines et al., 2015). Aucune interaction directe entre SHU et la recombinaise Rad51 n'a été décrite pour le moment. L'ensemble de ces résultats suggère que les protéines paralogues à Rad51 peuvent exister au sein d'un même complexe en relation avec le filament Rad51. Cette conclusion peut remettre en cause l'implication du complexe SHU uniquement dans la voie de DDT. D'ailleurs, il n'a jamais été formellement démontré que ce complexe ne participe pas à la réparation des CDB. Il est également possible que les paralogues de Rad51 forment des complexes alternatifs en fonction des lésions qui induisent la RH. Concernant les mammifères, des modèles structuraux des complexes de paralogues de RAD51, BCDX2 et CX3, ont été publiés au cours de ma thèse (Greenhough et al., 2023; Rawal et al., 2023; Longo et al., 2023). Ces modèles ont permis d'initier des analyses fonctionnelles et de constater notamment les effets de mutants de perte d'interaction. Cependant, la relation entre les complexes de paralogues de RAD51 et le complexe SHU demeure méconnue. De plus, aucune étude fonctionnelle n'a été réalisée entre les complexes de paralogues et la recombinaise RAD51.

Mon projet de thèse a consisté à déterminer la structure des complexes des paralogues de Rad51 en association avec le filament Rad51. La stratégie utilisée repose sur la conception de modèles structuraux réalisés sur la base de la structure de la protéine Rad51, déjà définie. L'assemblage de ces modèles nous a permis de proposer des sites d'interaction qui ont été testés en associant mutagenèses dirigées et tests de double-hybride. La genèse de mutations conduisant à altérer spécifiquement certaines parties des complexes en jeu dans la formation et/ou la stabilité des filaments Rad51 nous a permis également d'initier l'analyse du ou des rôle(s) des paralogues de Rad51 dans la réparation soit des CDB, soit des brèches simple-brin.

Les résultats obtenus au travers de nos différentes expériences nous ont permis de dégager plusieurs concepts. Tout d'abord, nous avons montré que l'intégrité du complexe Rad55-Rad57 est requise pour l'ensemble de ses fonctions. D'autre part, à la différence du complexe Rad55-Rad57, nous n'avons observé aucune évidence concernant un rôle potentiel du complexe SHU dans la réparation des CDB. Cependant, nous avons confirmé l'implication du complexe SHU dans les mécanismes de DDT, bien que les phénotypes des mutants du complexe SHU soient partiels en comparaison aux phénotypes du mutant *rad55Δ*. Enfin, nous avons pu mettre en évidence l'implication de l'interaction entre le complexe Rad55-Rad57 et la recombinase Rad51 dans la protection du filament face à l'activité déstabilisatrice de l'hélicase anti-recombinase Srs2. De plus, nous avons démontré que le complexe Rad55-Rad57 collabore avec la protéine médiatrice Rad52 dans cette fonction de protection des filaments Rad51.

Résultats

I. Modèle structural des complexes de paralogues de Rad51 en association avec Rad51 (Établi par Raphaël Guérois)

La structure du complexe SHU a déjà été décrite (S. Zhang et al., 2017) tandis qu'une structure du complexe Rad55-Rad57 prédite par AlphaFold a récemment été publiée (Humphreys et al., 2021). De plus, une interaction entre Rad55-Rad57 et Rad51 a été modélisée dans cette même publication, ainsi que l'interaction entre CX3 et RAD51. Cependant, aucun de ces modèles n'est supporté par des analyses fonctionnelles. Par ailleurs, une interaction entre la sous-unité Csm2 du complexe SHU et Rad55 a été décrite (S. Godin et al., 2013). Pour mieux comprendre le rôle des paralogues de Rad51 dans l'installation du filament Rad51 chez la levure, nous avons généré à l'aide du logiciel AlphaFold2 un modèle des paralogues de Rad51 en interaction avec Rad51 (**Figure R1**). Pour cela, les séquences des protéines d'intérêt ont été extraites de la base de données Uniprot (The UniProt Consortium, 2021). Ces séquences ont été utilisées comme entrée du programme de recherche d'homologie mmseqs2 (Steinegger & Söding, 2017) pour générer un alignement de séquences multiples (ASM) par rapport à la base de données UniRef30. Un soin particulier a été apporté à la sélection des orthologues à partir d'un ASM des protéines. De ce fait, les homologues des protéines d'entrée partageant moins de 35 % d'identité de séquence avec leur requête respective ont été écartés. Les homologues dont la couverture de la région alignée de leur requête est inférieure à 50 % ont également été écartés. Dans chaque ASM, si plusieurs homologues appartiennent à la même espèce, seul celui qui partage la plus grande identité de séquence avec la requête a été conservé. Les séquences complètes des orthologues ont été récupérées et réalignées avec le programme mafft (Katoh & Standley, 2013). Pour modéliser la structure des différents complexes, les ASM correspondants ont été concaténés. Dans les ASM concaténés, lorsque les homologues des différentes sous-unités appartiennent à la même espèce, ils ont été alignés de manière appariée, sinon ils ont été laissés non appariés. Les ASM concaténés ont été utilisés comme entrée pour générer 5 modèles structuraux pour chacun des différents complexes en utilisant une version locale de l'interface ColabFold v1.5.2 (Mirdita et al., 2022), exécutant 3 itérations de l'algorithme Alphafold2 v2.3.1 (Jumper et al., 2021) entraîné sur l'ensemble de données de multimères (R. Evans et al., 2021). Les cinq meilleurs modèles de chaque complexe ont convergé vers des conformations très similaires et ont obtenu de bons scores de confiance et de qualité avec des pTMscores et des ipTMscores supérieurs à 0,7. Les graphiques et analyses moléculaires ont été réalisés avec le programme de visualisation moléculaire UCSF ChimeraX (Pettersen et al., 2021).

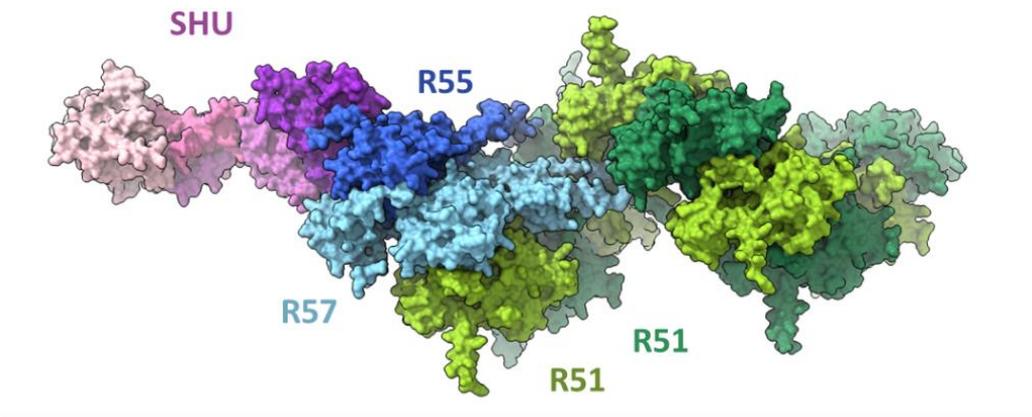


Figure R1. Modèle structural de l'association des complexes de paralogues de Rad51, SHU et Rad55-Rad57, à l'extrémité 5' des filaments Rad51.

Le modèle présenté en figure R1 montre un alignement des paralogues de Rad51 en interaction avec l'extrémité 5' du filament Rad51. Dans ce modèle, le complexe SHU interagit avec la sous-unité Rad55 du complexe Rad55-Rad57, tandis que la sous-unité Rad57 de ce même complexe interagit avec Rad51. La région N-terminale non conservée de Rad51 sort du filament et n'est pas impliquée dans l'interaction avec Rad57. La superposition de l'hétérodimère Rad55-Rad57 avec un dimère de Rad51 montre que l'interaction entre Rad55 et Rad57 se fait au travers des régions conservées et montre également des boucles internes qui ne sont pas impliquées dans la formation du complexe Rad55-Rad57 (**Figure R2**). Nous avons désormais un outil puissant pour aller définir des résidus impliqués dans les différentes interactions et comprendre leur(s) fonction(s) dans la RH.

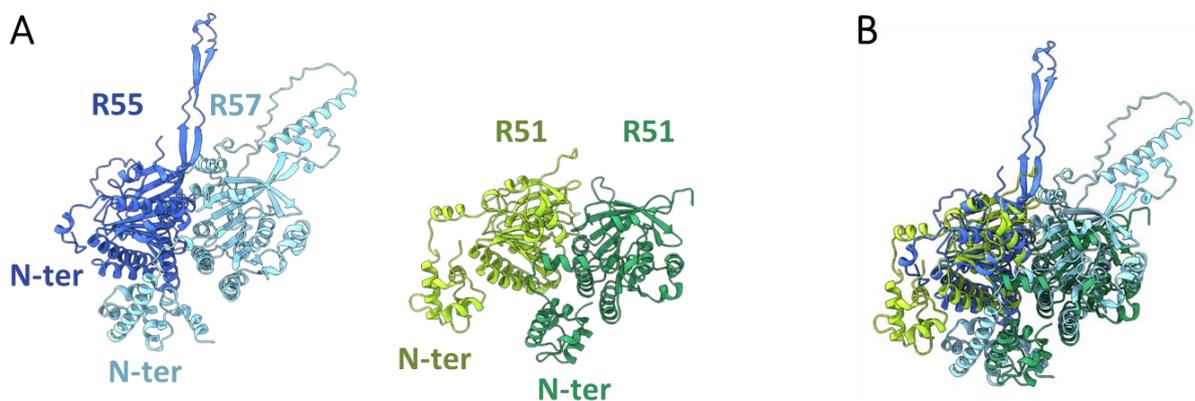


Figure R2. Comparaison du complexe Rad55-Rad57 avec un dimère de Rad51.

(A) Modèle structural du complexe Rad55-Rad57 (à gauche) et d'un dimère de Rad51 (à droite).
 (B) Superposition des deux modèles structuraux précédents. Les régions internes spécifiques de Rad55-Rad57 sortent des structures globulaires.

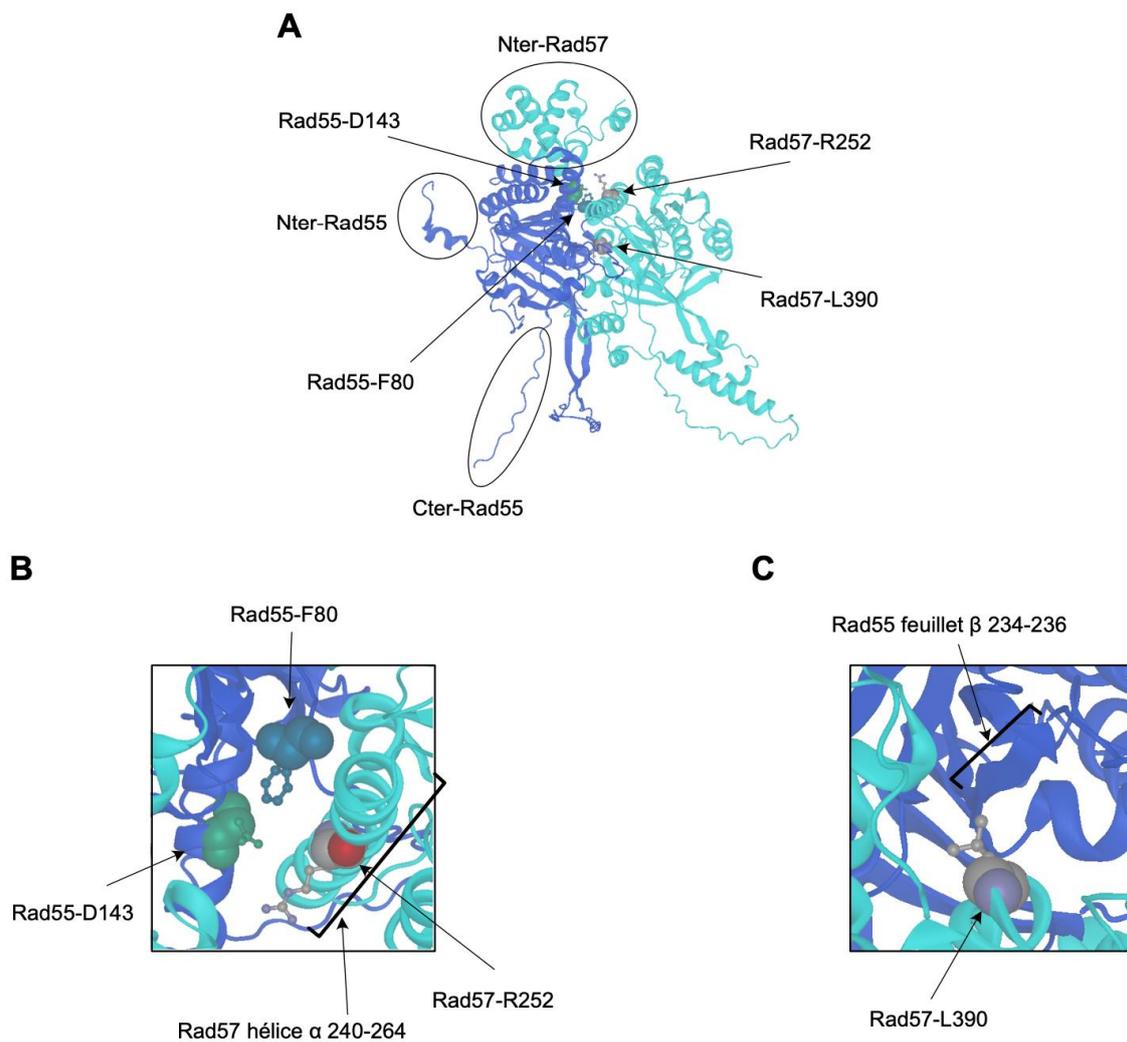
II. La formation du complexe Rad55-Rad57 est essentielle pour la stabilisation des filaments nucléoprotéiques Rad51 et leur protection contre l'anti-recombinase Srs2

1) Validation de l'interface entre Rad55 et Rad57 par la technique du double-hybride

Le modèle généré à l'aide d'AlphaFold2 peut être testé *in vivo* à l'aide de la technique du double-hybride. Cette technique permet d'observer de manière indirecte des interactions protéine-protéine (Chien et al., 1991). Le système double-hybride sur lequel est basé notre étude, utilise la souche de levure CTY10-5d et les plasmides pBTM116 et pACT2 (voir Matériels et Méthodes). Une activité de la β -galactosidase est détectée dans les co-transformants et dans les deux sens : pBTM116-Rad55 + pACT2-Rad57 ou pBTM116-Rad57 + pACT2-Rad55 (**Figure R4**). Lorsqu'un plasmide vide est utilisé lors de la co-transformation (par exemple, pBTM116 + pACT2-Rad57), aucune activité n'est détectée, indiquant ainsi que cette activité est bien le résultat de l'interaction entre Rad55 et Rad57. Notre test double-hybride peut donc être utilisé pour étudier l'impact de mutations définies d'après le modèle du complexe Rad55-Rad57 généré à l'aide d'AlphaFold2. Le modèle montre une large surface d'interaction entre Rad55 et Rad57. Rad57 englobe Rad55 d'une part, *via* le cœur conservé de la protéine et d'autre part, au travers de son domaine N-terminal non-conservé de 95 acides aminés (**Figure R3A**). La délétion de cette région N-terminale de Rad57 entraîne la perte du signal double-hybride, indiquant ainsi la participation de ce domaine dans l'interaction entre Rad55 et Rad57 (**Figure R4B** ; voir également le paragraphe suivant). Pour tester l'interface entre les deux régions conservées de Rad55 et Rad57, des résidus situés à l'interface et peu conservés ont été ciblés par mutagenèse dirigée.

La logique du choix des mutations consiste à identifier des acides aminés dont les chaînes latérales sont suffisamment exposées pour ne pas risquer d'être délétère au repliement de la protéine et qui soient impliquées dans des interactions les plus favorables possibles avec la protéine partenaire. Les substitutions perturbatrices sont soit des changements de polarité (hydrophobe *vs.* polaire), soit des inversions de charge. En fonction du contexte local, il est possible d'optimiser des substitutions impossibles à compenser par les chaînes latérales du voisinage et qui donc entraîneront une perte d'interaction. Les substitutions 'inversion de charge' peuvent donner lieu à des substitutions compensatoires. Pour que les substitutions

compensatoires fonctionnent, il faut généralement que la position mutée ne soit pas trop enfouie et que la paire électrostatique visée ne soit pas trop impliquée dans un réseau dense. Le choix des positions peut être aussi modulé par les propriétés évolutives dans les espèces proches. Ainsi, une position « moyennement » conservée peut être le reflet d'une chaîne latérale importante ayant subi une pression de sélection relative. Une position trop conservée indique que cette position ne peut être mutée et qui pourrait par ailleurs, être délétère pour la stabilité de la sous-unité indépendamment de la coévolution de la protéine partenaire.



Nous avons choisi de muter les résidus Phe80 (F80) et Asp143 (D143) de Rad55. Ces deux résidus seraient, d'après le modèle, en contact direct avec une hélice α de 15 acides aminés de Rad57 de la position 240 à la position 264 (**Figure R3B**). En accord avec le modèle, la mutation Rad55-F80E provoquant le changement de l'acide aminé aromatique phénylalanine en glutamate, conduit à la perte totale du signal double-hybride (**Figure R4A**). La mutation Rad55-D143K, conduisant au remplacement d'un glutamate en une lysine chargée positivement, entraîne une perte partielle du signal double-hybride, indiquant la participation de D143 dans l'interaction avec Rad57. Une lysine à la position 143 de Rad55 est en conflit avec une arginine, également chargée positivement, en position 252 (R252) de Rad57 située dans l'hélice α en interaction avec Rad55 (**Figure R3B**). Ce conflit pourrait être à l'origine de la perte d'interaction observée. Nous pouvons donc prédire que le changement de Rad57-R252 en glutamate pourrait restituer le signal double-hybride partiellement perdu avec la mutation Rad55-D143K. En accord avec notre prédiction, la perte d'interaction due à la mutation Rad55-D143K est bien compensée par la mutation Rad57-R252D (**Figure R4A**). Enfin, nous avons également ciblé par mutagenèse le résidu Leu390 de Rad57 pour le remplacer par un glutamate (Rad57-L390E). Ce résidu est proche d'un petit feuillet β de Rad55, LKS, de la position 234 à la position 236 et pourrait donc interagir avec ce motif (**Figure R3C**). Effectivement, nous avons observé une perte complète du signal double-hybride avec la protéine mutante Rad57-L390E (**Figure R4A**). Ainsi, nos tests double-hybride sont en accord avec le modèle structural de l'hétérodimère Rad55-Rad57 généré à l'aide d'AlphaFold2. Nos tests ont permis également l'identification de mutations de pertes complètes ou partielles d'interaction entre les deux protéines. L'étude génétique et moléculaire de ces nouvelles mutations permettra de déterminer l'importance de la formation du complexe dans le rôle que Rad55 et Rad57 jouent dans la formation des filaments Rad51.

Le modèle structural ainsi que les mutations qui entraînent une perte du signal double-hybride suggèrent que les résidus mutés sont à l'interface entre Rad55 et Rad57 et participent aux interactions entre les deux protéines. Cependant, une mutation pourrait également engendrer un dépliement complet de la protéine sans pour autant affecter un résidu impliqué dans l'interaction. Nous montrerons plus loin que Rad55-F80E est toujours capable d'interagir avec la sous-unité Csm2 du complexe SHU. Cette protéine est donc toujours présente malgré la mutation. En revanche, nous n'avons aucun signal double-hybride impliquant Rad57 en dehors de Rad55. Ainsi, nous n'avons pas d'assurance quant à la présence de la protéine Rad57-L390E. Pour lever en partie cette incertitude, nous avons intégré les mutations au locus de *RAD55* et *RAD57* puis nous avons ajouté la séquence du peptide FLAG à l'extrémité 3' des

deux gènes. Par Western Blot et à l'aide d'un anticorps anti-FLAG, nous avons pu vérifier la présence des protéines Rad55 et Rad57 sauvages et mutées (**Figure R4C**) dans les différents extraits protéiques cellulaires. Les mutations n'entraînent donc pas la dégradation prématurée des protéines, suggérant de fait leur présence sous leur forme repliée.

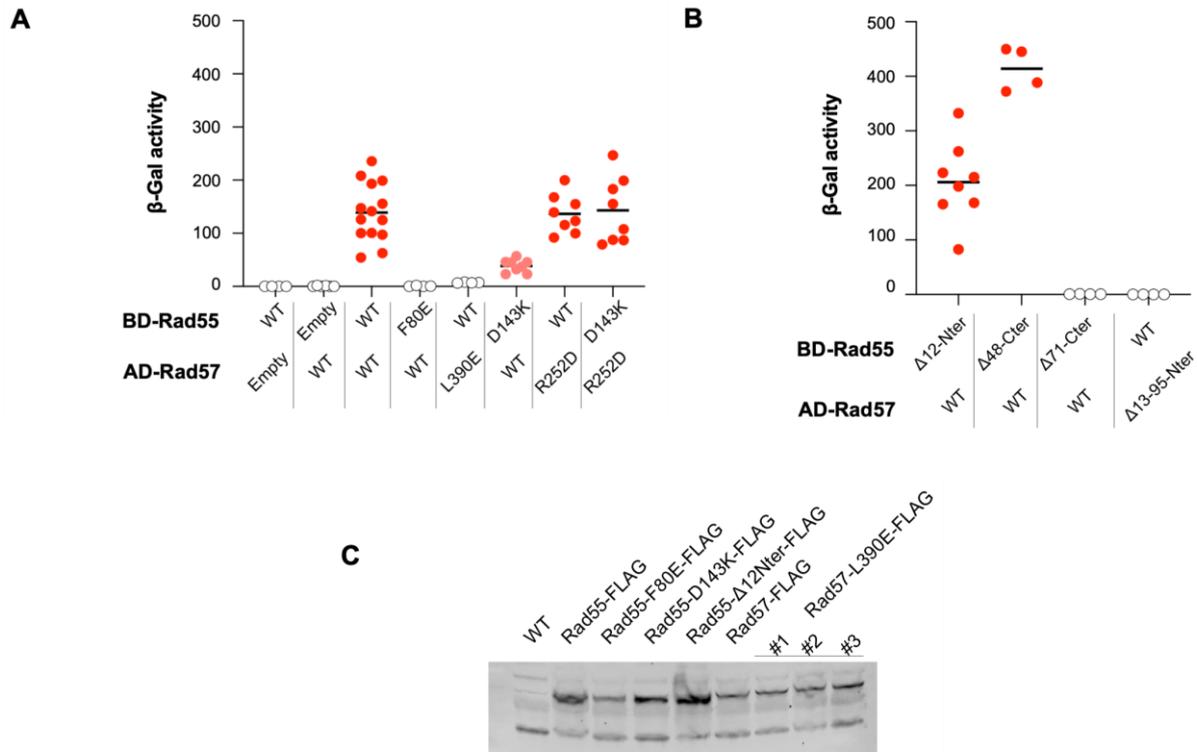


Figure R4. Impact des mutations de Rad55 et Rad57 sur l'intégrité du complexe et sur l'expression des protéines dans les cellules.

- (A) Activité β-gal des différents mutants ponctuels d'interaction de Rad55 et Rad57. L'activité β-gal d'au moins quatre co-transformants indépendants est donnée pour chaque transformation désignée en abscisse par le nom des deux protéines testées. Les ronds blancs indiquent l'absence d'activité ; les ronds rouges indiquent une activité et donc une interaction entre les deux partenaires ; des ronds roses indiquent une baisse importante mais non complète de l'interaction.
- (B) Activité β-gal des différentes régions spécifiques de Rad55 et Rad57.
- (C) Analyse par Western blot de l'expression des protéines sauvages et mutantes de Rad55 et Rad57 intégrées au génome. Afin d'être détectée, les protéines sauvages et mutantes ont été tagguées avec un épitope FLAG. La souche contrôle correspond à la souche sauvage ne contenant pas de protéine tagguée.

2) Les extrémités N-terminale et C-terminale non-conservées de Rad55 ne participent pas à l'interaction avec Rad57

Chacune des trois protéines Rad51, Rad55 et Rad57 possèdent une extrémité N-terminale spécifique non-conservée. L'extrémité N-terminale de Rad51 est formée d'une première chaîne non-structurée d'une soixantaine d'acides aminés, suivie d'une hélice α de la position 63 à la position 76. La partie N-terminale de Rad51 n'est pas incluse dans la structure résolue du filament Rad51 de la levure parue en 2004 (Conway et al., 2004). Le modèle généré avec AlphaFold2 ne semble pas indiquer la participation de la partie N-terminale de Rad51 dans l'établissement du filament (**Figure R1**). La partie N-terminale pourrait jouer un rôle régulateur dans le temps de vie de la protéine au travers d'un motif d'interaction avec la kinase Mec1 (Woo et al., 2020). La partie N-terminale de Rad57 comprend 95 acides aminés formant un domaine structuré indépendant de la région conservée de Rad57 (**Figure R3A**). Ce domaine est impliqué dans l'interaction avec Rad55 et sa délétion entraîne la perte totale du signal double-hybride (**Figure R4B**). La partie N-terminale de Rad55 est plus courte que celles de Rad51 et Rad57. Elle est composée d'une douzaine d'acides aminés formant un court feuillet β ainsi qu'une courte hélice α . Cette petite structure se détache de la structure globulaire conservée et se trouve à l'opposé du domaine d'interaction de Rad55 avec Rad57 (**Figure R3A**). En accord avec le modèle, la délétion des 12 premiers acides aminés de Rad55 n'affecte pas le signal double-hybride qui témoigne de l'interaction avec Rad57 (**Figure R4B**). Ce résultat indique également que les 12 premiers acides aminés ne participent pas au repliement de Rad55 nécessaire pour l'interaction avec Rad57. De plus, la protéine Rad55- Δ 12Nter est détectée par Western Blot (**Figure R4C**). Par ailleurs, Rad55 comprend une longue extrémité C-terminale non conservée et, selon l'analyse par AlphaFold2, non repliée et non structurée. Ainsi, cette extrémité ne semble pas participer à l'interaction avec Rad57 (**Figure R3A**). Nos tests double-hybride montrent en effet, qu'en absence des 48 derniers acides aminés de Rad55, l'interaction entre Rad55 et Rad57 n'est pas perturbée (**Figure R4B**). Une délétion des 71 derniers acides aminés entraîne la perte des deux dernières hélices α de Rad55 en position 339-344 et 351-353 de la protéine. Cette délétion entraîne une perte complète du signal double-hybride (**Figure R4B**) bien que les deux dernières hélices α de Rad55 ne soient pas positionnées à l'interface avec Rad57. Ces deux hélices participeraient donc plus probablement au repliement global de Rad55 qui lui permet d'interagir avec Rad57.

3) La formation du complexe Rad55-Rad57 détermine la fonction de Rad55 et de Rad57 dans la réparation des cassures double-brin de l'ADN

Nous avons identifié des mutations qui entraînent une perte d'interaction entre Rad55 et Rad57 soit complète (Rad55-F80E, Rad57-L390E) soit partielle (Rad55-D143K). Nous pouvons donc étudier la réparation des cassures double-brin (CDB) pour la première fois dans un contexte où les deux protéines sont présentes mais n'interagissent plus entre elles. Seules les propriétés biochimiques du complexe Rad55-Rad57 ont été étudiées (Sung, 1997b; J. Liu et al., 2011). Nous ne savons pas si les protéines seules sont capables de se lier à l'ADN simple-brin (ADNsb), ni si Rad55 est capable d'hydrolyser l'ATP en dehors du complexe. Il est envisageable que la fixation simultanée des deux protéines sur l'ADNsb ait un effet positif sur la formation du filament Rad51, même en absence du complexe. De plus, Rad55-F80E est toujours capable d'interagir avec le complexe SHU (voir Résultats, section III) et, d'après le modèle, Rad57-L390E est toujours capable d'interagir avec Rad51. Pour ces différentes raisons, les mutations que nous avons isolées pourraient être associées à des phénotypes moins prononcés que ceux associés aux délétions complètes des gènes.

Les mutants haploïdes *rad55* Δ et *rad57* Δ montrent une grande sensibilité au méthanesulfonate de méthyle (MMS), un agent alkylant provoquant des dommages à l'ADN (**Figure R5A**). L'étude de la sensibilité au MMS permet donc une première approche simple pour déterminer si les nouvelles mutations sont associées à des phénotypes semblables aux délétions des gènes. Les mutants *rad55-F80E* et *rad57-L390E* présentent une sensibilité au MMS semblable aux mutants *rad55* Δ et *rad57* Δ . Ainsi, bien que les protéines soient présentes, la perte d'interaction entre Rad55 et Rad57 ne permet plus aux cellules de réparer efficacement les dommages à l'ADN induits par le MMS. De manière intéressante, le mutant *rad55-D143K* est à peine sensible au MMS comparé à la souche sauvage. La perte partielle d'interaction avec Rad55-D143K, observée par double-hybride (**Figure R4A**), pourrait conduire à une baisse de la concentration cellulaire du complexe Rad55-Rad57 permettant cependant toujours une formation efficace de nucléofilaments Rad51.

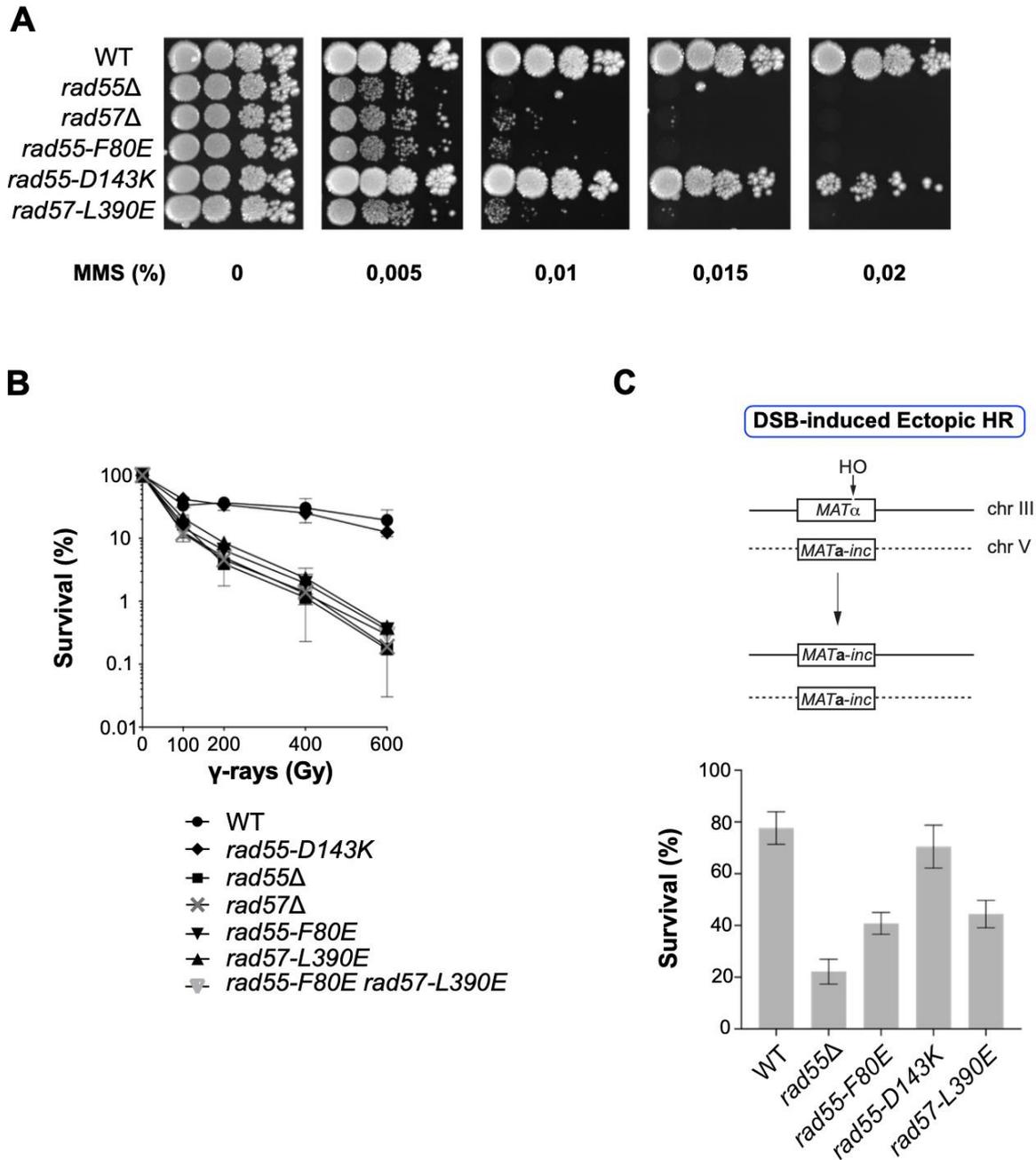


Figure R5. Effet des mutants ponctuels de perte d'interaction du complexe Rad55-Rad57 sur la sensibilité au MMS et sur la réparation des CDB de l'ADN.

- (A) Analyse de la sensibilité des cellules haploïdes, dont le génotype est indiqué sur la gauche des images, sur un milieu riche (YPD) contenant des concentrations croissantes de MMS.
- (B) Survie cellulaire après exposition aux rayonnements γ dans un contexte haploïde. Les données présentées correspondent à la moyenne d'au moins trois expériences indépendantes.
- (C) Représentation schématique du système de CDB induite par HO et réparable par conversion génétique entre deux copies MAT situées sur les chromosomes III et V. La viabilité cellulaire après induction d'une CDB est représentée par la moyenne d'au moins trois expériences indépendantes.

Les rayonnements ionisants induisent des CDB de l'ADN prises en charge par la recombinaison homologue (RH) pour leur réparation soit entre chromosomes homologues soit entre chromatides sœurs, notamment dans les cellules haploïdes. Chez la levure, une souche mutante haploïde *rad51Δ* est extrêmement sensible aux rayonnements γ (e.g. Chanet et al., 1996). Les mutants haploïdes *rad55Δ* et *rad57Δ* sont bien moins sensibles que les mutants *rad51Δ*, indiquant ainsi une réparation par RH toujours possible dans ces mutants. Les mutants *rad55Δ* et *rad57Δ* sont toutefois bien plus sensibles que la souche sauvage ce qui implique une installation défectueuse des filaments Rad51 dans ces mutants (**Figure R5B**, avec l'aide de Laurent Maloisel). Les mutants *rad55-F80E* et *rad57-L390E* présentent exactement la même sensibilité aux rayonnements γ que les mutants nuls (**Figure R5B**). Ce résultat, comparable à la sensibilité au MMS de ces mêmes mutants, démontrent clairement que l'intégrité du complexe Rad55-Rad57 est essentielle pour la réparation des CDB induites aux rayonnements γ . Le mutant *rad55-D143K* ne présente aucune sensibilité aux rayonnements γ . L'installation des filaments Rad51 ne semble donc pas compromise dans ce mutant bien qu'une perte partielle d'interaction entre Rad55 et Rad57 ait été observée en double-hybride.

Nous avons également regardé la réparation d'une CDB induite par l'endonucléase HO dont le gène est soumis au promoteur *GAL*. Dans ce système, la présence de galactose entraîne l'expression du gène *HO*. L'endonucléase HO reconnaît une séquence au locus *MAT α* sur le chromosome III et induit une CDB. Une séquence *MAT α -inc* sur le chromosome V est en partie homologue à *MAT α* et permet la réparation de la CDB par recombinaison ectopique (**Figure R5C**). La conversion de *MAT α* vers *MAT α -inc* au cours du processus élimine la séquence du site de reconnaissance de HO. La survie des cellules sur galactose reflète l'efficacité de la réparation de la CDB induite par HO. Tandis que 80% des cellules de la souche sauvage survivent à la cassure, les mutants *rad55Δ* et *rad57Δ* montrent une survie à 20%. Une réparation existe donc toujours dans ces mutants, contrairement au mutant *rad51Δ* pour lequel moins de 1% des cellules survivent à la CDB. Les fréquences de survie des mutants *rad55-F80E* et *rad57-L390E* sont diminuées de moitié comparées à la fréquence de survie de la souche sauvage mais sont toutefois plus élevées que celles observées avec les mutants nuls (**Figure R5C**). Deux hypothèses sont envisageables pour expliquer cette différence : (i) soit la perte totale d'interaction observée en double-hybride avec ces deux mutations n'est en réalité que partielle, des hétérodimères Rad55-Rad57 sont toujours présents dans ces mutants et permettent une meilleure réparation que dans les mutants nuls ; (ii) soit les deux protéines n'interagissent plus, mais leur présence simultanée à la CDB permet une formation du filament Rad51 plus efficace que celle obtenue avec une seule protéine du complexe. Cet effet partiel des mutants *rad55-*

F80E et *rad57-L390E* n'est observé qu'en présence d'une CDB unique et non pas en présence de dommages multiples et variés (CDB, brèches simple-brin de l'ADN induites par le MMS et les rayonnements γ). L'ensemble des résultats montrent cependant clairement que l'intégrité du complexe Rad55-Rad57 est requise pour une réparation optimale des CDB. Cependant, le mutant *rad55-D143K* ne montre aucune sensibilité à la CDB induite par HO. Une déstabilisation partielle du complexe n'est donc pas suffisante pour diminuer la fréquence de réparation d'une CDB. Ce résultat est en accord avec la résistance au MMS et aux rayonnements γ du mutant *rad55-D143K*.

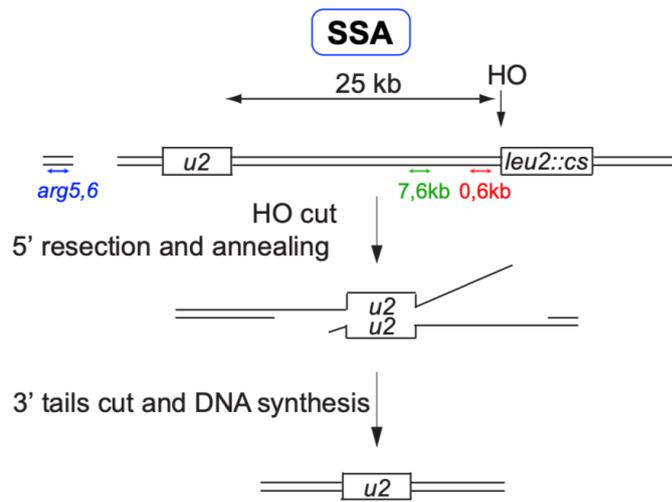
4) La formation du complexe Rad55-Rad57 est requise pour le recrutement de Rad51 à une CDB

La réparation d'une CDB est moins efficace en absence de Rad55 ou de Rad57 et dans les mutants *rad55-F80E* et *rad57-L390E*. La formation du filament Rad51 est donc probablement affectée dans ces mutants. Pour conforter cette hypothèse moléculairement, nous avons analysé le recrutement de Rad51 au niveau d'une CDB induite par HO et réparable par SSA à l'aide d'une séquence homologue située à 25 kb de la cassure (**Figure R6A**). La réparation nécessite la formation de longues extrémités 3' simple-brin avant que les régions homologues puissent s'apparier. Ainsi, dans ce système, nous pouvons suivre le recrutement de Rad51 sur une période de plusieurs heures par immunoprécipitation de la chromatine (ChIP ; **Figure R6B**). Nous avons suivi le recrutement de Rad51 à 0,6 kb de la CDB ainsi qu'à 7,6 kb. Le recrutement de Rad51 est bien plus fort à 0,6 kb de la CDB qu'à 7,6 kb, indiquant une étendue restreinte des filaments Rad51, ou bien une persistance plus longue des filaments proche de la CDB. En accord avec cette dernière hypothèse, Rad51 est plus facilement observable à 7,6 kb de la CDB lorsque Srs2 est absente. Une forte baisse du recrutement de Rad51 est observée dans le mutant *rad55 Δ* et une baisse équivalente est observée dans le mutant *rad55-F80E* (**Figure R6B**). Le défaut de réparation des CDB dans ces mutants est donc bien associé à une formation défectueuse des filaments Rad51. De plus, l'intégrité du complexe Rad55-Rad57 est requise pour cette formation : la présence des deux protéines n'interagissant plus entre elles, ne permet pas l'assemblage correct des filaments Rad51.

Le complexe Rad55-Rad57 protège directement ou indirectement les filaments Rad51 contre leur déstabilisation par Srs2 (J. Liu et al., 2011; Roy et al., 2021). Le défaut de recrutement de Rad51 dans les mutants *rad55 Δ* et *rad55-F80E* pourrait donc être la conséquence d'une perte de protection contre Srs2. Pour tester cette hypothèse, nous avons

étudié le recrutement de Rad51 dans des souches *srs2* Δ (**Figure R6B**). Le recrutement de Rad51 est augmenté aussi bien à 0,6 kb qu'à 7,6 kb de la CDB en absence de Srs2. Ce résultat confirme le rôle déstabilisateur de Srs2 sur les filaments Rad51. Étonnamment, le recrutement de Rad51 dans les souches *srs2* Δ *rad55* Δ et *srs2* Δ *rad55-F80E* reste très faible : la délétion de *SRS2* ne supprime pas le défaut de recrutement de Rad51 dans le mutant *rad55* Δ ni dans le mutant *rad55-F80E*. Le complexe Rad55-Rad57 est donc requis pour l'installation du filament Rad51, indépendamment de son rôle de protection contre Srs2.

A



B

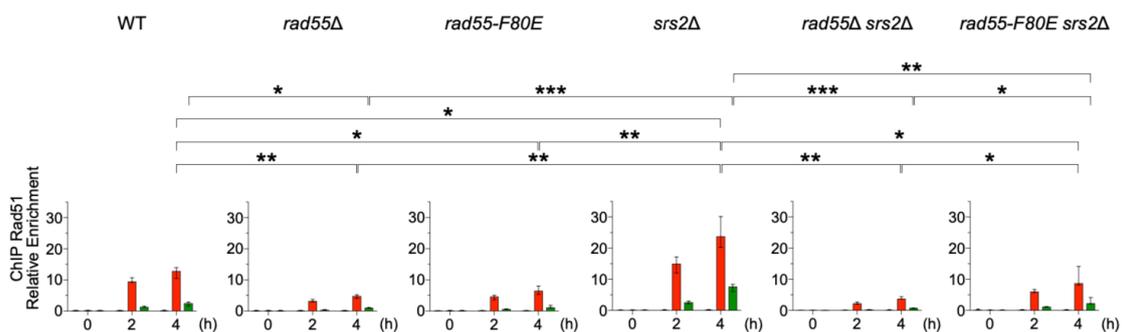


Figure R6. Etude de l'enrichissement de Rad51 à une CDB induite par l'endonucléase HO par ChIP dans un système de réparation par SSA.

- (A) Représentation schématique du système de réparation d'une CDB induite par HO par la voie SSA entre deux répétitions tronquées du gène LEU2 situées à 25kb l'une de l'autre.
- (B) L'enrichissement relatif de Rad51 a été évalué par qPCR à 0,6 ou 7,6 kb de la CDB induite par HO et au locus ARG5,6 non coupé aux temps indiqués (heures). La valeur médiane ($n \geq 2$) est indiquée et les barres d'erreur représentent les valeurs supérieures et inférieures mesurées. L'analyse statistique a été faite à partir du test exact de Fisher, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$; seules les différences significatives sont indiquées.

5) La formation du complexe Rad55-Rad57 est requise pour la protection des filaments Rad51 contre Srs2

L'installation du filament Rad51 à une extrémité 3' simple-brin au niveau d'une CDB nécessite le complexe Rad55-Rad57. Ce résultat illustre vraisemblablement le rôle de médiateur de ce complexe qui ne peut être compensé par la présence de Rad52. Étonnamment, le défaut d'installation de Rad51 observé dans notre système SSA (**Figure R6A**) n'est pas associée à une diminution drastique de la réparation de la CDB dans notre système de recombinaison ectopique (**Figure R5C**). De plus, les filaments installés dans les mutants *rad55Δ* et *rad55-F80E* ne semblent pas être sensibles à l'activité de Srs2 puisqu'en absence de Srs2, le recrutement de Rad51 n'est pas plus efficace (**Figure R6B**). Notre laboratoire a démontré un rôle protecteur de Rad52 des filaments Rad51 contre Srs2 (E. Ma et al., 2018). Nous pouvons alors proposer que dans le système SSA, mais également dans le système de recombinaison ectopique, Rad52 protège toujours les filaments Rad51 formés en absence du complexe Rad55-Rad57 et donc, permet une réparation des CDB. Cette réparation reste toutefois moins efficace que dans les cellules sauvages (**Figure R5C**). Nous notons que l'observation *in vitro* de la protection des filaments Rad51 par Rad55-Rad57 s'est faite en absence de Rad52 (J. Liu et al., 2011).

Contrairement à nos observations faites par CHIP sur le recrutement de Rad51 sur une CDB, les souches *rad55Δ* et *rad57Δ* sont sensibles aux rayonnements γ et cette sensibilité dépend de l'activité de Srs2 puisque les double mutants *rad55Δ srs2Δ* et *rad57Δ srs2Δ* ne sont plus sensibles (Liu et al., 2011 ; **Figure R7**). Ce résultat illustre la protection *in vivo* des filaments Rad51 contre Srs2 par le complexe Rad55-Rad57, observée également *in vitro* (J. Liu et al., 2011). La réponse aux irradiations ou bien la nature et/ou l'accumulation des dommages après irradiations pourraient être responsables de la différence observée avec la formation de filaments Rad51 au niveau d'une CDB unique. Quoiqu'il en soit, les mutants *rad55-F80E* et *rad57-L390E* présentent la même sensibilité aux rayons γ que celles des mutants nuls et cette sensibilité est dépendante de l'activité de Srs2 (**Figure R7**). Nous pouvons donc proposer que le rôle protecteur de Rad55-Rad57 contre l'activité de Srs2 nécessite la formation du complexe.

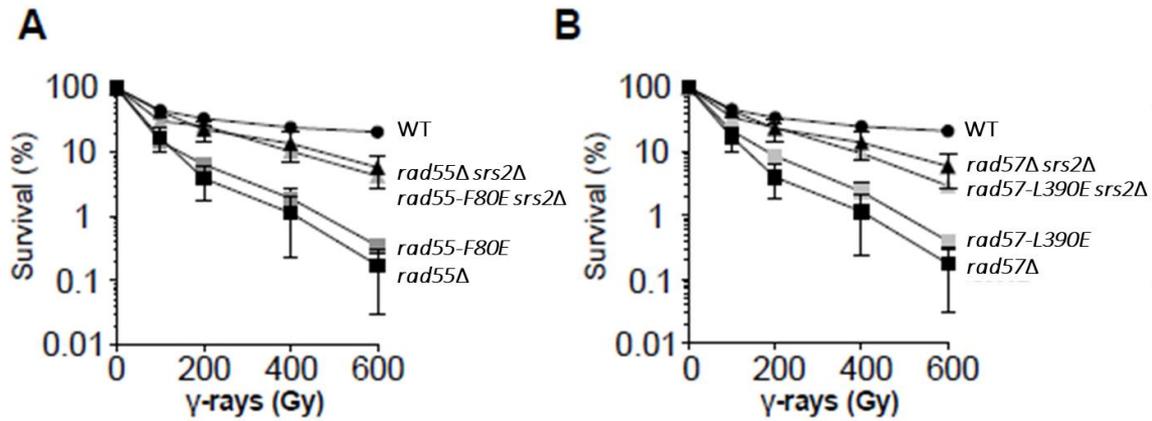


Figure R7. L'intégrité du complexe Rad55-Rad57 est requise pour la protection des filaments Rad51 contre l'activité déstabilisatrice de Srs2.

- (A) Survie cellulaire après exposition aux rayons γ des souches haploïdes Rad55 sauvage et mutante en présence ou en absence de Srs2.
 (B) Survie cellulaire après exposition aux rayons γ des souches haploïdes Rad57 sauvage et mutante en présence ou en absence de Srs2.

Les données présentées correspondent à la moyenne d'au moins trois expériences indépendantes.

6) La formation du complexe Rad55-Rad57 est requise pour la réparation post-réplivative des brèches simple-brin de l'ADN

Une étude récente au laboratoire a révélé un rôle essentiel pour Rad55-Rad57 dans la réparation des brèches ADN simple-brin post-réplivatives. Ainsi, la recombinaison induite par les UV est diminuée très fortement chez les mutants *rad55Δ* et *rad57Δ*. De plus, les cellules dépourvues de Pol ζ et déficientes pour la réparation des dimères de pyrimidines induits aux UV, deviennent hypersensibles aux UV en absence de Rad55. Enfin, les foyers RPA induits en phase S après irradiations aux UV et indiquant la présence de brèches ADN simple-brin, persistent plus longtemps dans le mutant *rad55Δ* que dans la souche sauvage (Maloisel et al., 2023). Rad55-Rad57 assure trois fonctions dans la réparation des brèches simple-brin : (i) l'installation du filament Rad51, (ii) la protection du filament contre Srs2 et (iii) la compétition pour la prise en charge des brèches avec les polymérases translésionnelles (Maloisel et al., 2023). Pour déterminer si ces trois fonctions dépendent du complexe, ou bien si la présence de Rad55 et de Rad57 ne pouvant plus interagir pourrait cependant suffire, nous avons choisi d'étudier la réponse aux UV du mutant *rad55-F80E* dans lequel l'interaction entre Rad55 et Rad57 est compromise.

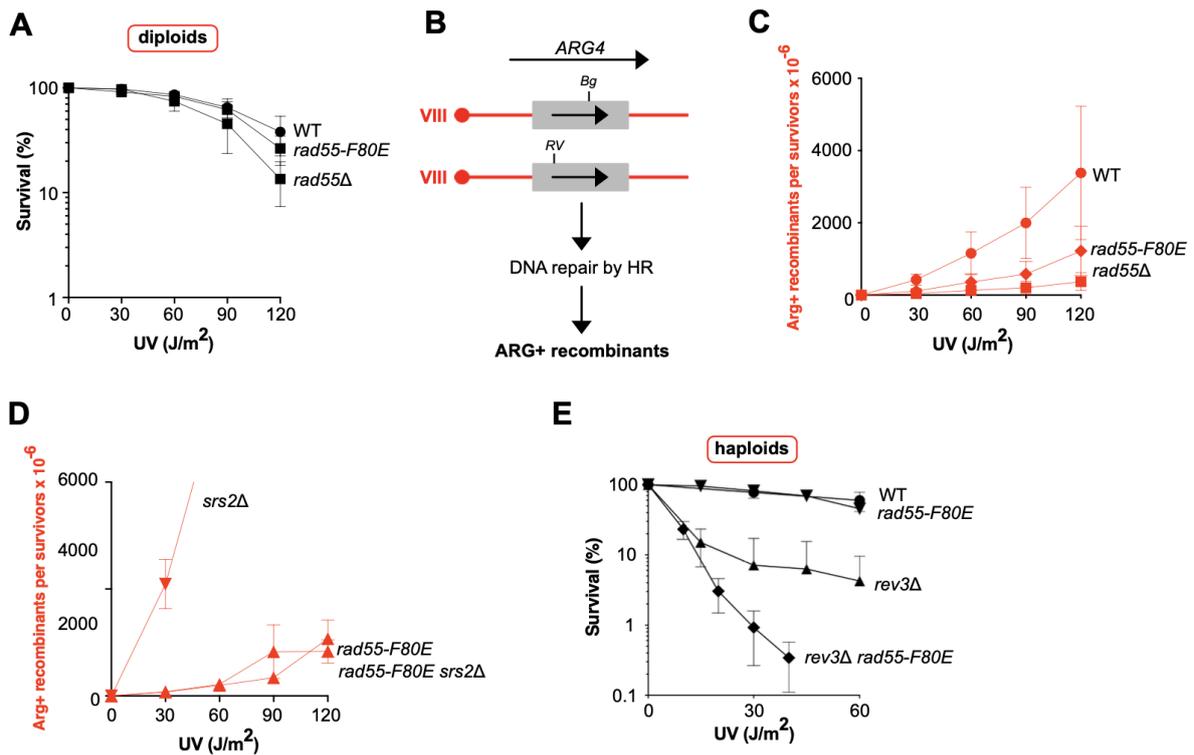


Figure R8. L'intégrité du complexe Rad55-Rad57 joue un rôle majeur dans la RH UV-induite.

- (A) Survie cellulaire après exposition aux rayons UV dans un contexte diploïde. Les données présentées correspondent à la moyenne d'au moins trois expériences indépendantes.
- (B) Représentation schématique du système génétique utilisé pour mesurer la recombinaison hétéro-allélique spontanée au locus *ARG4*.
- (C) Fréquence de recombinants [Arg+] après exposition aux rayons UV des cellules diploïdes Rad55 sauvage et mutante.
- (D) Fréquence de recombinants [Arg+] après exposition aux rayons UV des cellules diploïdes Rad55 sauvage et mutante en absence de Srs2.
- (E) Survie cellulaire après exposition aux rayons UV en absence de Rev3 dans un contexte haploïde.

Le mutant *rad55-F80E* ne présente aucune sensibilité aux UV (**Figure R8A**, avec l'aide de Laurent Maloisel). Pour étudier plus en détail la réparation par RH des dommages à l'ADN induits par les UV, nous avons utilisé deux hétéroallèles de *ARG4* (*arg4-RV* et *arg4-Bg*) au locus du gène sur le chromosome VIII. Les allèles *arg4-RV* et *arg4-Bg* correspondent à une délétion de deux paires de bases et d'une insertion de quatre paires de bases, respectivement, et ne révertent pas spontanément. Seule la recombinaison entre les deux allèles permet de restituer un allèle sauvage d'*ARG4*, principalement par conversion génique d'une mutation sur les deux (**Figure R8B**) (Coïc et al., 2000). Les fréquences de recombinants [Arg+] induits après différentes doses d'UV sont fortement diminuées dans le mutant *rad55-F80E* (**Figure R8C**). Comme observé dans le mutant *rad55Δ*, cette diminution est indépendante de Srs2 puisque les fréquences de recombinants [Arg+] UV-induits dans le double mutant *rad55-F80E srs2Δ* sont

rigoureusement similaires à celles observées dans le mutant simple *rad55-F80E* (**Figure R8D**). La diminution de la recombinaison hétéroallélique UV-induite dans le mutant *rad55-F80E* suggère donc que la recombinaison est déficiente dans ce mutant. Pour tester cette hypothèse, nous avons étudié la sensibilité aux UV de cellules dépourvues de la polymérase translésionnelle Pol ζ . Les cellules mutantes *rev3 Δ* ne codent plus la sous-unité catalytique de Pol ζ et montrent une sensibilité aux UV (**Figure R8E**). Nous observons que la survie des cellules mutantes *rev3 Δ* aux UV est très fortement diminuée dans le contexte *rad55-F80E* (**Figure R8E**). Ce résultat montre d'une part, que la survie des cellules *rev3 Δ* aux UV dépend de la recombinaison homologue et d'autre part, que cette recombinaison n'est plus effective dans le mutant *rad55-F80E*.

Pour suivre moléculairement la réparation des brèches simple-brin post-répliquatives, nous avons analysé l'apparition de foyers RPA par microscopie à fluorescence à l'aide de la construction Rfa1-YFP (voir Matériels et Méthodes). Des cellules haploïdes arrêtées en phase G1 du cycle sont soumises à une irradiation UV de 60 J/m² (**Figure R9A**, avec l'aide de Laurent Maloisel). Les cellules irradiées maintenues en G1 ne montrent pas d'augmentation des foyers RPA (Maloisel et al., 2023). Les cellules non-irradiées relâchées en phase S montrent une augmentation modérée des foyers RPA (Maloisel et al., 2023 ; **Figure R9B**). Remarquablement, les cellules irradiées relâchées en phase S montrent une très forte augmentation des foyers RPA (**Figure R9C**). Ces résultats indiquent la présence de brèches simple-brin issues de blocages de fourches de réplication induits par les UV (R. P. Wong et al., 2020; Maloisel et al., 2023). Ces foyers disparaissent rapidement dans une souche sauvage (**Figure R9C**). Nous observons que les fréquences de cellules montrant des foyers RPA en absence d'irradiation UV sont plus élevées avec la souche mutante *rad55-F80E* qu'avec les cellules sauvages (**Figure R9B vs. R9D**). Cette observation est intéressante puisque la même observation a été faite avec les cellules *rad55 Δ* (Maloisel et al., 2023). Ce résultat suggère des défauts réplcatifs en absence de Rad55 (*rad55 Δ*) mais également en absence du complexe (*rad55-F80E*). Par ailleurs, nous observons que les foyers RPA induits après une irradiation aux UV persistent dans la souche *rad55-F80E* et ne présentent donc pas la même cinétique de résolution que dans les cellules sauvages (**Figure R9C vs. R9E**). Ainsi, bien que le mutant *rad55-F80E* ne présente aucune sensibilité aux UV, l'analyse des foyers RPA indique cependant un retard dans la prise en charge des brèches simple-brin. Ce résultat est identique à ce qui est observé avec la souche *rad55 Δ* (Maloisel et al., 2023). Finalement, nous avons également regardé la présence des foyers RPA dans le double mutant *rad55-F80E rev3 Δ* . Le simple mutant *rev3 Δ* présente le même retard dans la résolution des foyers RPA induits aux UV que le mutant *rad55 Δ* (**Figure R9G**). Le

double mutant *rad55-F80E rev3Δ* présente deux phénotypes remarquables. La moitié des cellules non-irradiées montrent au moins un foyer RPA (**Figure R9H**). Ce phénotype est similaire à celui présenté par le double mutant *rad55Δ rev3Δ* (Maloisel et al., 2023). Il suggère que les voies de prise en charge des brèches simple-brin contrôlées par Polζ et par la RH sont abolies dans ces mutants, y compris dans le mutant *rad55-F80E*. La perte de ces deux voies génère une instabilité répllicative observée sans dommages induits à l'ADN. Le deuxième phénotype du double mutant *rad55-F80E rev3Δ* est l'absence complète de résolution des foyers RPA induits aux UV dans les quatre heures suivant l'irradiation (**Figure R9I**). Ce résultat montre que la recombinaison est largement déficiente dans le mutant *rad55-F80E* pour la prise en charge des brèches simple-brin.

Pour déterminer le rôle de Srs2 dans la perte de la RH dans le mutant *rad55-F80E*, il nous reste à déterminer la sensibilité aux UV du triple mutant *rad55-F80E rev3Δ srs2Δ* et la comparer à celle du double mutant *rad55-F80E rev3Δ*. En effet, le triple mutant *rad55Δ rev3Δ srs2Δ* est plus résistant que le double mutant *rad55Δ rev3Δ*. Ce résultat a permis de proposer que le complexe Rad55-Rad57 protégeait les filament Rad51 contre Srs2 également sur les brèches simple-brin (Maloisel et al., 2023). Quoiqu'il en soit, les données obtenues jusqu'à présent indiquent que les phénotypes associés à *rad55-F80E* sont identiques à ceux associés au mutant nul. Ainsi, la formation du complexe Rad55-Rad57 serait donc bien essentielle pour les trois fonctions de ce complexe dans la prise en charge des brèches simple-brin définies précédemment (Maloisel et al., 2023).

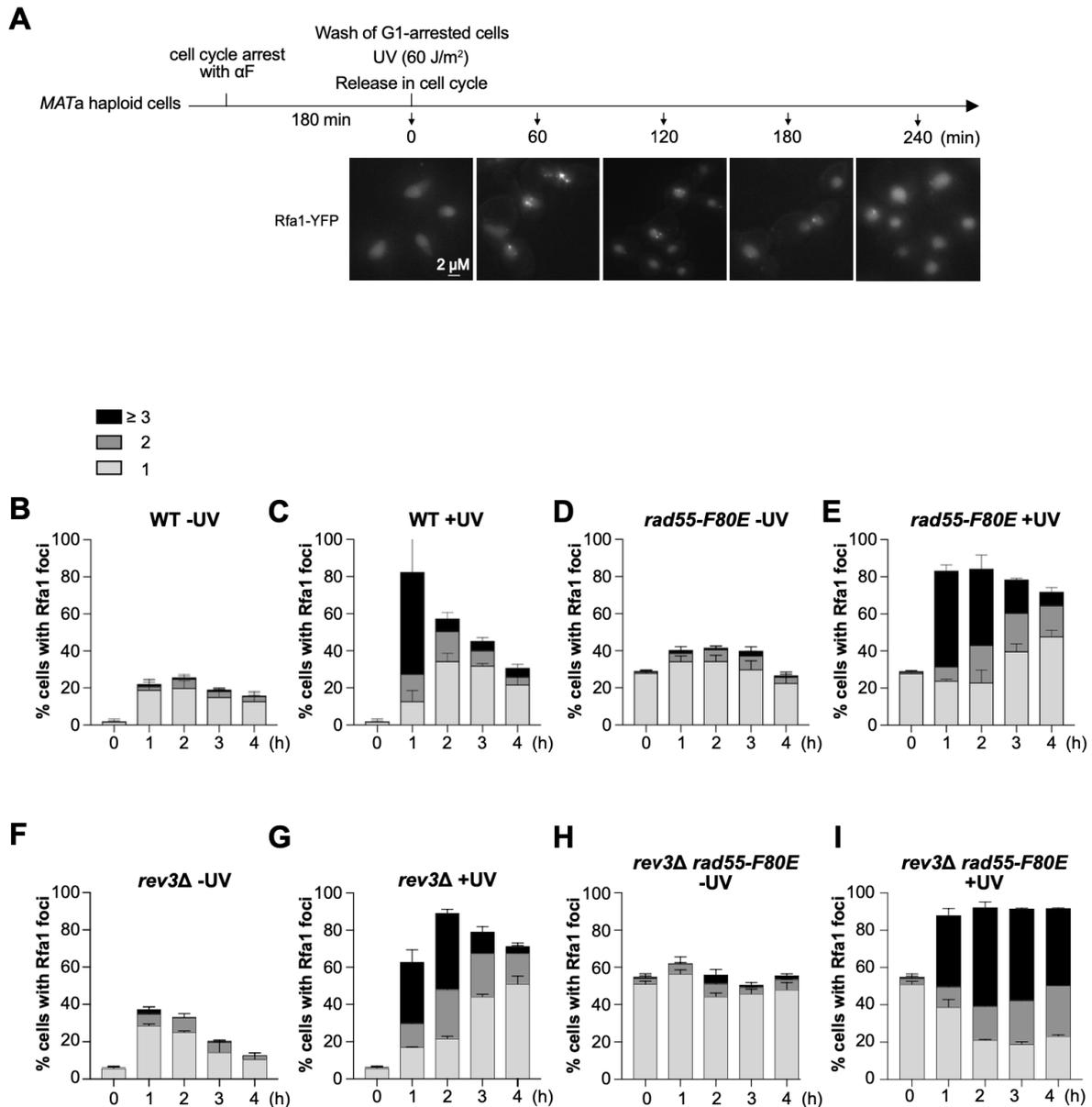


Figure R9. L'intégrité du complexe Rad55-Rad57 est requise pour la résolution des foyers RPA après irradiations UV.

(A) Schéma expérimental pour l'analyse par microscopie des foyers RPA. Les cellules arrêtées en phase G1 avec le facteur α (αF) ont été exposées aux UV avant d'être relarguées dans le cycle cellulaire. Des échantillons ont été prélevés pour être analysés toutes les heures pendant quatre heures. Des images représentatives des cellules Rfa1-YFP sont présentées. Les barres d'échelle correspondent à 2 μm .

(B-E) Quantification des foyers Rfa1-YFP détectés par microscopie à fluorescence dans les cellules sauvages et mutantes pour Rad55 en présence ou (F-I) en absence de Rev3 après exposition ou non aux UV. Les barres d'erreur indiquent les écarts types de trois expériences indépendantes.

7) La toxicité des filaments Rad51 dans la voie SSA dépend de la formation d'un complexe Rad55-Rad57 stable

Pour explorer le rôle du complexe Rad55-Rad57 dans la formation d'intermédiaires de recombinaison toxiques, nous avons étudié dans un premier temps la survie des cellules dans le système SSA décrit auparavant (**Figure R6A**). Dans ce système, la CDB induite par l'endonuclease HO est réparée par SSA avec l'appariement d'une extrémité 3'-OH simple-brin et une séquence complémentaire située à 25 kb de la CDB. Dans ce système, la réparation de la CDB dépend de l'activité d'appariement de brin de Rad52 mais ne dépend pas de la recombinase Rad51 (Fishman-Lobell et al., 1992; Ivanov et al., 1996; Vaze et al., 2002). Cependant, Rad51 vient se fixer à l'ADNsb comme nous pouvons le constater par nos expériences de ChIP (**Figure R6B**). De plus, Rad51 empoisonne le système puisque les cellules *srs2Δ* sont extrêmement sensibles à la CDB et cette sensibilité disparaît en absence de Rad51 (Vaze et al., 2002 ; **Figure R10B**). Il a été montré que les premières étapes de la voie SSA n'étaient pas inhibées dans le mutant *srs2Δ* (Vasianovich et al., 2017). Les auteurs postulent donc que les filaments Rad51 inhiberaient la synthèse réparatrice après l'appariement des deux séquences répétées. En accord avec leur hypothèse, ils montrent *in vitro* que Rad51 inhibe la synthèse d'ADN en prévenant le recrutement de PCNA d'une part, et d'autre part, en inhibant la synthèse d'ADN par Polδ (Vasianovich et al., 2017). Nous confirmons que Rad55 et Rad57 ne sont pas nécessaires pour la réparation par SSA d'une CDB induite par HO (Ivanov et al., 1996 ; **Figure R10A**). Par ailleurs, nous montrons que *rad55Δ* supprime la létalité du mutant *srs2Δ* générée par la CDB (**Figure R10B**). Rad55-Rad57 étant impliqué dans le recrutement de Rad51 à la CDB induite par HO, nous proposons donc qu'il n'y a plus de formation de filaments Rad51 toxiques en absence de Rad55 dans la voie SSA. Nous observons des résultats similaires avec les deux mutants de perte d'interaction *rad55-F80E* et *rad57-L390E*, impliquant que la formation du complexe Rad55-Rad57 est bien nécessaire pour la formation des filaments toxiques (**Figure R10A et B**). Étonnamment, l'allèle muté *rad55-D143K* supprime également la létalité associée à *srs2Δ*. La mutation Rad55-D143K conduit à une perte partielle du signal double-hybride entre Rad55 et Rad57 (**Figure R4A**) et ne conduit pas à une sensibilisation des cellules au MMS ou aux rayonnements γ (**Figure R5A et B**). La réparation des dommages à l'ADN est donc toujours présente dans ce mutant. Cependant, les filaments Rad51 installés par le complexe instable Rad55-D143K-Rad57 ne seraient plus en mesure de prévenir la synthèse d'ADN réparatrice après appariement des séquences complémentaires et ne seraient donc plus toxiques. Dans le cadre de cette hypothèse, malgré l'absence de toxicité, il est possible toutefois

que la cinétique de réparation d'une CDB par SSA soit ralentie dans le mutant *rad55-D143K*. En effet, dans ce mutant, le complexe est toujours présent, comparé au mutant *rad55Δ* dans lequel le complexe est absent, et pourrait donc retarder soit le chargement de PCNA, soit l'initiation de la synthèse d'ADN. Cette prédiction sera testée en suivant par PCR l'apparition des intermédiaires de réparation au cours du temps avec les outils que nous avons déjà au laboratoire. Par ailleurs, si les filaments Rad51 présents dans le mutant *rad55-D143K* sont moins aptes à bloquer la synthèse, redeviendraient-ils toxiques si la synthèse réparatrice était elle-même déstabilisée ? Pour tester cette hypothèse génétiquement, nous avons analysé la réparation par SSA dans un mutant *pol32Δ*. Pol32 est une sous-unité structurale non essentielle à la fois de Polδ et de Polζ, deux polymérases impliquées en recombinaison. Effectivement, nous observons que la survie à la CDB du mutant *srs2Δ rad55-D143K* est diminuée de moitié lorsque *POL32* est délété (**Figure R10C**). Ce résultat suggère donc bien qu'une balance existe entre formation du filament Rad51 et synthèse d'ADN. Ces observations sont importantes car elles pourraient amener de nouveaux arguments suggérant que les filaments Rad51 sont toxiques dans des situations dans lesquelles ils inhiberaient la synthèse d'ADN, notamment au cours de la réplication de l'ADN en phase S. Toujours dans le cadre de cette hypothèse, le double mutant *srs2Δ mrc1Δ* n'est pas viable et cette létalité est due à la présence de filaments Rad51 toxiques (Esta et al., 2013). Mrc1 est impliquée dans la surveillance de la phase S en contrôlant le couplage entre les hélicases et les ADN-polymérases aux fourches de réplication. Le rôle de Mrc1 prévient donc la formation de longs ADNsb aux fourches sur lesquels Rad51 pourrait venir se fixer et prévenir la synthèse répllicative (Katou et al., 2003). De manière très intéressante, et en accord avec nos observations dans le système SSA, nous observons que la létalité synthétique observée entre *srs2Δ* et *mrc1Δ* est supprimée par *rad55-D143K* (**Figure R10D**, avec l'aide de Laurent Maloisel).

La toxicité des filaments Rad51 dans la voie SSA en absence de Srs2 nous a permis de tester également la mutation Rad57-R252D qui compense la perte partielle entre Rad55 et Rad57 observée dans le mutant *Rad55-D143K* (**Figure R3A et B ; Figure R4A**). La mutation Rad57-R252D semble donc restaurer l'interaction entre Rad55 et Rad57 et devrait donc rétablir la toxicité des filaments Rad51 perdue dans le mutant *rad55-D143K*. En effet, dans le système SSA, le triple mutant *srs2Δ rad55-D143K rad57-R252D* est plus sensible à la CDB induite par HO que le double mutant *srs2Δ rad55-D143K* (**Figure R10E**). Une meilleure interaction entre Rad55 et Rad57 est donc bien associée à une augmentation de la toxicité des filaments Rad51.

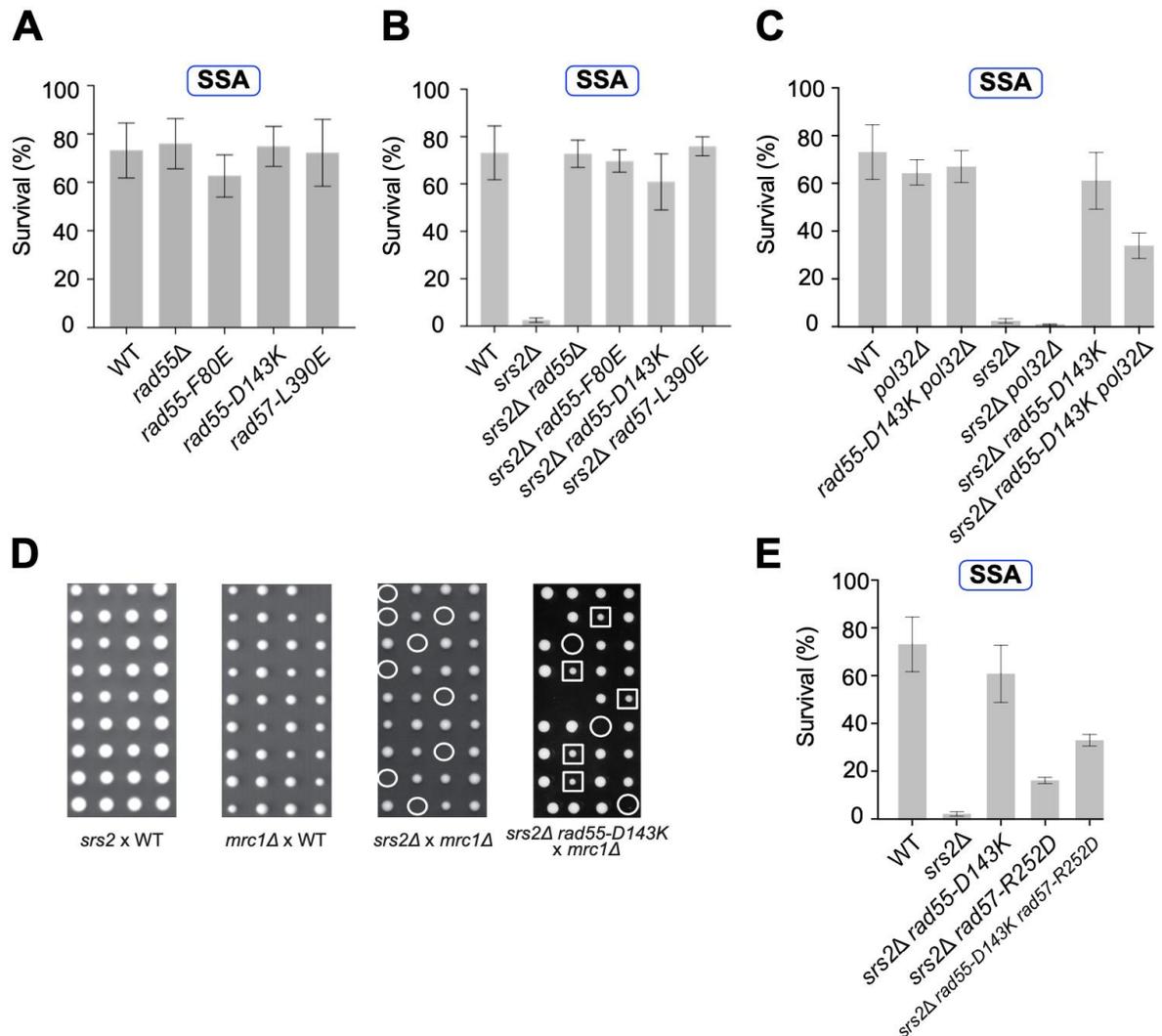


Figure R10. L'intégrité du complexe Rad55-Rad57 influence la formation de filaments Rad51 toxiques dans un système SSA et lors d'un découplage de fourche de réplication, dans un contexte *srs2Δ*.

- (A) Survie cellulaire après induction d'une CDB par HO réparable par SSA. Les données présentées correspondent à la moyenne d'au moins trois expériences indépendantes.
- (B) Survie cellulaire après induction d'une CDB par HO réparable par SSA en absence de Srs2.
- (C) Survie cellulaire après induction d'une CDB par HO réparable par SSA en absence de la sous-unité Po32 de la polymérase Polδ et en présence ou en absence de Srs2.
- (D) Analyse du croisement entre la souche mutante haploïde *rad55-D143K* et la souche haploïde synthétique létale *srs2Δ mrc1Δ*. Les spores doubles mutantes *srs2Δ mrc1Δ*, qui ne contiennent donc pas *rad55-D143K*, sont indiquées par des ronds blancs. Les carrés blancs indiquent les triples mutants.
- (E) Survie cellulaire après induction d'une CDB par HO et réparable par SSA dans la souche mutante *rad55-D143K*, en présence ou non de son compensatoire et en absence de Srs2.

8) La formation d'un complexe Rad55-Rad57 stable est responsable des fréquences élevées de recombinaison dans le mutant *srs2Δ*

L'étude de la sensibilité du mutant *srs2Δ* aux UV a permis également de mettre en évidence la formation d'intermédiaires de recombinaison toxiques. En effet, les mutants déficients pour la RH sont très peu sensibles aux UV et la sensibilité aux UV du mutant *srs2Δ* est supprimée dans ces mutants. Ainsi, les double mutants *srs2Δ rad51Δ*, *srs2Δ rad52Δ* et *srs2Δ rad55Δ* sont résistants aux UV (Gangloff et al., 2000; Klein, 2001; Fabre et al., 2002). Les mutants de perte d'interaction entre Rad55 et Rad57 ne montrent aucune sensibilité aux UV (**Figure R8A et E ; Figure R11A**). Nous observons une suppression de la sensibilité aux UV d'une souche *srs2Δ* par les allèles *rad55-F80E* et *rad57-L390E* conduisant à la perte d'interaction complète entre Rad55 et Rad57 (**Figure R11B et C**). Ainsi, la formation d'intermédiaires toxiques de recombinaison induits par les UV est abolie dans ces mutants, probablement parce que les brèches simple-brin ne sont plus prises en charge par la RH dans ces mutants (voir paragraphe 6). Cependant, l'allèle *rad55-D143K* ne conduit qu'à une très faible suppression de la sensibilité aux UV de la souche *srs2Δ* (**Figure R11B**). La toxicité des filaments Rad51 induite aux UV est donc différente de la toxicité observée dans la voie SSA. Il est possible que dans le mutant *rad55-D143K*, les filaments Rad51 soient toujours efficaces pour la recherche d'homologie et pour l'invasion de brin et donc toujours capables de former des intermédiaires de recombinaison toxiques après l'invasion. En accord avec cette hypothèse, la recombinaison hétéroallélique mesurée au locus *ARG4* est très peu réduite dans le mutant *rad55-D143K*, démontrant ainsi l'efficacité des filaments Rad51 dans ce mutant (**Figure R11D**). De manière intéressante, nous observons que les fréquences de recombinants [Arg⁺] sont très élevées dans le mutant *srs2Δ* et que ces fréquences diminuent très fortement dans le double mutant *rad55-D143K srs2Δ* (**Figure R11E**). La survie du mutant *srs2Δ* et celle du mutant *rad55-D143K srs2Δ* étant similaires, nous proposons que dans le double mutant *rad55-D143K srs2Δ*, la baisse des recombinants [Arg⁺] correspond à une prise en charge plus fréquente des lésions UV par les polymérases translésionnelles. Les filaments Rad51 formés sur les brèches simple-brin post-réplcatives par le complexe Rad55-D143K-Rad57 seraient donc moins aptes à prévenir le recrutement de ces polymérases.

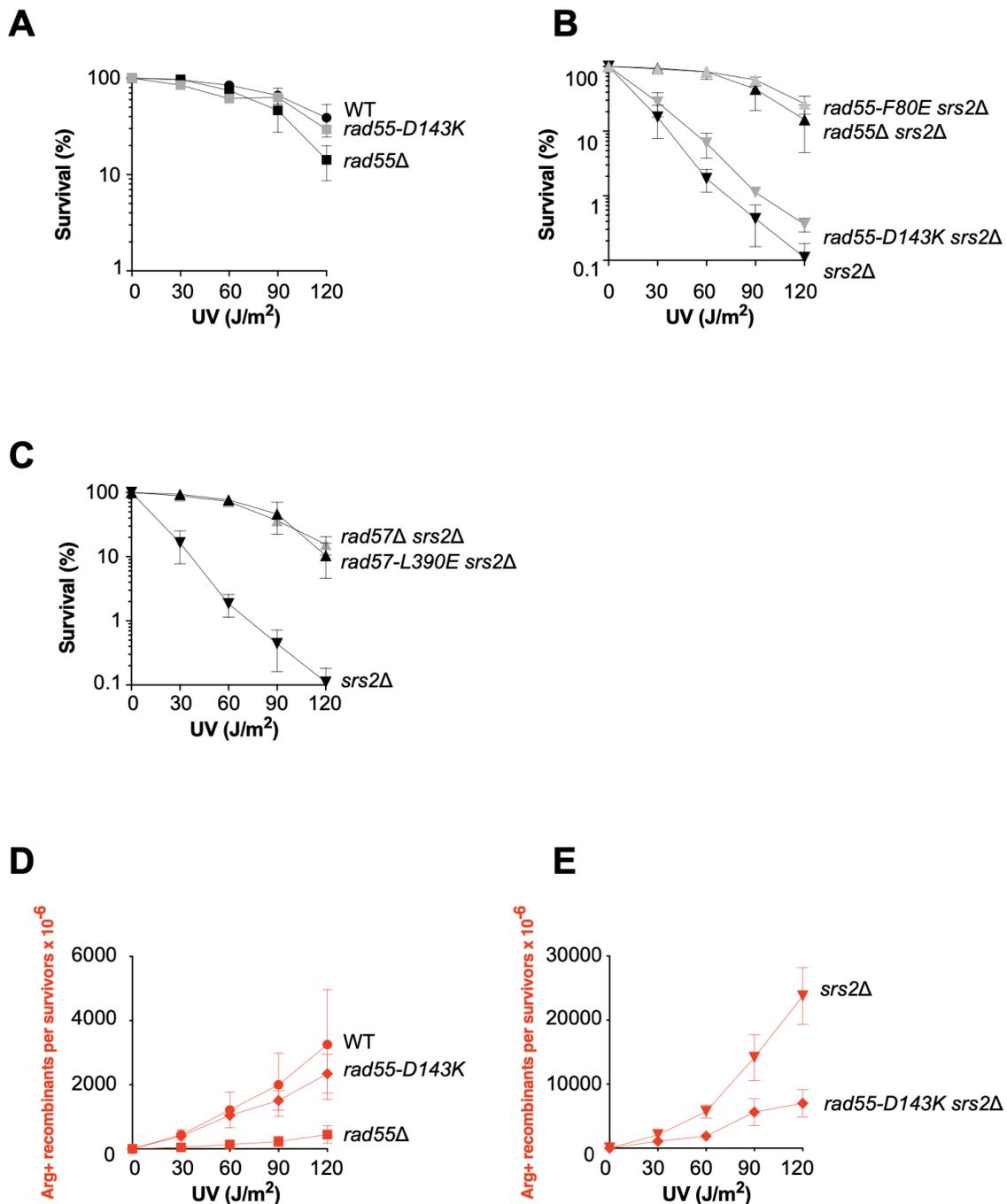


Figure R11. L'intégrité du complexe Rad55-Rad57 influence la formation de structures de recombinaison toxiques dans un contexte *srs2Δ*.

- (A) Survie cellulaire après exposition aux UV des cellules mutantes pour Rad55 dans un contexte haploïde. Les données présentées correspondent à la moyenne d'au moins trois expériences indépendantes.
- (B) Survie cellulaire après exposition aux UV des cellules mutantes pour Rad55 en absence de Srs2 dans un contexte haploïde.
- (C) Survie cellulaire après exposition aux UV des cellules mutantes pour Rad57 en absence de Srs2 dans un contexte haploïde.
- (D) Fréquence de recombinants [Arg⁺] après exposition aux rayons UV dans un contexte diploïde.
- (E) Fréquence de recombinants [Arg⁺] après exposition aux rayons UV en absence de Srs2 dans un contexte diploïde.

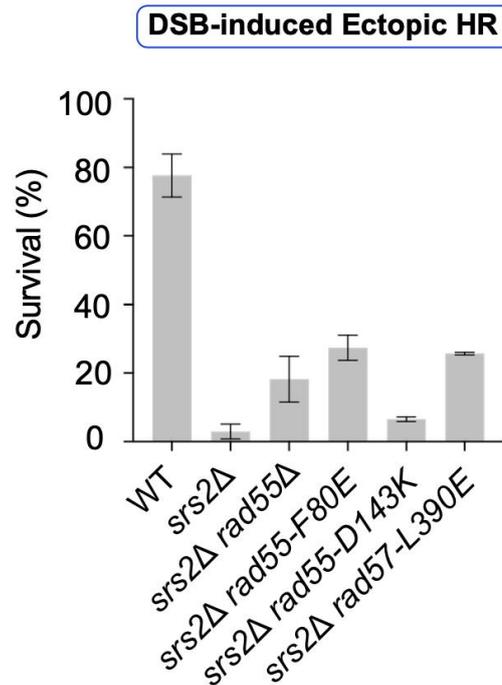
9) La toxicité associée aux intermédiaires post-synaptiques de la RH n'est pas supprimée par *rad55-D143K*

La réparation d'une CDB induite par HO entre deux copies ectopiques de *MAT* (**Figure R5A**) nécessite Srs2. En effet, dans ce système, le mutant *srs2Δ* ne parvient pas à résoudre correctement les intermédiaires de recombinaison et montre une grande sensibilité à la CDB (Ira et al., 2003 ; **Figure R12B**). Srs2 favoriserait la voie de recombinaison par SDSA (Ira et al., 2003; Dupaigne et al., 2008). En son absence, des intermédiaires post-synaptiques formés incorrectement après l'invasion de brin persisteraient et seraient toxiques pour les cellules. A ce jour, la nature de ces intermédiaires post-synaptiques est inconnue. Dans ce système, *rad55Δ* supprime partiellement la sensibilité de *srs2Δ* et environ 20% des cellules *rad55Δ srs2Δ* survivent à la CDB. Dans un mutant *rad55Δ*, la formation des filaments Rad51 est compromise (**Figure R6**) et leur efficacité pour la recherche d'homologie serait moindre. Cependant, les filaments Rad51 formés en absence de Rad55-Rad57 formeraient moins d'intermédiaires post-synaptiques toxiques (Elango et al., 2017). Les mutants *rad55-F80E* et *rad57-L390E* de perte d'interaction entre Rad55 et Rad57 montrent la même suppression de la sensibilité du mutant *srs2Δ* à la CDB (**Figure R12A**), confirmant ainsi que la nature des filaments Rad51 installés dans ces mutants est la même que celle dans les mutants nuls. Le mutant *rad55-D143K* de perte d'interaction partielle ne supprime pas la sensibilité de *srs2Δ* dans le système de recombinaison ectopique (**Figure R12A**). Ainsi, contrairement à ce que nous avons observé dans le système de réparation d'une CDB par SSA, les intermédiaires de recombinaison causant la toxicité sont toujours formés entre les deux copies ectopiques dans le mutant *rad55-D143K*. Les filaments Rad51 installés par le complexe mutant Rad55-D143K-Rad57 permettent une recherche d'homologie et des invasions de brin efficaces. Cependant, ces mêmes filaments pourraient être plus labiles et ainsi moins en mesure d'empêcher le recrutement des ADN-polymérase aux extrémités 3'OH des brèches simple-brin.

Au laboratoire, des mutants de *rad52* ont été isolés, toujours capables d'installer des filaments Rad51 mais qui suppriment la sensibilité du mutant *srs2Δ* dans le système SSA et très peu dans le système de recombinaison ectopique (Esta et al., 2013; E. Ma et al., 2018). Par ailleurs, ces mutants suppriment complètement la sensibilité du mutant *srs2Δ* au MMS (Esta et al., 2013; E. Ma et al., 2018). Nous avons donc également analysé la sensibilité au MMS du mutant *srs2Δ* en présence de l'allèle *rad55-D143K* dont les phénotypes associés sont similaires aux mutants *rad52*. La sensibilité du mutant *srs2Δ* au MMS n'est pas supprimée par les allèles nuls *rad55Δ* et *rad57Δ* (**Figure R12B**). Cette absence de suppression est probablement due à

l'inhibition de la RH dans ces mutants (Maloisel et al., 2023). De même, aucune suppression n'est visible en présence des allèles *rad55-F80E* et *rad57-L390E*. Une légère suppression est observée en présence de l'allèle *rad55-D143K*, indiquant qu'au contraire des mutants *rad52*, des filaments Rad51 toxiques sont toujours formés dans ce mutant, une conclusion similaire à celle obtenue après une irradiation aux UV (Figure R11B).

A



B

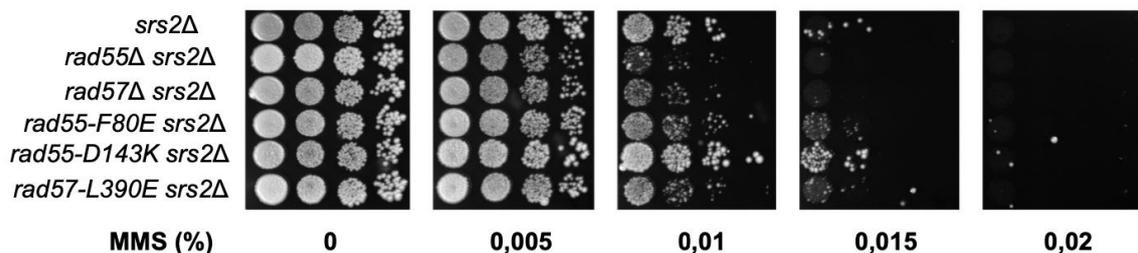


Figure R12. L'intégrité du complexe Rad55-Rad57 influe sur la formation de structures de recombinaison toxiques en absence de Srs2.

- (A) Survie cellulaire après induction d'une CDB par HO et réparable par conversion génique en absence de Srs2. Les données présentées correspondent à la moyenne d'au moins trois expériences indépendantes.
- (B) Survie cellulaire à des concentrations croissantes de MMS dans un contexte haploïde en absence de Srs2.

III. Les deux complexes de paralogues de Rad51, SHU et Rad55-Rad57, interagissent entre eux et facilitent la prise en charge des brèches simple-brin par la recombinaison homologue

1) Validation de l'interface entre Csm2 et Rad55 par la technique du double-hybride

Le modèle généré à l'aide d'AlphaFold2 propose une interaction entre la sous-unité Csm2 du complexe SHU et Rad55 (**Figure R1 ; Figure R13A**). Ce modèle est en accord avec des études précédentes en double-hybride démontrant une interaction directe entre Csm2 et Rad55 (S. Godin et al., 2013; X. Xu et al., 2013). De plus, une mutation a été identifiée dans Csm2, Csm2-F46A, entraînant la perte d'interaction entre Csm2 et Rad55 et non pas entre Csm2 et la sous-unité Psy3 de SHU (Gaines et al., 2015). D'après notre modèle, le résidu Phe46 de Csm2 fait face à la première petite hélice α à l'extrémité N-terminale de Rad55 (**Figure R13A**). Nous retrouvons la perte complète d'interaction entre Csm2 et Rad55 observée avec la protéine mutée Csm2-F46A dans notre système double-hybride (**Figure R13B**). Cette même interaction est également perdue dès lors que les 12 premiers acides aminés de Rad55 sont délétés (Rad55- Δ 12Nter ; **Figure R13B**). La protéine Rad55- Δ 12Nter est toujours capable d'interagir avec Rad57, indiquant un repliement correct de la protéine mutée (**Figure R4B**). Inversement, la mutation du résidu Phe80 de Rad55, Rad55-F80E, participant à l'interaction avec Rad57, n'entraîne pas de perte d'interaction avec Csm2. Ainsi, nous avons pu identifier un domaine de Rad55 interagissant spécifiquement avec Csm2. L'étude génétique et moléculaire du nouveau mutant *rad55- Δ 12Nter*, associé ou non avec l'allèle nul *csm2 Δ* , nous a permis de mieux comprendre l'importance de l'interaction entre les deux complexes de paralogues de Rad51 dans la formation des filaments Rad51.

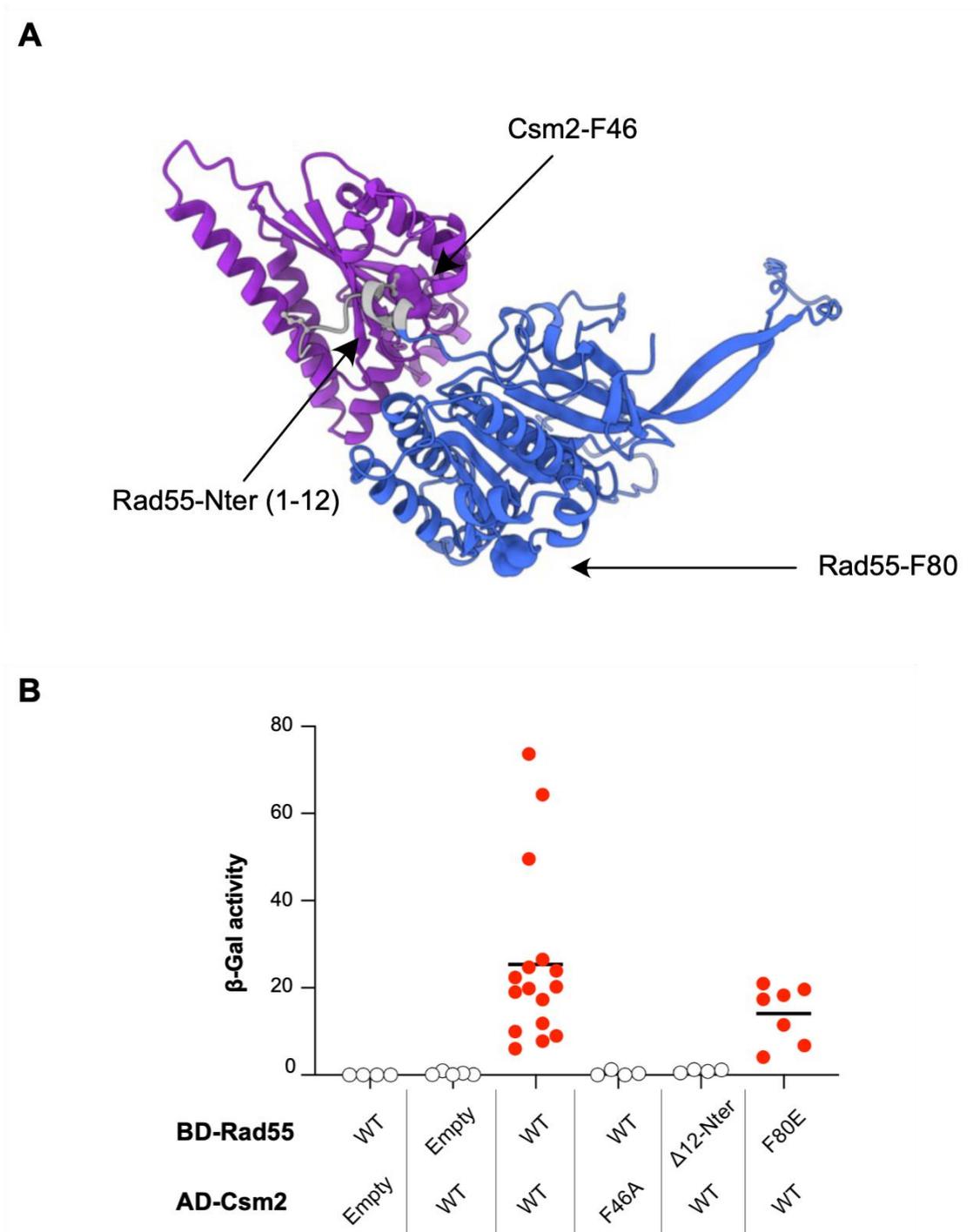


Figure R13. Modèle *in silico* de l'interaction Rad55-Csm2 généré à partir du logiciel AlphaFold2.
 (A) Représentation schématique de l'interaction entre Rad55 et Csm2. Le résidu Csm2-F46 testé précédemment est représenté sous forme de sphère. La région N-terminale de Rad55 (en gris) contacte directement le résidu F46 de Csm2. Le résidu F80 de Rad55 ne participe pas à l'interaction.
 (B) Activité β -gal des différents mutants d'interaction de Rad55 et Csm2. L'activité β -gal d'au moins quatre co-transformants indépendants est donnée pour chaque transformation désignée en abscisse par le nom des deux protéines testées. Les ronds blancs indiquent l'absence d'activité tandis que les ronds rouges indiquent une activité et donc une interaction entre les deux partenaires.

2) Le complexe SHU et son interaction avec Rad55-Rad57 ne sont pas essentiels pour la réparation des CDB mitotiques de l'ADN

Les premières études sur les mutants du complexe SHU ont montré une sensibilité spécifique au MMS et une résistance aux rayonnements γ (Shor et al., 2005). Bien que les études génétiques aient montré que SHU était impliqué dans la voie RH contrôlée par Rad52 et Rad51, les phénotypes des mutants *shu* suggèrent donc que le complexe SHU n'est pas impliqué dans la réparation des CDB dans les cellules végétatives. Le complexe pourrait être spécifiquement recruté sur des brèches simple-brin formées en arrière des fourches de réplication (Shor et al., 2005; Mankouri et al., 2007; Ball et al., 2009; Bernstein et al., 2011). Cette conclusion peut paraître surprenante dès lors qu'il est apparu que ce complexe était composé de paralogues de Rad51 et qu'il interagissait avec Rad55-Rad57 (Martín et al., 2006; She et al., 2012; Tao et al., 2012; X. Xu et al., 2013). De plus, une baisse des foyers Rad55-YFP après une exposition aux rayonnements γ (qui génèrent des CDB), est observée dans le mutant *csm2* Δ (S. Godin et al., 2013). De même, les foyers Srs2-YFP associés à une CDB induite par l'endonucléase I-SceI sont plus fréquents dans le mutant *shu1* (Bernstein et al., 2011). Les auteurs ont donc proposé que le complexe SHU permettait de contrebalancer l'activité de Srs2. Quoiqu'il en soit, à ce jour, le rôle du complexe SHU aux CDB n'est pas clairement défini.

Des expériences de double-hybride ont montré que Rad55-Rad57 constituait un « pont » entre le complexe SHU et le filament Rad51 (Gaines et al., 2015). La même étude a permis d'identifier la mutation de perte d'interaction Csm2-F46A et propose que les fonctions du complexe SHU sont toutes médiées par l'interaction avec Rad55-Rad57 (Gaines et al., 2015). Le modèle structural présenté en **Figure R1** est en accord avec les conclusions de Gaines et al., 2015. Par ailleurs, l'identification de l'interface entre Csm2 et Rad55 par AlphaFold2 et tests double-hybride, nous a permis de construire le nouvel allèle *rad55- Δ 12Nter* de perte spécifique d'interaction avec Csm2. Nous avons donc un nouvel outil pour différencier le rôle de Rad55-Rad57 d'une part, et d'autre part, celui du mégacomplexe SHU-Rad55-Rad57 (X. Xu et al., 2013). A l'aide de ce nouveau mutant et des systèmes de mesure de la RH dont nous disposons au laboratoire, nous avons pu revisiter le rôle de SHU dans la réparation des CDB.

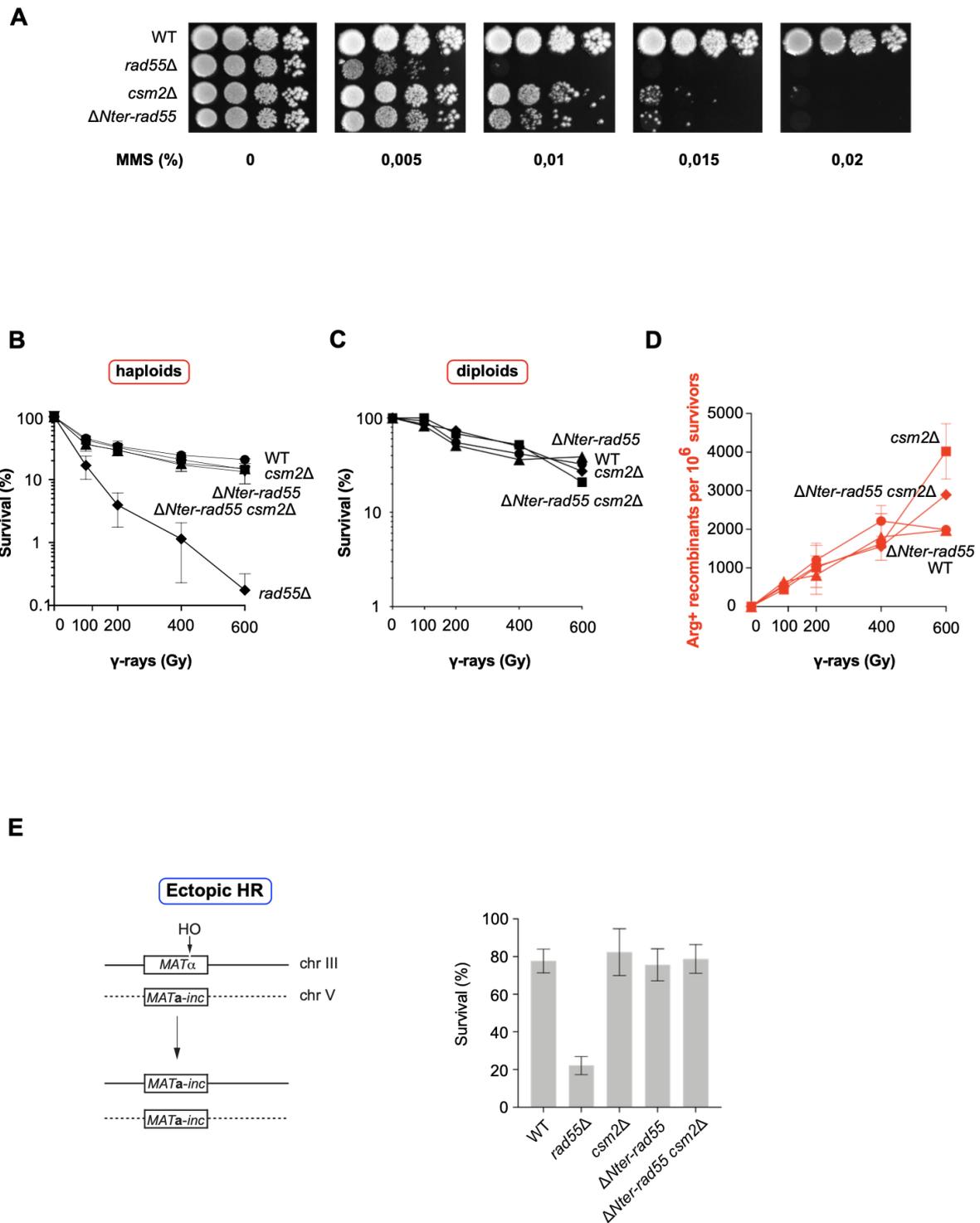


Figure R14. Le mégacomplexe n'est pas essentiel à la réparation des CDB par la voie de la RH dans les cellules végétatives.

- (A) Survie cellulaire à des concentrations croissantes en MMS dans un contexte haploïde. Les données présentées correspondent à la moyenne d'au moins trois expériences indépendantes.
- (B) Survie cellulaire après exposition aux rayonnements γ dans un contexte haploïde.
- (C) Survie cellulaire après exposition aux rayonnements γ dans un contexte diploïde.
- (D) Fréquence de recombinaison [Arg⁺] après exposition aux rayonnements γ dans un contexte diploïde.
- (E) Survie cellulaire après induction d'une CDB induite par HO et réparable par conversion génique.

Le mutant *rad55* Δ montre une très grande sensibilité au MMS (**Figure R14A**). Nous savons désormais que la formation du complexe Rad55-Rad57 est nécessaire pour la réparation des lésions à l'ADN induites par le MMS (**Figure R5A**). Nous confirmons que le mutant *csn2* Δ montre une sensibilité au MMS et que cette sensibilité est moins importante que celle du mutant *rad55* Δ (**Figure R14A**). De même, et en accord avec notre modèle structural, le mutant *rad55- Δ 12Nter* montre une sensibilité partielle semblable à celle du mutant *csn2* Δ . Ce résultat indique qu'une des fonctions requises de Rad55-Rad57 pour la résistance au MMS se fait au travers de son interaction avec le complexe SHU. Cependant, toutes les fonctions de Rad55-Rad57 ne sont pas dépendantes de cette interaction.

Le mutant *rad55* Δ montre une sensibilité aux rayonnements γ (**Figure R14B**). De manière intéressante, le mutant *rad55- Δ 12Nter* ne présente aucune sensibilité aux rayonnements γ (**Figure R14B**). Cette même résistance est observée pour le mutant *csn2* Δ ainsi que pour le double mutant *rad55- Δ 12Nter csn2* Δ , qu'ils soient à l'état haploïde ou bien à l'état diploïde (**Figure R14B et C**). Il est intéressant de noter que la sensibilité du mutant *rad55* Δ dépend d'une perte de protection contre Srs2 (**Figure R7**). Ainsi, la résistance aux rayonnements γ des mutants *rad55- Δ 12Nter* et *csn2* Δ indique que les filaments Rad51 sont toujours efficacement protégés dans ces mutants. Nous avons également étudié la recombinaison induite par les rayonnements γ dans des cellules diploïdes possédant deux hétéroallèles de *ARG4* (voir **Figure R8B**). Les fréquences de recombinants [Arg⁺] observées avec les mutants *rad55- Δ 12Nter* et *csn2* Δ sont identiques à celles observées avec la souche sauvage. La formation des filaments Rad51 ne semble donc pas être modifiée dans ces mutants. Nous avons confirmé ces observations dans notre système de réparation par recombinaison ectopique d'une CDB induite par l'endonucléase HO (**Figure R14E**). Tandis que le mutant *rad55* Δ est sensible à la CDB, les mutants *rad55- Δ 12Nter* et *csn2* Δ ainsi que le double mutant *rad55- Δ 12Nter csn2* Δ ne présentent aucune sensibilité.

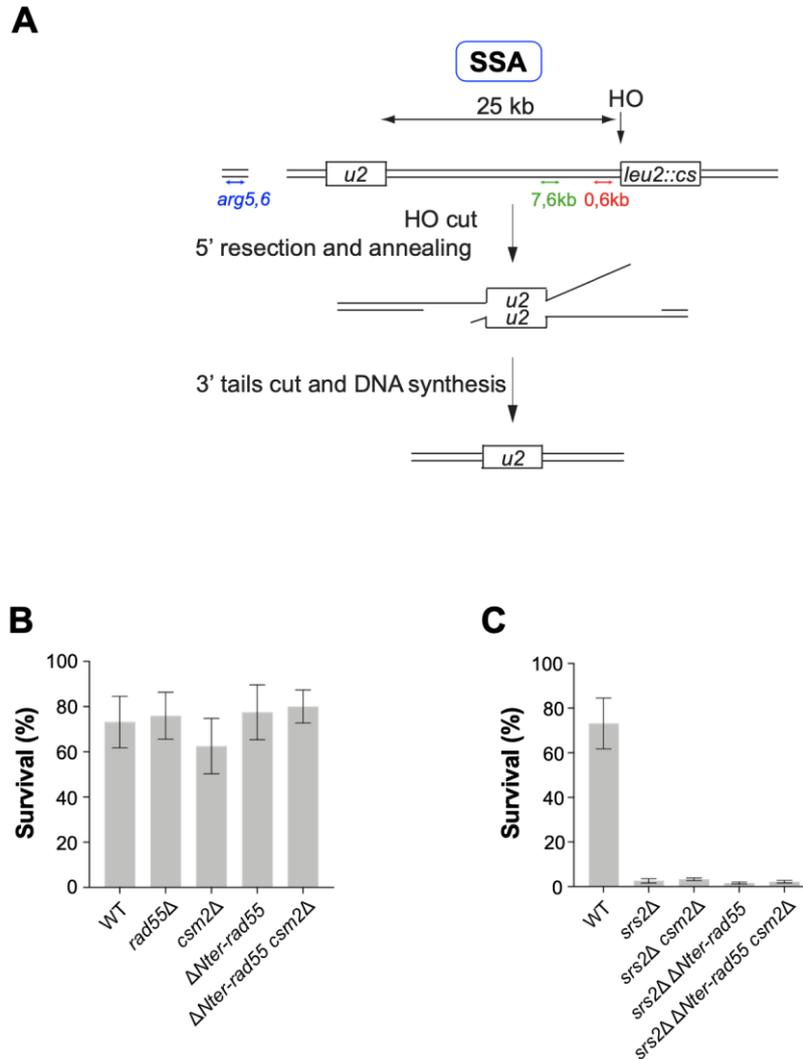


Figure R15. Le mégacomplexe n'est pas impliqué dans la formation de filaments Rad51 toxiques dans un système SSA.

- (A) Représentation schématique du système de CDB induite par HO et réparable uniquement par SSA.
 (B) Survie cellulaire après induction d'une CDB par HO et réparable par SSA. Les données présentées correspondent à la moyenne d'au moins trois expériences indépendantes.
 (C) Survie cellulaire après induction d'une CDB par HO et réparable par SSA en absence de Srs2.

Nous avons observé avec le mutant *rad55-D143K*, conduisant à une perte partielle d'interaction entre Rad55 et Rad57, qu'une légère altération dans l'assemblage du filament Rad51 permettait de supprimer la grande sensibilité du mutant *srs2Δ* à une CDB dans un système de réparation par SSA (**Figure R15A**). Ainsi, un rôle même partiel de SHU-Rad55-Rad57 dans l'assemblage du filament Rad51 pourrait être détecté dans notre système SSA. Aucun des mutants *rad55-Δ12Nter*, *csm2Δ* ou *rad55-Δ12Nter csm2Δ* n'est sensible à la CDB dans le système SSA (**Figure R15B**). Ce résultat était attendu puisque cette réparation nécessite Rad52 et ne dépend pas de Rad51 (Fishman-Lobell et al., 1992; Ivanov et al., 1996; Vaze et al., 2002). De manière plus significative, nous n'observons aucune suppression de la sensibilité de

srs2Δ dans les mutants détruisant le mégacomplexe SHU-Rad55-Rad57 (**Figure R15C**). La toxicité des filaments Rad51 dans le système SSA ne dépend donc pas d'une installation médiée par SHU-Rad55-Rad57 mais d'une installation médiée par Rad55-Rad57 uniquement.

Nous montrons donc que le complexe SHU n'est pas requis pour la réparation des CDB, qu'il n'est pas impliqué dans la protection contre Srs2 après une irradiation aux rayonnements γ et qu'il n'est pas impliqué dans la formation de filaments toxiques dans la voie SSA. Bien que les phénotypes observés ne permettent pas de conclure à un rôle de SHU dans la réparation des CDB mitotiques, il est cependant toujours possible que SHU soit recruté au niveau d'une CDB. Pour la suite de notre étude, nous avons construit dans la souche contenant le système SSA, les fusions *Shu1-FLAG* et *Shu2-FLAG* afin d'observer le recrutement potentiel du complexe SHU par ChIP à une CDB. La souche *Shu2-FLAG* présente une très légère sensibilité au MMS, tandis que la souche *Shu1-FLAG* est résistante comme la souche sauvage. Nous avons donc les outils nécessaires pour mesurer le recrutement de SHU. Si nous observons un recrutement de SHU, nous pourrions alors poser la question du rôle de Rad55-Rad57 dans ce recrutement et notamment dans le contexte du mutant *rad55-Δ12Nter*. Réciproquement, nous avons observé le recrutement de Rad55-FLAG dans notre système SSA. Nous pouvons donc désormais étudier ce recrutement en absence de SHU. Ces études participeront à mieux comprendre l'implication de SHU à une CDB. Elles permettront également de déterminer si SHU peut être recruté en absence de Rad55-Rad57, ce qui pourrait indiquer un ordre de fixation sur l'ADN, SHU puis Rad55-Rad57, ou bien si sont recrutés soit le mégacomplexe, soit Rad55-Rad57 seul.

3) La formation du mégacomplexe SHU-Rad55-Rad57 participe à la réparation post-réplivative des brèches simple-brin de l'ADN

Nos études montrent que le complexe SHU n'est pas requis pour la réparation des CDB mitotiques. Cependant, les mutants du complexe SHU sont sensibles au MMS et des études génétiques montrent l'implication de SHU dans la tolérance post-réplivative aux dommages à l'ADN (Ball et al., 2009; X. Xu et al., 2013). Notamment, l'allèle *psy3Δ* conduit à une interaction synergique avec l'allèle *rev3Δ* : le double mutant *psy3Δ rev3Δ* montre une plus grande sensibilité au MMS et aux UV que les simples mutants (X. Xu et al., 2013). Il est donc proposé que SHU et la polymérase translésionnelle Pol ζ agissent sur un même substrat, en l'occurrence, les brèches simple-brin formées à la suite de fourches de réplication bloquées par la présence de dommages à l'ADN.

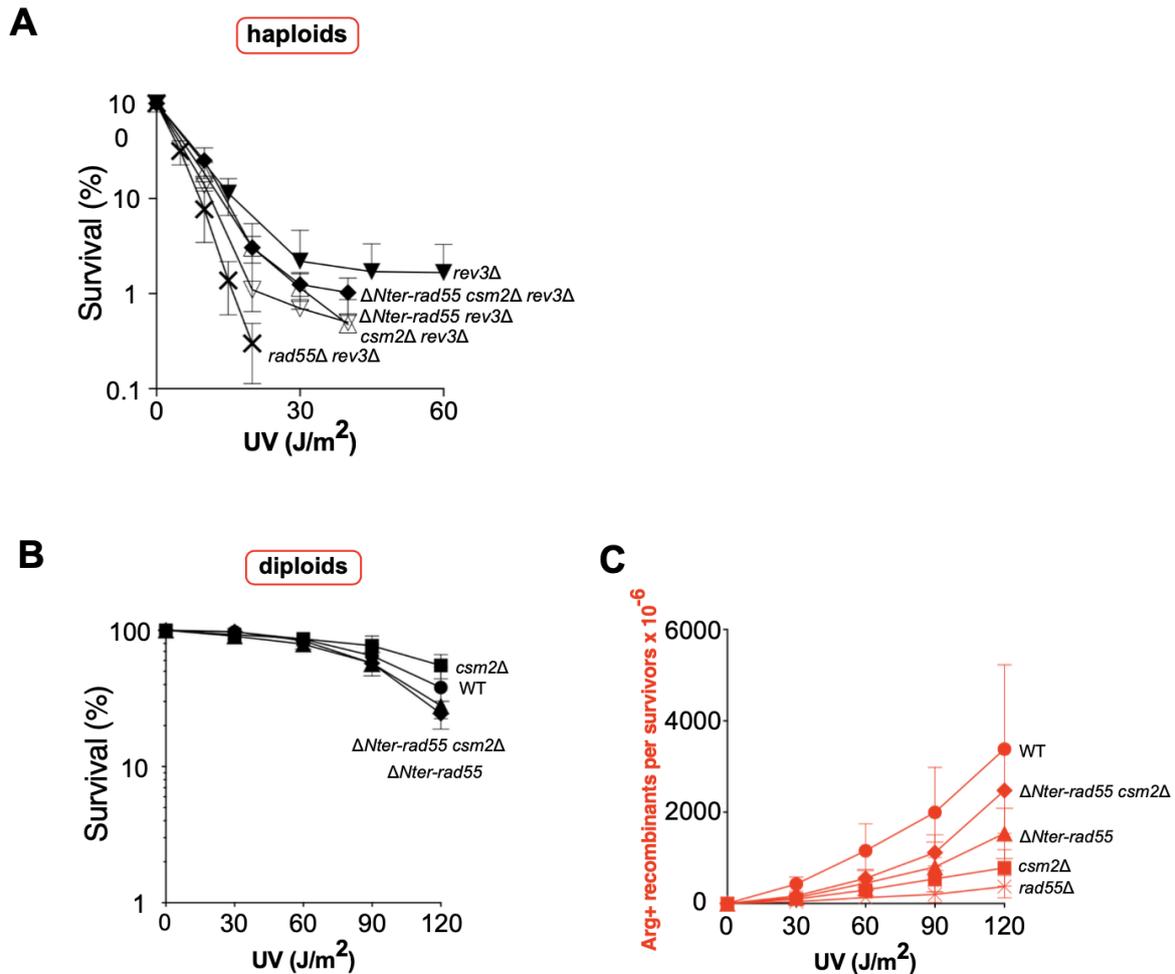


Figure R16. Le mégacomplexe favorise la réparation des brèches simple-brin post-répliquatives par la RH.

- (A) Survie cellulaire après exposition aux rayons UV en absence de Rev3 dans un contexte haploïde. Les données présentées correspondent à la moyenne d'au moins trois expériences indépendantes.
- (B) Survie cellulaire après exposition aux rayons UV dans un contexte diploïde.
- (C) Fréquence de recombinants [Arg⁺] après exposition aux rayons UV dans un contexte diploïde.

Une étude récente au laboratoire a montré le rôle essentiel de Rad55-Rad57 dans la prise en charge des brèches simple-brin de l'ADN induites après UV (Maloisel et al., 2023). De plus, l'interaction synergique entre *rad55Δ* et *rev3Δ* concernant la sensibilité aux UV est bien plus forte que l'interaction synergique en *psy3Δ* et *rev3Δ* (X. Xu et al., 2013; Maloisel et al., 2023). Nous pouvons donc proposer que la formation du mégacomplexe SHU-Rad55-Rad57 est nécessaire pour la réparation des brèches simple-brin mais que sa contribution soit moins importante que la présence de Rad55-Rad57.

Pour tester notre hypothèse, dans un premier temps, nous avons étudié les interactions génétiques entre *rev3Δ* et les allèles *rad55-Δ12Nter* et *csm2Δ*. Nous retrouvons bien l'effet négatif de la combinaison *csm2Δ rev3Δ* sur la résistance des cellules aux UV déjà décrit pour

la combinaison *psy3Δ rev3Δ* (**Figure R16A** ; Xu et al., 2013). Cependant, l'effet est modéré et bien moins fort que celui observé avec *rad55Δ* (**Figure R16A**). Le même effet partiel est retrouvé avec l'allèle *rad55-Δ12Nter* ainsi qu'avec la double combinaison *csm2Δ rad55-Δ12Nter* (**Figure R16A**). Ainsi, bien que SHU et Rad55-Rad57 soit présents dans le mutant *rad55-Δ12Nter*, la perte d'interaction entre les deux complexes entraîne une sensibilité accrue aux UV du mutant *rev3Δ*. Cette sensibilité est la même qu'un mutant ayant perdu le complexe SHU mais bien moindre qu'un mutant ne possédant plus Rad55-Rad57. Ces observations suggèrent que moins de brèches simple-brin sont réparées dans la voie RH dans les mutants du mégacomplexe. En accord avec cette hypothèse, bien que les mutants *csm2Δ* et *rad55-Δ12Nter* ne montrent aucune sensibilité aux UV, les fréquences de recombinants [Arg⁺] entre les deux hétéroallèles de *ARG4* sont diminuées dans ces mutants (**Figure R16B et C**). Les mutants du mégacomplexe montrent une assez grande variabilité d'une expérience à une autre pour des raisons qui nous restent incompréhensibles. Les fréquences sont toutefois bien supérieures à celles observées dans le mutant *rad55Δ*, indiquant une nouvelle fois que l'absence du mégacomplexe est associée à un défaut en RH moins important que le défaut dû à l'absence de Rad55-Rad57.

Pour suivre moléculairement la réparation des brèches simple-brin post-répliquatives en absence du mégacomplexe, nous avons analysé l'apparition de foyers « RPA » par microscopie à fluorescence à l'aide de la construction Rfa1-YFP dans une souche *rad55-Δ12Nter* (voir Matériels et Méthodes ; **Figure R17A**). Les cellules sauvages arrêtées en G1, irradiées aux UV (60 J/m²) puis relâchées en phase S montrent une très forte augmentation des foyers RPA comparées aux cellules non-irradiées (**Figure R17B et C**). Ces foyers disparaissent rapidement dans une souche sauvage (**Figure R17C**). Nous observons que les fréquences de cellules non-irradiées montrant des foyers RPA sont identiques entre la souche mutante *rad55-Δ12Nter* et la souche sauvage (**Figure R17D**). Ces fréquences sont plus importantes en absence de Rad55 (*rad55Δ*) mais également en absence du complexe (*rad55-F80E*). Cette observation suggère que le défaut réplcatif entraînant une augmentation des foyers RPA observé dans les mutants *rad55* n'est pas associé à une perte d'interaction avec le complexe SHU. Nous confirmons ce résultat en absence de Polζ : alors qu'au moins la moitié des cellules *rad55Δ rev3Δ* montre un foyer RPA (**Figure R9H**), les cellules non-irradiées *rad55-Δ12Nter rev3Δ* ne montre aucune augmentation significative (**Figure R17H**). Après une irradiation aux UV, le mutant *rad55-Δ12Nter* montre la même forte fréquence de foyers RPA que la souche sauvage. Environ deux tiers des cellules montrent au moins trois foyers RPA (**Figure R17A**). Ces foyers disparaissent progressivement des cellules sauvages lors des quatre heures de nos échantillonnages. De

manière intéressante, les foyers persistent légèrement dans les cellules mutantes *rad55-12ΔNter* (Figure R17E). La même légère persistance est observée dans les cellules *rev3Δ* (Figure R17I). Ces expériences nécessitent d'être répétées. De plus, nous devons également étudier les foyers RPA dans une souche *csm2Δ*. Néanmoins, ces premières observations suggèrent une participation du mégacomplexe SHU-Rad55-Rad57 dans la prise en charge, au cours de la phase S, des lésions induites aux UV. Cependant, ce complexe ne joue pas un rôle essentiel puisque des brèches simple-brin semblent toujours être résolues par la RH dans le mutant *rad55-12ΔNter*.

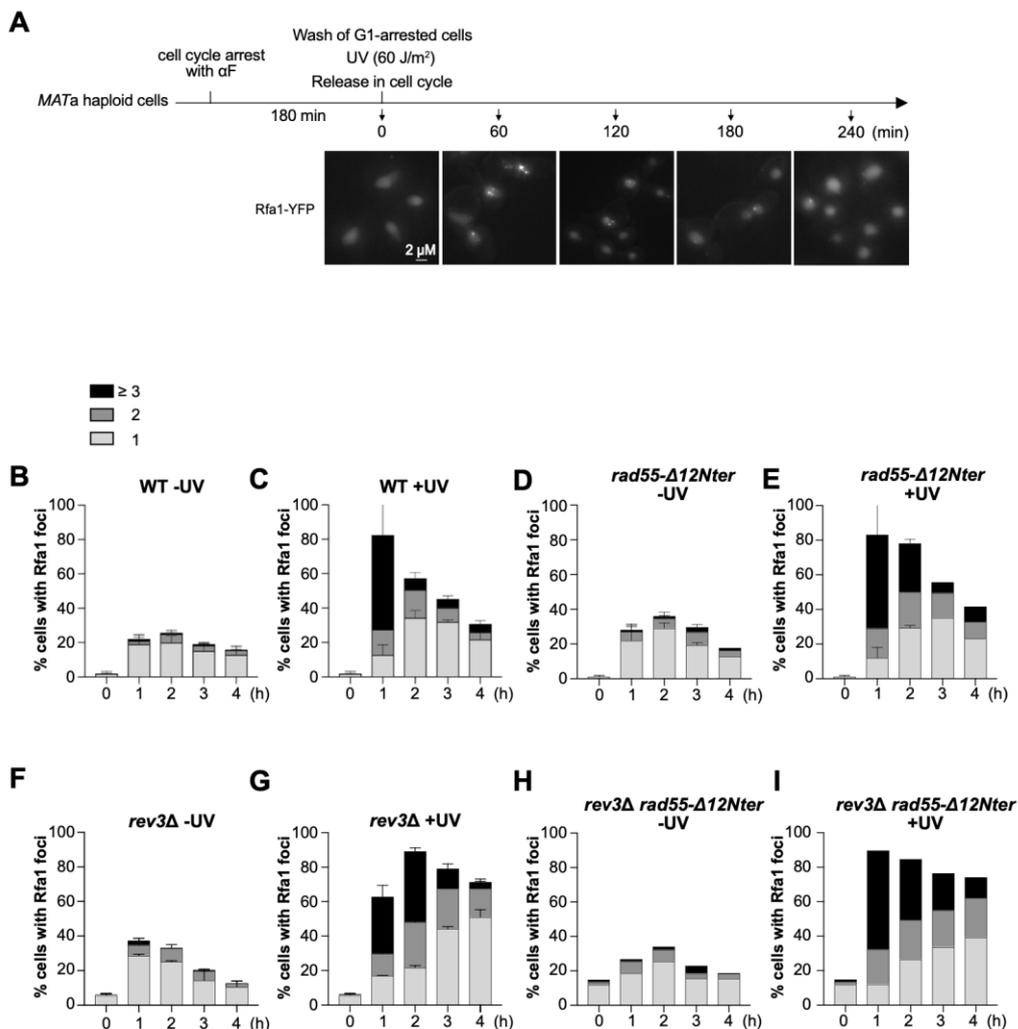


Figure R17. La résolution des foyers RPA induits par les UV est légèrement retardée dans les mutants du mégacomplexe.

(A) Schéma expérimental pour l'analyse par microscopie des foyers RPA. Les cellules arrêtées en phase G1 avec le facteur α (αF) ont été exposées aux UV avant d'être relarguées dans le cycle cellulaire. Des échantillons ont été prélevés pour être analysés toutes les heures pendant quatre heures. Des images représentatives des cellules Rfa1-YFP sont présentées. Les barres d'échelle correspondent à 2 μm .

(B-E) Quantification des foyers Rfa1-YFP détectés par microscopie à fluorescence dans les cellules sauvages et mutantes pour Rad55 en présence ou (F-I) en absence de Rev3 après exposition ou non aux UV. Les barres d'erreur indiquent les écarts types de trois expériences indépendantes.

4) Le mégacomplexe SHU-Rad55-Rad57 participe à la formation d'intermédiaires toxiques lors de la RH induites aux UV

Le rôle du mégacomplexe n'étant pas essentiel à la réparation des brèches simple-brin induites par les UV et par le MMS, nous avons également exploré la formation d'intermédiaires toxiques de recombinaison en absence de ce complexe. La toxicité des filaments Rad51 est observée dans un contexte *srs2Δ* (voir Introduction, section II.B.4.d). Le mutant *srs2Δ* montre une sensibilité aux UV qui est supprimée par *rad51Δ* mais aussi par les allèles mutants de *RAD55* et *RAD57*. La RH n'étant pas essentielle pour la réparation des dommages à l'ADN induits par les UV, la suppression des défauts de *srs2Δ* par les mutants de la RH implique que les UV ne conduisent que rarement à des CDB et par conséquent, que les intermédiaires toxiques de recombinaison induits par les UV sont très probablement issus de brèches simple-brin. Le mégacomplexe pourrait jouer un rôle important dans la formation de ces intermédiaires toxiques. Les cellules *srs2Δ* diploïdes sont extrêmement sensibles aux UV (**Figure R18A**). Cette sensibilité est très largement supprimée par *rad55Δ*. La sensibilité de *srs2Δ* est partiellement supprimée par *csm2Δ* et par *rad55-Δ12Nter*, indiquant de fait, la participation du mégacomplexe dans la formation de filaments Rad51 toxiques induits aux UV. L'effet étant partiel néanmoins, des filaments toxiques sont toujours formés en absence de SHU et en absence du mégacomplexe. Ainsi, les cellules *csm2Δ srs2Δ* et *rad55-Δ12Nter srs2Δ* restent environ dix fois plus sensibles que les cellules *rad55Δ srs2Δ* (**Figure R18A**). De manière intéressante, nous observons que les fréquences de recombinants hétéroalléliques [Arg⁺] induits aux UV sont très élevées dans le mutant *srs2Δ* et que ces fréquences diminuent très fortement dans les double mutants *rad55-Δ12Nter srs2Δ* et *csm2Δ srs2Δ* (**Figure R18B**). Nous proposons donc que dans ces mutants, une partie plus importante des lésions simple-brin de l'ADN soit prises en charge par les polymérases translésionnelles. Nous remarquons cependant encore une fois un phénotype partiel comparé au phénotype du mutant *rad55Δ srs2Δ*.

Le mutant *srs2Δ* montre une sensibilité au MMS un peu plus prononcée que celles des mutants *shu* (**Figure R18A**). Des travaux au laboratoire ont décrit des allèles de *RAD52* capables de supprimer complètement la sensibilité au MMS du mutant *srs2Δ* (Esta et al., 2013; E. Ma et al., 2018). L'analyse de ces mutants a permis de montrer qu'ils affectaient une fonction de protection des filaments Rad51 tenue par Rad52. Cette sensibilité n'est supprimée ni par *csm2Δ* ni par *rad55-Δ12Nter* (**Figure R18A**). Étonnamment donc, les filaments Rad51 gardent leur potentielle toxicité en absence du mégacomplexe. De plus, les mutants du mégacomplexe ne supprimant pas la sensibilité du mutant *srs2Δ* au MMS, nous n'avons donc pas d'indication

d'un rôle protecteur de SHU-Rad55-Rad57 contre Srs2, une conclusion similaire à celle que nous avons obtenue après une irradiation aux rayonnements γ .

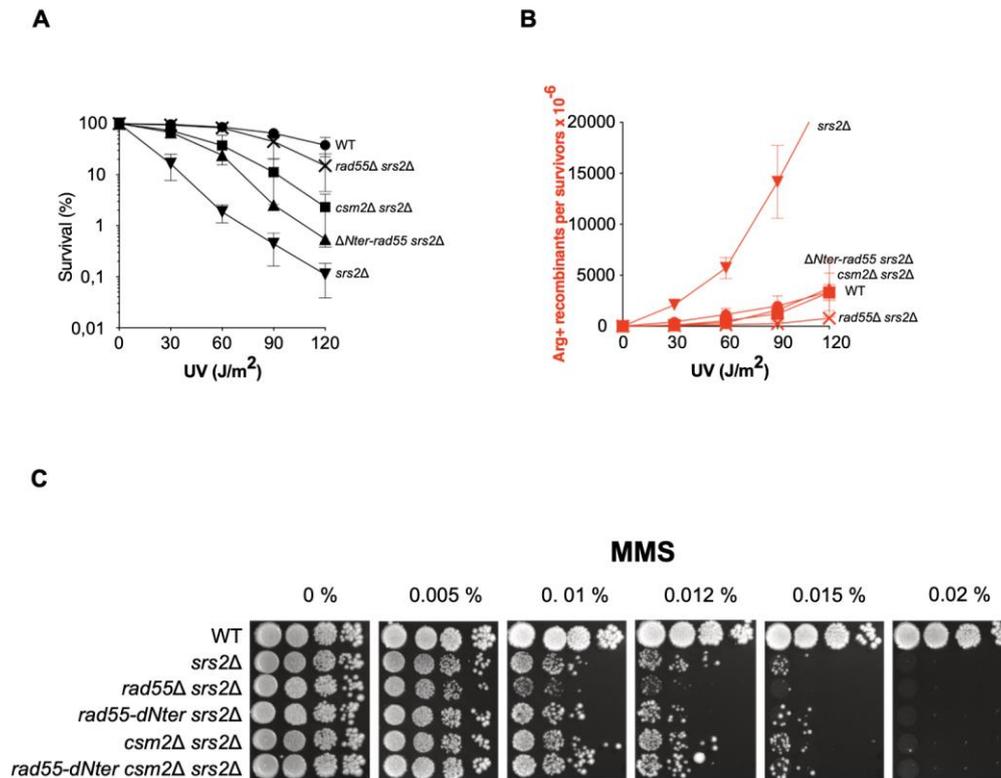


Figure R18. Le mégacomplexe est impliqué dans la formation de filaments Rad51 toxiques en absence de Srs2 mais dans une moindre mesure que le complexe Rad55-Rad57.

- (A) Survie cellulaire après exposition aux rayons UV en absence de Srs2 dans un contexte haploïde. Les données présentées correspondent à la moyenne d'au moins trois expériences indépendantes.
- (B) Fréquence de recombinants [Arg⁺] après exposition aux rayons UV en absence de Srs2 dans un contexte diploïde.
- (C) Survie cellulaire à des concentrations croissantes en MMS dans un contexte haploïde.

IV. L'interaction entre Rad55-Rad57 et le motif FVTA de Rad51 participe en collaboration avec Rad52 à la protection des filaments Rad51 contre Srs2

1) Validation de l'interface entre Rad57 et Rad51 par la technique du double-hybride

Le modèle généré à l'aide d'AlphaFold2 indique que les cœurs conservés de Rad55 et Rad57 sont largement impliqués dans la formation de l'hétérodimère. Il indique également que l'interface disponible de Rad55 interagit avec Csm2. Nos analyses par double-hybride et nos analyses génétiques corroborent le modèle. De plus, la perte d'interaction entre Csm2 et Rad55,

induite par la mutation Rad55- Δ 12Nter, ne conduit pas à la perte d'interaction entre Rad55 et Rad51 observée en double-hybride (**Figure R13B**). Le modèle prédit ainsi que le complexe Rad55-Rad57 interagit avec la recombinase Rad51 sur la seule interface disponible portée par Rad57 (**Figure R1**). Le modèle prédit donc que Rad55-Rad57 n'interagit qu'à une extrémité du filament Rad51. Le filament étant orienté selon sa fixation à l'ADNsb, l'extrémité du filament en interaction avec Rad57 serait l'extrémité 5'.

Les expériences de double-hybride publiées jusqu'à présent chez *S. cerevisiae* ont montré une interaction entre Rad55 et Rad51 et non pas entre Rad57 et Rad51 (Hays et al., 1995; Krejci et al., 2001). Cependant, une interaction entre Rad57 de *S. pombe* (Rph57 ; Tsutsui et al., 2000) et Rad51 a bien été observée (Tsutsui et al., 2001). Il était donc possible que l'interaction entre Rad55 et Rad51 observée chez *S. cerevisiae* soit indirecte et médiée par Rad57. Nous avons testé cette hypothèse avec notre système double-hybride. Nous observons l'interaction lorsque Rad51 est porté par le plasmide pACT2-Gal4-AD et Rad55 par le plasmide pBTM116-lexA-BD (voir Matériels et Méthodes) et non pas dans le sens inverse. Malheureusement, pour une raison mal comprise, Rad51 est toxique pour les cellules lorsqu'il est porté par le plasmide multicopie pACT2. Cela se traduit par une très faible efficacité de transformation et une grande variabilité dans la croissance des colonies et dans l'analyse de l'expression de la β -galactosidase d'un transformant à l'autre. Cette toxicité n'est pas levée dans une souche *rad52* Δ , suggérant que la toxicité ne provient pas d'un nucléofilament Rad51 mais plutôt d'une agrégation de la protéine. Pour diminuer la toxicité, nous avons alors utilisé un mutant de Rad51 affaiblissant l'interaction entre deux monomères de Rad51 mais à l'opposé de l'interface en interaction avec Rad57 prédite par le modèle. Effectivement, en utilisant la protéine mutée Rad51-E221K pour nos tests double-hybride, nous nous sommes affranchis de la toxicité de Rad51 sur pACT2 et nous observons toujours l'interaction entre Rad55 et Rad51 (**Figure R19A et B-colonne 4**). Dans ce système, nous avons observé une perte complète d'interaction entre Rad55 et Rad51 lorsque la souche transformée était délétée pour *RAD57* (**Figure R19B-colonne 6**), indiquant que l'interaction observée entre Rad55 et Rad51 nécessite la présence de Rad57. Nous avons également observé que l'interaction entre Rad55 et Rad51 est abolie avec la protéine Rad55-F80E qui n'interagit plus avec Rad57. Plus significatif encore, l'interaction entre Rad55 et Rad51 est perdue dans une souche porteuse de l'allèle *rad57-L390E* qui code pour une protéine Rad57 n'interagissant plus avec Rad55 (**Figure R19B-colonnes 7 et 8**). Les données obtenues en double-hybride sont donc en accord avec le modèle proposant que Rad55-Rad57 interagisse avec Rad51 *via* la sous-unité Rad57 ; nous avons donc testé des

mutations de *RAD57* susceptibles de perdre l'interaction entre Rad57 et Rad51 que nous révélons par l'interaction indirecte entre Rad55 et Rad51.

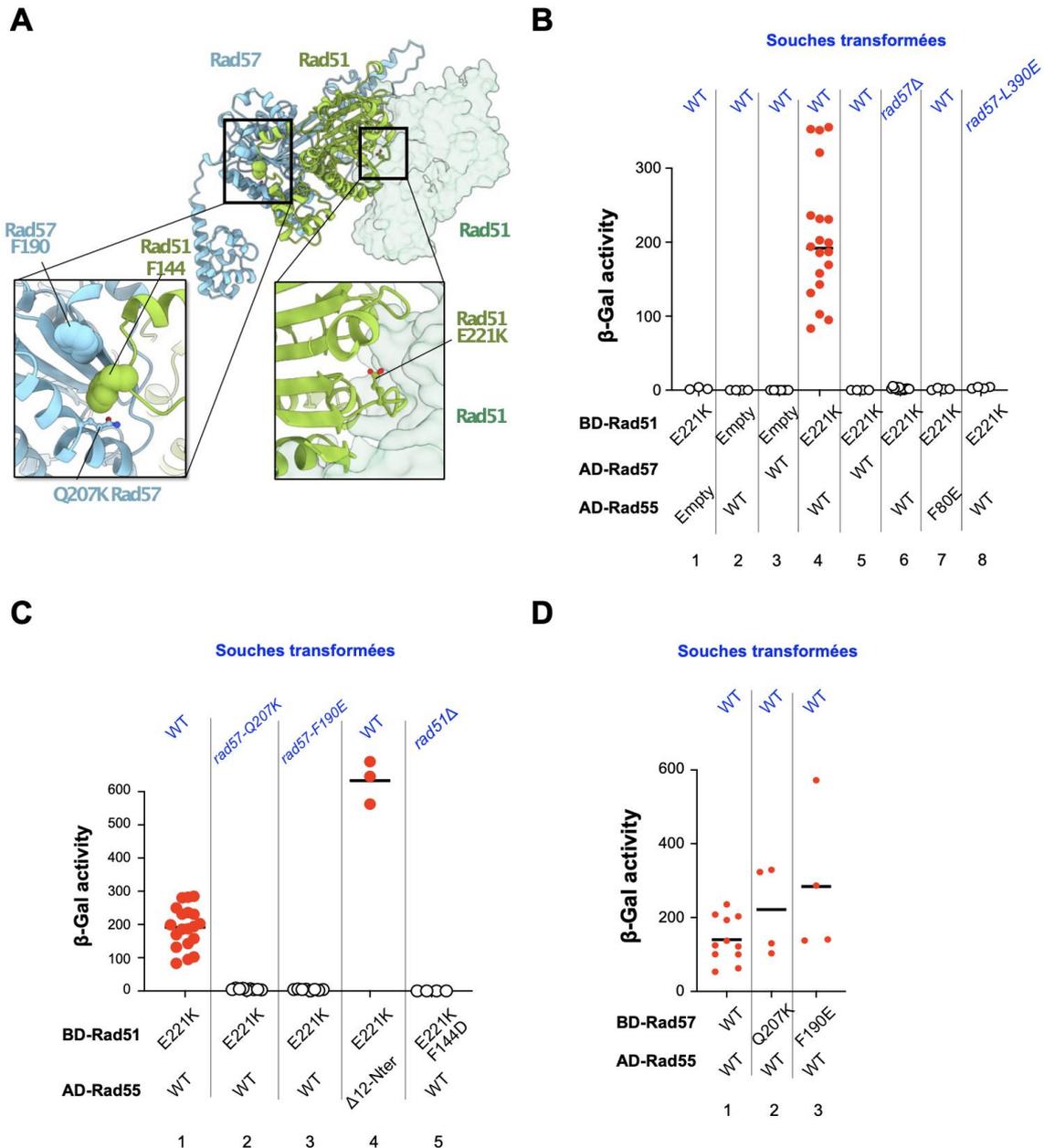


Figure R19. Impact des mutations de Rad55 et Rad57 sur l'interaction avec Rad51.

- (A) Représentation schématique du complexe formé de Rad57 et Rad51. Les résidus prédits comme étant impliqués dans l'interaction sont représentés dans l'encadré de gauche, sous forme de sphères (Rad57-F190 et Rad51-F144) ou de bâtons (Rad57-Q207). L'encadré de droite représente le résidu Rad51-E221 impliqué dans la polymérisation du filament Rad51.
- (B) Activité β -gal des interactions de Rad55 ou Rad57 avec Rad51, mesurée dans différents contextes génétiques (en bleu, au-dessus du graphique). L'activité β -gal d'au moins quatre co-transformants indépendants est donnée pour chaque transformation désignée en abscisse par le nom des deux protéines testées. Les ronds blancs indiquent l'absence d'activité tandis que les ronds rouges indiquent une activité et donc une interaction entre les deux partenaires.
- (C) Activité β -gal des différents mutants ponctuels d'interaction de Rad55 avec Rad51 dans différents contextes génétiques.
- (D) Activité β -gal des différents mutants ponctuels de Rad57 en interaction avec Rad55.

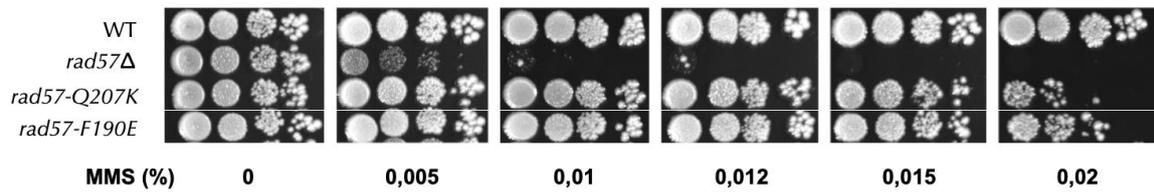
De manière très intéressante, le modèle propose une poche à la surface de Rad57 qui accueillerait le motif F₁₄₄VTA de Rad51. Ce même motif est impliqué dans l'interaction entre deux monomères de Rad51 (Conway et al., 2004; Shin et al., 2003 ; **Figure R19A**). Le modèle montre que les résidus de Rad57 Gln207 et Phe190 entourent la Phe144 de Rad51. Nous avons donc décidé de muter ces deux résidus dans notre souche utilisée pour le double-hybride. Aussi bien dans la souche *rad57-Q207K* que dans la souche *rad57-F190E*, le signal double-hybride entre Rad55 et Rad51 est perdu (**Figure R19C-colonnes 2 et 3**). Cependant, les protéines mutantes Rad57-Q207K et Rad57-F190E interagissent toujours avec Rad55 (**Figure R19D-colonnes 2 et 3**), indiquant de fait, que le complexe Rad55-Rad57 est toujours formé avec ces protéines. La protéine mutante Rad55- Δ 12Nter interagit toujours avec Rad57 et perd son interaction avec Csm2 (**Figure R13B**). La surface de Rad55 impliquée dans l'interaction avec Csm2 n'est pas en interaction avec Rad51 dans notre modèle. En accord avec le modèle, Rad55- Δ 12Nter interagit toujours avec Rad51 (**Figure R19C-colonne 4**). Enfin, nous avons testé le résidu Phe144 de Rad51. Le test double-hybride a été réalisé dans une souche *rad51* Δ pour s'affranchir complètement des interactions avec Rad51 endogène. L'interaction entre Rad55 et Rad51 est perdue avec la protéine mutante Rad51-F144D (**Figure R19C-colonne 5**). Ainsi, l'ensemble des résultats obtenus à l'aide de nos tests double-hybride implique que le complexe Rad55-Rad57 interagit avec Rad51 au travers de la sous-unité Rad57. Nous avons donc pour la première fois des mutants de paralogues de Rad51 défectueux pour leur interaction avec Rad51.

2) Les CDB sont efficacement réparées dans le mutant *rad57-Q207K* de perte d'interaction entre le complexe Rad55-Rad57 et Rad51

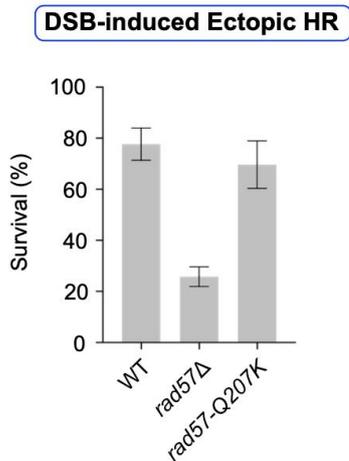
Le mutant haploïde *rad57* Δ montrent une grande sensibilité au MMS. Le complexe Rad55-Rad57 étant requis pour l'installation du filament Rad51 sur l'ADNsb, un mutant du complexe n'interagissant plus avec Rad51 pourrait présenter le même phénotype que les mutants nuls. Étonnamment, les mutants *rad57-Q207K* et *rad57-F190E* ne présentent qu'une très faible sensibilité au MMS (**Figure R20A**). Pour confirmer ce résultat, nous avons étudié plus spécifiquement le mutant *rad57-Q207K*. Ce mutant ne présente aucun défaut de réparation d'une CDB par recombinaison ectopique (**Figure R20B**). Nous observons que ce mutant présente une sensibilité modérée aux rayonnements γ (**Figure R20C**). Cette sensibilité est bien moins forte que celle du mutant nul. Ce résultat indique cependant qu'un défaut existe dans ce mutant. Nous avons étudié le recrutement de Rad51 au niveau d'une CDB par ChIP dans notre

système SSA et nous n'avons observé aucun défaut dans le mutant *rad57-Q207K* (Figure R20D).

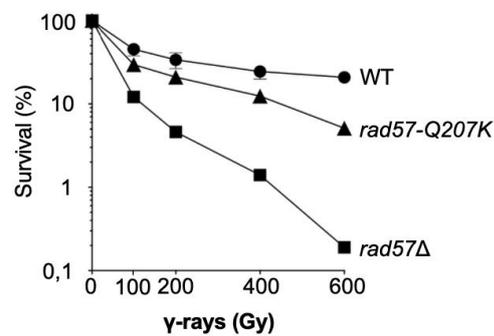
A



B



C



D

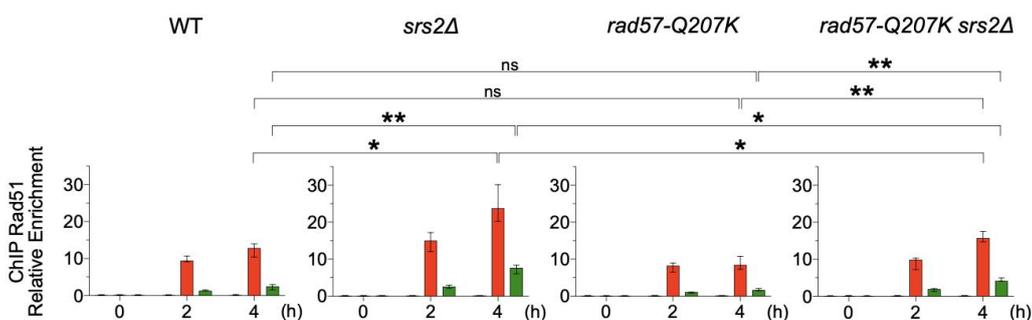


Figure R20. L'interaction entre Rad55-Rad57 et Rad51 n'est pas essentielle à la réparation des CDB.

- (A) Survies cellulaires à des concentrations croissantes de MMS dans un contexte haploïde. Les données présentées correspondent à la moyenne d'au moins trois expériences indépendantes.
 (B) Viabilité des cellules après induction d'une CDB par HO et réparable par conversion génique.
 (C) Survies cellulaires après exposition aux rayonnements γ dans un contexte haploïde.
 (D) Mesure de l'enrichissement relatif de Rad51 par ChIP après induction d'une CDB par HO.

Le modèle généré à l'aide d'AlphaFold2, le motif FVTA de Rad51 accommodable dans une poche sur l'interface disponible de Rad57 et nos résultats de double-hybride suggèrent que

le résidu Gln207 de Rad57 est bien en interaction avec Rad51. L'absence de phénotypes forts associés à *rad57-Q207K* pourrait suggérer que le complexe Rad55-Rad57 interagisse toujours avec Rad51. Pour continuer l'analyse de l'interaction, nous avons effectué des expériences de co-immunoprécipitation. Nous avons utilisé les peptides FLAG et MYC liés aux extrémités C-terminales soit de Rad55 soit de Rad57 d'une part, et des anticorps anti-Rad51, d'autre part. Malheureusement, aucune interaction n'a pu être détectée dans nos conditions. Cette même difficulté à observer l'interaction entre Rad55-Rad57 et Rad51 par co-immunoprécipitation a déjà été reportée (Sung, 1997b). En revanche, cette interaction est clairement observée dans des expériences de GST-pulldown avec les protéines purifiées (J. Liu et al., 2011). C'est pourquoi, la purification de Rad55-Rad57 est en cours au laboratoire en collaboration avec la plateforme de biochimie de l'institut.

3) La protection des filaments Rad51 contre Srs2 est compromise dans le mutant *rad57-Q207K*

Au laboratoire, un mutant de *RAD52* conduit à la perte d'interaction entre Rad52 et Rad51 (E. Ma et al., 2018). Étonnamment, ce mutant *rad52-Y376A* montre des phénotypes modérés comparés aux phénotypes du mutant *rad52Δ*. La recombinaison ectopique induite par une CDB n'est pas affectée dans ce mutant (Ma et al., 2018 ; **Figure R21A**). De plus, il montre une sensibilité partielle aux rayonnements γ ainsi qu'au MMS (Ma et al., 2018 ; **Figure R21B et C**). De manière très intéressante, ces sensibilités dépendent de l'activité de Srs2 puisqu'elles sont très fortement supprimées dans le contexte *srs2Δ* (E. Ma et al., 2018). Autrement dit, ces expériences génétiques montrent que les filaments Rad51 sont efficacement installés dans le mutant *rad52-Y376A* dès lors que Srs2 est absente. Les expériences moléculaires, biochimiques et en microscopie électronique, ont confirmé que Rad52 restait associée aux filaments Rad51 qu'elle a contribué à installer et qu'elle les protégeait contre Srs2 (E. Ma et al., 2018). Nous avons donc évalué les effets de l'allèle *rad57-Q207K* dans un contexte *rad52-Y376A* dans lequel les filaments Rad51 étaient moins bien protégés. Le double mutant *rad57-Q207K rad52-Y376A* répare toujours efficacement les CDB induites par HO dans notre système de recombinaison ectopique (**Figure R21A**). Il montre cependant une sensibilité légèrement accrue en comparaison des sensibilités des simples mutants. En revanche, le double mutant *rad57-Q207K rad52-Y376A* montre une extrême sensibilité aux rayonnements γ et au MMS, démontrant ainsi un effet synergique très fort entre les deux allèles (**Figure R21B et C**). L'observation d'un effet très fort associé à la mutation Rad57-Q207K conforte notre modèle

d'interaction entre Rad57 et Rad51. Par ailleurs, nous en concluons que les défauts associés au complexe Rad55-Rad57-Q207K sont compensés par Rad52 : les effets de Rad57-Q207K ne sont révélés que dans un contexte *rad52* mutant. Ce résultat n'est pas anodin car il démontre pour la première fois une collaboration entre Rad55-Rad57 et Rad52 *in vivo*. Il était donc important de déterminer si cette collaboration concernait la protection contre Srs2. Nous observons en effet, une très forte suppression de la sensibilité au MMS et aux rayonnements γ du double mutant *rad57-Q207K rad52-Y376A* dans un contexte *srs2* Δ (**Figure R21B et C**). Ainsi, l'interaction entre Rad55-Rad57 et Rad51 participe à mieux protéger les filaments contre Srs2. Cependant, la suppression de la sensibilité aux rayonnements γ du mutant *rad57-Q207K rad52-Y376A* par *srs2* Δ n'étant pas complète (**Figure R21C**), nous proposons que l'installation du filament Rad51 par Rad55-Rad57-Q207K et par Rad52-Y376A est partiellement défectueuse.

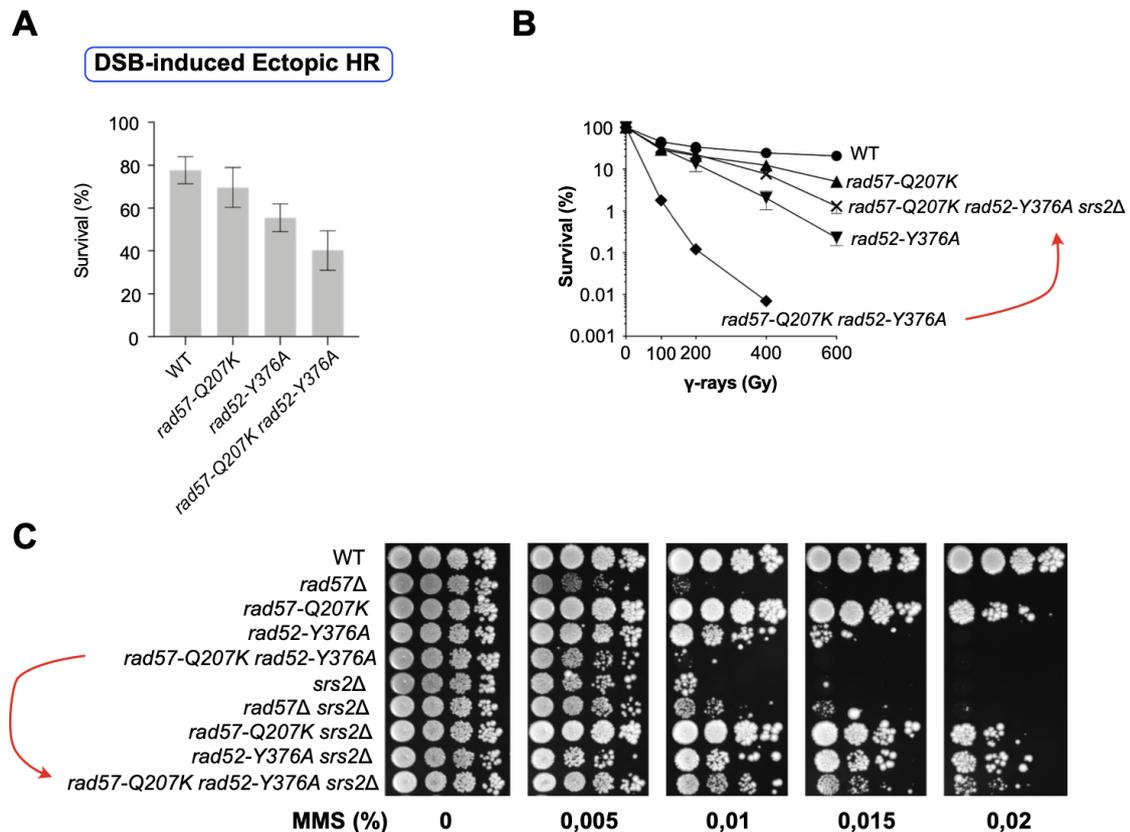


Figure R21. Rad55-Rad57 et Rad52 collaborent dans la protection des filaments Rad51 contre Srs2.

- (A) Survie cellulaire après induction d'une CDB induite par HO et réparable par conversion génique. Les données présentées correspondent à la moyenne d'au moins trois expériences indépendantes.
- (B) Survie cellulaire après exposition aux rayonnements γ dans un contexte haploïde. La flèche rouge indique l'effet suppresseur de *srs2* Δ sur la sensibilité aux radiations du double mutant *rad57-Q207K rad52-Y376A*.
- (C) Survie cellulaire à des concentrations croissantes de MMS dans un contexte haploïde. La flèche rouge indique l'effet suppresseur de *srs2* Δ sur la sensibilité aux radiations du double mutant *rad57-Q207K rad52-Y376A*.

La collaboration entre Rad55-Rad57 et Rad52 a déjà été observée au laboratoire au travers de résultats non publiés. Contrairement à l'allèle *rad57-Q207K*, l'allèle nul *rad55Δ* montre un effet synergique très fort avec l'allèle *rad52-Y376A* dans le système de réparation d'une CDB par recombinaison ectopique. Moins de 1% des cellules double mutantes *rad55Δ rad52-Y376A* ne survivent à la CDB (**Figure R22A**). Cette très grande sensibilité est très peu supprimée en absence de Srs2. Les mêmes résultats sont obtenus après irradiations γ (**Figure R22B**). Ces résultats indiquent qu'en absence de Rad55-Rad57 et en présence de Rad52-Y376A, les filaments Rad51 sont très peu installés y compris en absence de Srs2. Rad55-Rad57 et Rad52 jouent donc des rôles collaboratifs dans l'installation du filament Rad51. Rad52-Y376A possède un défaut d'installation, mais ce défaut n'est visible qu'en absence de Rad55-Rad57. L'allèle *rad57-Q207K* montre un effet synergique avec *rad52-Y376A* qui est très fortement supprimé par *srs2Δ*. Le défaut majeur de *rad57-Q207K* serait donc un défaut de protection contre Srs2. Les rôles collaboratifs joués par Rad55-Rad57 et Rad52 indiquent que Rad55 doit être recruté au niveau d'une CDB dans le mutant *rad52-Y376A* aussi bien que dans la souche sauvage. Nous avons regardé le recrutement de Rad55-FLAG à une CDB dans notre système de réparation par SSA par des expériences de ChIP. Nous observons un recrutement affaibli mais toujours efficace de Rad55-FLAG dans les souches *rad51Δ* et *rad52Δ*. En accord avec notre hypothèse, le recrutement de Rad55-FLAG est très peu modifié dans une souche *rad52-Y376A* (**Figure R22C**).

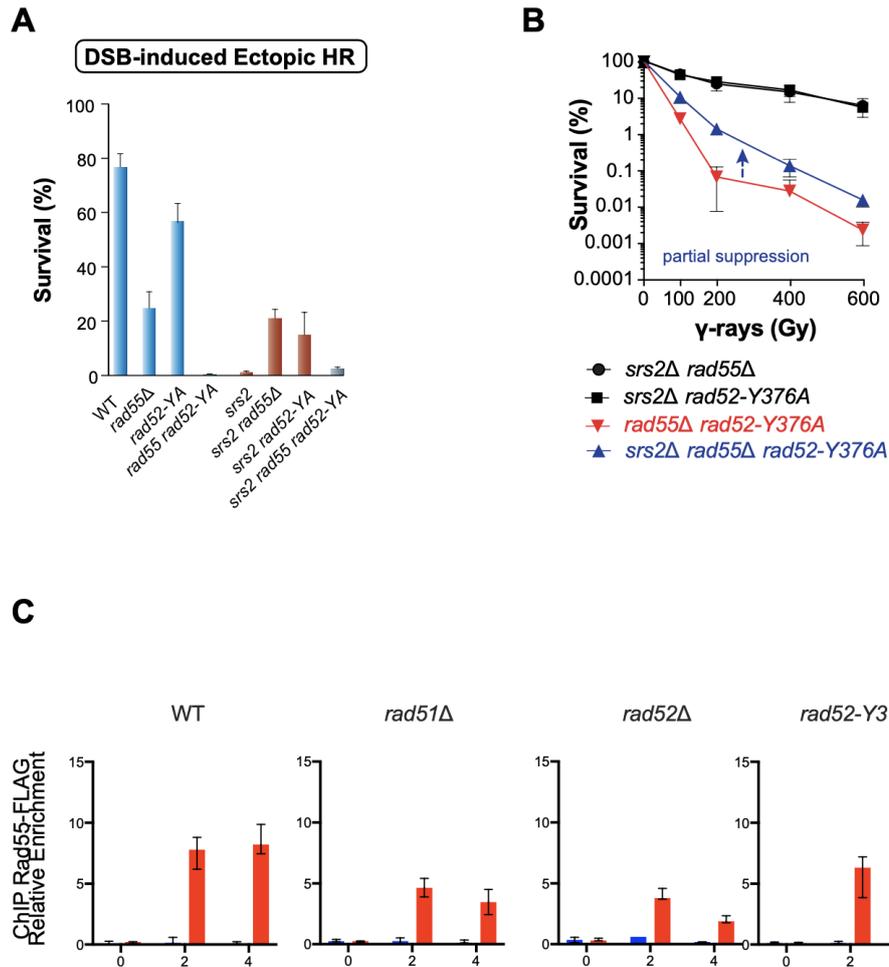


Figure R22. Rad55-Rad57 et Rad52 collaborent dans la formation des filaments Rad51 pour la réparation des CDB.

- (A) Survie cellulaire après induction d'une CDB induite par HO et réparable par conversion génétique. Les données présentées correspondent à la moyenne d'au moins trois expériences indépendantes.
- (B) Survie cellulaire après exposition aux rayonnements γ dans un contexte haploïde. La flèche bleue indique l'effet suppresseur partiel de *srs2Δ* sur la sensibilité aux radiations du double mutant *rad55Δ rad52-Y376A*.
- (C) Enrichissement relatif de Rad55-FLAG à 0,6kb d'une CDB induite par HO par la technique de ChIP.

Enfin, concernant le complexe SHU, une augmentation des foyers Srs2-YFP à une CDB induite par I-SceI a été observée dans le mutant *shu1Δ* (Bernstein et al., 2011). Il a donc été proposé que le complexe SHU protégeait les filaments Rad51 contre Srs2. Cependant, nous n'avons aucune évidence d'un rôle de SHU dans la réparation des CDB (voir Résultats, partie III). Nous observons que les allèles *rad55-Δ12Nter* et *csm2Δ* ne conduisent pas à des effets synergiques en présence de *rad57-Q207K* ni au MMS, ni après une irradiation γ (**Figure R23A et B**). Il reste donc difficile de proposer un rôle de SHU dans la protection du filament Rad51.

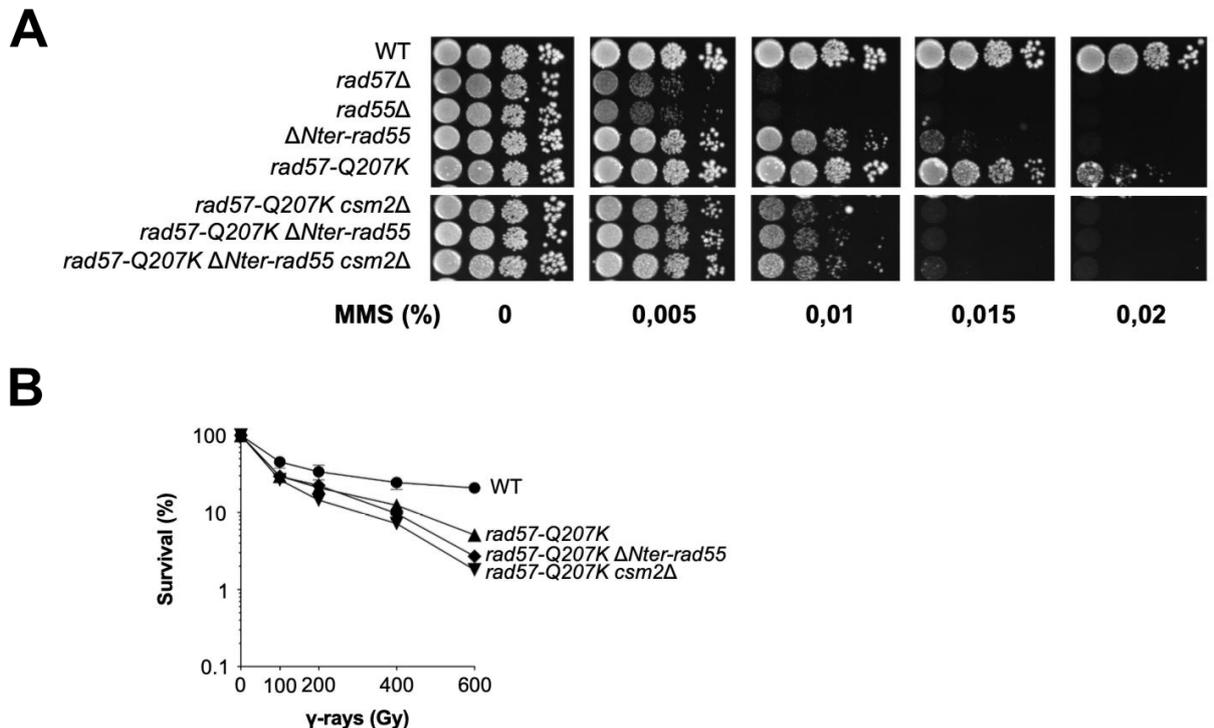


Figure R23. Les allèles mutants *rad57-Q207K* et *rad55-Δ12Nter* ne montrent pas d'effets additifs dans la réparation des dommages à l'ADN.

- (A) Survie cellulaire à des concentrations croissantes de MMS dans un contexte haploïde. Les données présentées correspondent à la moyenne d'au moins trois expériences indépendantes.
- (B) Survie cellulaire après exposition aux rayonnements γ dans un contexte haploïde.

4) La prise en charge des brèches simple-brin de l'ADN par la recombinaison homologue est retardée mais fonctionnelle dans le mutant *rad57-Q207K*

Une étude récente au laboratoire a montré le rôle essentiel de Rad55-Rad57 dans la prise en charge des brèches simple-brin de l'ADN induites après UV (Maloisel et al., 2023). Trois fonctions du complexe sont requises pour cette réparation : l'installation du filament, la protection contre Srs2 ainsi qu'une compétition avec les polymérase translésionnelles. Le mutant *rad57-Q207K* présente une très grande sensibilité au MMS dans un contexte *rad52-Y376A*, suggérant un défaut potentiel dans la réparation des brèches simple-brin. Pour tester notre hypothèse, dans un premier temps, nous avons étudié les interactions génétiques entre *rev3*Δ et *rad57-Q207K*. Le double mutant *rev3*Δ *rad57-Q207K* présente la même sensibilité aux UV que le simple mutant *rev3*Δ (**Figure R24A**). Ce résultat indique que les filaments Rad51 sont efficacement formés dans le mutant *rad57-Q207K*, probablement grâce à la présence de Rad52. Cependant, après irradiation UV, les fréquences de recombinants [Arg⁺] entre les deux

hétéroallèles de *ARG4* sont diminuées dans le mutant *rad57-Q207K* (**Figure R24B**). Pour interpréter ce résultat, nous proposons que dans le mutant *rad57-Q207K*, une plus grande proportion de lésions UV-induites de l'ADN soit dirigée vers les voies de la STL.

Pour suivre moléculairement la réparation des brèches simple-brin post-réplcatives dans le mutant *rad57-Q207K*, nous avons analysé l'apparition de foyers RPA par microscopie à fluorescence à l'aide de la construction Rfa1-YFP (voir Matériels et Méthodes). Les cellules sauvages arrêtées en G1, irradiées aux UV (60 J/m²) puis relâchées en phase S montrent une très forte augmentation des foyers RPA comparées aux cellules non-irradiées (**Figure R24C et D**). Ces foyers disparaissent rapidement dans une souche sauvage (**Figure R24D**). Nous observons que les fréquences de cellules non-irradiées montrant des foyers RPA sont identiques entre la souche mutante *rad57-Q207K* et la souche sauvage (**Figure R24C et E**). De même, l'allèle *rad57-Q207K*, ne conduit pas à une augmentation des foyers RPA dans une souche *rev3Δ* non-irradiée (**Figure R24G et I**). Le mutant *rad57-Q207K* ne présente donc pas les défauts réplcatifs du mutant *rad55Δ* (Maloisel et al., 2023) et du mutant *rad55-F80E* de perte d'interaction entre Rad55 et Rad57 (voir Résultats, partie II). Après une irradiation aux UV, le mutant *rad57-Q207K* montre la même forte fréquence de foyers RPA que la souche sauvage (**Figure R24F**). Ces foyers disparaissent progressivement des cellules sauvages lors des quatre heures de nos échantillonnages. De manière intéressante, il apparaît que les foyers RPA persistent plus longtemps dans les cellules mutantes *rad57-Q207K* (**Figure R24D vs. F**). Presque deux fois plus de cellules présentent encore un foyer RPA dans la souche *rad57-Q207K* en comparaison avec la souche sauvage, quatre heures après l'irradiation. La même persistance des foyers est observée dans les cellules *rev3Δ* (**Figure R24H vs. J**). Ces expériences nécessitent d'être répétées. Néanmoins, ces premières observations suggèrent que la perte d'interaction entre Rad55-Rad57 et le motif FVTA de Rad51 ralentit la résolution des foyers RPA et donc la prise en charge des brèches simple-brin induites par les UV. Nous pouvons donc proposer un défaut d'installation du filament Rad51 dans le mutant *rad57-Q207K*. Ce retard pourrait permettre aux polymérase translésionnelles d'être recrutées plus facilement sur les brèches et pourrait ainsi expliquer le défaut dans la formation de recombinants [Arg⁺] UV-induits.

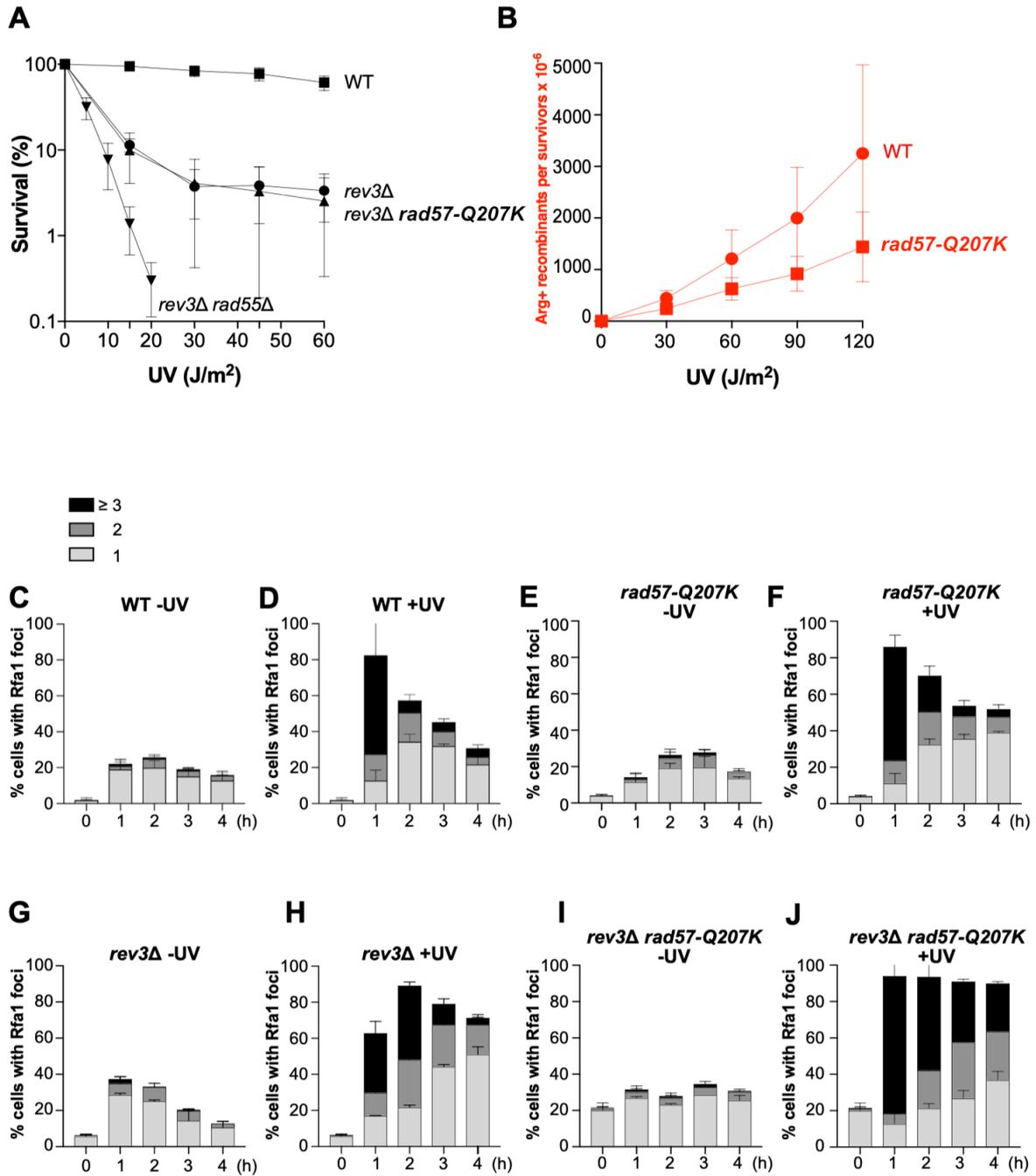


Figure R24. L'interaction entre Rad55-Rad57 et le motif FVTA de Rad51 participe à la réparation post-répliquative des brèches simple-brin.

(A) Survie cellulaire après exposition aux rayons UV en absence de Rev3 dans un contexte haploïde.

Les données présentées correspondent à la moyenne d'au moins trois expériences indépendantes.

(B) Fréquence des recombinants [Arg+] après exposition aux rayons UV dans un contexte diploïde.

(C-F) Quantification des foyers Rfa1-YFP détectés par microscopie à fluorescence dans les cellules sauvages et mutantes pour Rad57 en présence ou (G-J) en absence de Rev3 après exposition ou non aux UV. Les barres d'erreur indiquent les écarts types de trois expériences indépendantes.

5) L'interaction entre Rad55-Rad57 et le motif FVTA de Rad51 participe à la formation d'intermédiaires toxiques lors de la RH induite aux UV

L'interaction entre Rad55-Rad57 et le motif FVTA de Rad51 n'étant pas essentielle à la réparation des brèches simple-brin induites par les UV et par le MMS, nous avons également exploré la formation d'intermédiaires toxiques de recombinaison en absence de cette interaction. Les cellules *srs2Δ* diploïdes sont extrêmement sensibles aux UV (**Figure R25A**). Cette sensibilité est très largement supprimée par *rad57Δ* ainsi que par l'allèle *rad57-L390E* de perte d'interaction entre Rad55 et Rad57 (**Figure R25A**). La sensibilité de *srs2Δ* est partiellement supprimée par *rad57-Q207K*. L'effet étant partiel néanmoins, les cellules *rad57-Q207K srs2Δ* restent environ dix fois plus sensibles que les cellules *rad57Δ srs2Δ* (**Figure R25A**). De manière intéressante, nous observons que les fréquences de recombinants hétéroalléliques [Arg+] induits aux UV sont très élevées dans le mutant *srs2Δ* et que ces fréquences diminuent très fortement dans le double mutant *rad57-Q207K srs2Δ* (**Figure R25B**). Nous proposons donc que, dans ce mutant, une partie plus importante des lésions simple-brin de l'ADN soient prises en charge par les polymérases translésionnelles, conduisant alors à moins de formation de filaments Rad51 toxiques et à moins de réparation par la recombinaison homologe. Un retard dans la formation du filament Rad51 dans le mutant *rad57-Q207K*, ainsi qu'un recrutement facilité des polymérases translésionnelles, permettraient donc une suppression partielle de la sensibilité aux UV du mutant *srs2Δ*.

Il est proposé que la toxicité des filaments Rad51 dans le système de réparation d'une CDB par SSA vienne du blocage de la synthèse réparatrice après l'appariement des séquences répétées de part et d'autre de la cassure (Vasianovich et al., 2017). Nos données obtenues avec le mutant *rad55-D143K* et *pol32Δ* sont en accord avec cette hypothèse (**Figure R10C**). Nos observations suggèrent un délai dans la formation des filaments Rad51 dans le mutant *rad57-Q207K* qui pourrait prévenir la formation de filaments Rad51 toxiques au cours de la voie SSA. Cependant, le double mutant *rad57-Q207K srs2Δ* reste aussi sensible que le simple mutant *srs2Δ* (**Figure R25B**).

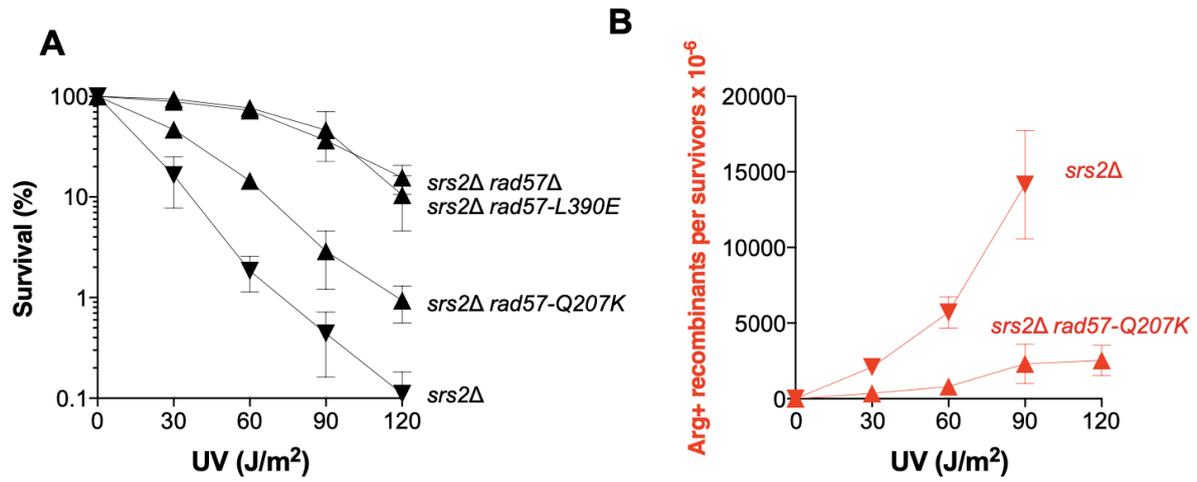


Figure R25. Le mutant *rad57-Q207K* conduit à un déficit de RH UV-induite en absence de Srs2.

(A) Survie cellulaire après exposition aux rayons UV en absence de Srs2 dans un contexte haploïde. Les données présentées correspondent à la moyenne d'au moins trois expériences indépendantes.

(B) Fréquence de recombinants [Arg+] après exposition aux UV en absence de Srs2 dans un contexte diploïde.

Matériels et Méthodes

Souches utilisées

Les souches de bactérie *Escherichia coli* et de levure *Saccharomyces cerevisiae* sont listées dans le tableau 1. Les souches de levure utilisées lors de ma thèse sont issues des différents fonds génétiques décrits ci-dessous. Les bactéries ont été cultivées à 37°C et les levures à 30°C.

Souche	Espèce	Génotype	Expérience
DH5α	<i>E. coli</i>	<i>F- φ80lacZΔM15 Δ(lacZYA-argF)U169 recA1 endA1 hsdR17(rK-, mK+) phoA supE44 λ- thi-1 gyrA96 relA1</i>	Mutagenèse dirigée
CTY10-5d	<i>S. cerevisiae</i>	<i>MATα, ade2-101, his3Δ200, leu2Δ1, trp1Δ901, gal4, gal80, URA3::lexAop-LacZ</i>	Test de double-hybride
FF18733	<i>S. cerevisiae</i>	<i>MATα, his7-2, leu2-3,112, lys-1-1, trp1-289, ura3-52</i>	MMS, Analyses génétiques
tGI354	<i>S. cerevisiae</i>	<i>hml::ADE1 MATα hmr::ADE1 arg5,6::Mata-inc::HPH1 ade3::GAL::HO</i>	Test de survie RH ectopique
YMV80	<i>S. cerevisiae</i>	<i>ade1-100 ura3-52 leu2-3,112 lys5 hml::ADE1 mat::hisG hmr::ADE1 leu2-cs his4::NAT-leu2Δ5' ade3::GAL::HO</i>	Test de survie SSA, ChIP
W303	<i>S. cerevisiae</i>	<i>MATα ADE2 leu2-3,112 his3-11,15 trp1-1, ura3-1</i>	Microscopie

Tableau 1. Souches de *E. coli* et *S. cerevisiae* utilisées.

Construction des plasmides et souches utilisés

La délétion des gènes d'intérêt a été réalisée par remplacement selon la méthode PCR en une étape (Baudin et al., 1993; Longtine et al., 1998). Le gène d'intérêt est alors remplacé par un gène de résistance. Les mutants sont sélectionnés sur un milieu riche (YPD) complété par un antibiotique ou dépourvu pour certains acides aminés, selon le gène de résistance. L'absence du gène est confirmée par amplification PCR.

L'intégration des mutations dans les différents plasmides et souches utilisés durant cette étude a été réalisée comme décrit ci-dessous.

Mutagenèse dirigée

Les oligonucléotides (oligos) portant les mutations à introduire dans les plasmides de double-hybride (pACT2 ou pBTM116) ou dans les plasmides intégratifs (pRS306) sont dessinés à partir du logiciel SeqBuilder selon les conditions suivantes. La séquence de l'oligo sens comprend une vingtaine de bases, à partir desquelles est calculée la température d'hybridation (T_m), et la

mutation souhaitée située en 5'. La T_m est comprise entre 57 et 60°C. La séquence est choisie de sorte qu'elle se termine par un ou plusieurs G ou C. La séquence de l'oligo anti-sens comprend une première vingtaine de bases, située avant la mutation, à partir desquelles la T_m, comprise entre 48 et 55°C, est calculée. La mutation est ajoutée à la séquence en plus d'une quinzaine de nucléotides située après celle-ci, créant une zone d'homologie entre les deux oligos.

Les produits de PCR sont obtenus à partir des oligos portant les mutations en utilisant une polymérase hautement fidèle (Phusion, NEB). Le mélange réactionnel est le suivant : 1X tampon Phusion HF, 200µM mix dNTPs, 0,5µM de chaque oligos, 100ng d'ADN plasmidique, 1U de polymérase, H₂O qsp 50µl. Les cycles d'amplification sont présentés dans le tableau 2. La température d'hybridation et le temps d'élongation sont définis pour chaque paire d'oligos.

Étapes		Températures	Temps
Dénaturation		98°C	2'
Dénaturation	25-30 cycles	98°C	30''
Hybridation		55-65°C	30''
Elongation		72°C	3'30'' - 4'
Terminaison		72°C	8'

Tableau 2. Programme PCR pour la mutagenèse dirigée

Les produits de PCR obtenus sont ensuite traités avec 50U de l'enzyme DpnI sur la nuit afin de dégrader les plasmides hémi-méthylés contenant la séquence sauvage. 50µl de cellules compétentes d'*E. coli* (DH5α) sont transformés avec 5µl de produit traité. Ces produits de PCR, qui portent le gène bêta-lactamase conférant la résistance à l'ampicilline, présentent des extrémités chevauchantes sur une quinzaine de nucléotides. Afin d'exprimer ce gène de résistance, la bactérie *E. coli* doit recombiner ces deux extrémités pour circulariser le plasmide. Une expression suffisante de la résistance à l'ampicilline, permettant la sélection des cellules transformées, est assurée par l'incubation des cellules en milieu LB pendant 1h à 37°C. Les cellules sont alors étalées sur des boîtes contenant du milieu LB et 100µg/ml d'ampicilline. Les colonies résistantes sont repiquées sur le même milieu après 24h d'incubation à 37°C. Les plasmides sont ensuite extraits à partir de 2,5ml de cultures saturantes issues des colonies isolées en utilisant le kit QiAprep Spin Miniprep (QIAGEN). L'incorporation de la mutation désirée ainsi que l'absence de mutations aléatoires qui auraient pu être introduite dans le gène lors de l'amplification par PCR sont vérifiées par le séquençage du gène étudié (Eurofins).

Intégration des mutations dans le génome

Les différentes souches mutantes utilisées ont été générées à partir de deux techniques différentes : le pop-in pop-out et CRISPR.

1) Pop-in pop-out

L'objectif de cette technique consiste à insérer une mutation dans un gène d'intérêt à l'aide d'un plasmide intégratif pRS306 contenant l'intégralité de l'ORF du gène d'intérêt, encadrée par des régions 5'-UTR et 3'-UTR, et le marqueur sélectif *URA3*. Une fois la séquence du gène d'intérêt mutée, le plasmide intégratif est coupé à l'aide d'une enzyme de restriction à un site unique, puis transformé dans une souche de levure. Les cellules ayant recombinaison et donc intégré le plasmide coupé sont sélectionnées sur un milieu dépourvu en uracile. Les cellules contiennent alors les copies sauvage et mutée du gène. Afin d'éliminer la copie sauvage et le plasmide, plusieurs clones sont repiqués sur un milieu contenant de l'acide 5-fluoroacétique (5-FOA), une drogue létale pour les cellules capables de synthétiser l'uracile. Seules les cellules résistantes au 5-FOA sont sélectionnées puis la présence de la mutation est vérifiée par le séquençage du gène étudié (Eurofins).

2) CRISPR

L'objectif de cette technique consiste à insérer une mutation à l'aide du plasmide Cas9 dans un gène d'intérêt dont l'allèle a été préalablement remplacé par une cassette codant pour un gène de résistance à la nourseothricine (NAT) ou à l'hygromycine B (HPH). Le plasmide Cas9 exprime un ARNg guide ciblant spécifiquement le gène de résistance, le gène de la nucléase Cas9 et le marqueur sélectif *URA3* (Soreanu et al., 2018). Afin de réparer la cassure, une matrice contenant l'intégralité de l'ORF du gène d'intérêt avec la mutation à intégrer est amplifiée par PCR à partir d'ADN génomique puis purifiée à l'aide du kit PCR Purification (Qiagen). Le fragment d'ADN est alors ajouté à la transformation. Les cellules sont étalées sur un milieu dépourvu en uracile pour maintenir le plasmide Cas9. L'incorporation de la mutation impliquant la perte du gène de résistance, les clones sont testés sur un milieu riche complétement en NAT ou HPH. Les clones sensibles sont réisolés sur milieu riche afin de perdre le plasmide Cas9. Le gène d'intérêt est amplifié par PCR à partir d'ADN génomique afin d'être envoyé au séquençage pour vérifier la présence de la mutation (Eurofins).

Intégration de l'épitope FLAG (ou MYC) en phase avec l'ORF du gène d'intérêt

La cassette FLAG a été amplifiée par PCR à partir d'ADN génomique et à l'aide d'oligos comportant des séquences homologues au gène d'intérêt de part et d'autre de la cassette.

Le produit PCR est utilisé lors de la transformation des souches de levures contenant le gène d'intérêt sauvage ou muté. Les cellules ayant intégré la cassette FLAG deviennent alors résistantes à la généticine (G418) et sont donc sélectionnées sur un milieu riche complétementée en G418. La présence de la mutation est vérifiée par amplification PCR.

Transformation à haute fréquence de *Saccharomyces cerevisiae*

Les cellules compétentes sont obtenues à partir d'une culture en phase exponentielle. A partir d'une préculture de 2ml de cellules incubée la nuit à 30°C, 1ml de cellules estensemencé dans 25ml de milieu riche (YPD) et incubées 4h à 30°C afin de permettre deux divisions cellulaires. Les cellules sont centrifugées, rincées avec 5ml d'H₂O puis resuspendues dans 1,6ml d'une solution 1X TE,LiAc, préparée extemporanément à partir d'un stock 10X (1M LiAc, 1M TE). Les cellules sont incubées pendant 1h à 30°C sous agitation. 200µl de la suspension sont prélevés pour chaque transformation. 1 µg d'ADN plasmidique à transformer et 200 µg d'ADN simple brin entraîneur (préparé à partir de sperme de saumon, Sigma), sont ajoutés. Le mélange est incubé 30min à 30°C. 1,2 mL de solution de PEG 4000 40% sont ajoutés à la solution et le tout est incubé de nouveau 30min à 30°C. Les cellules subissent alors un choc thermique à 42°C pendant 15min. La culture est centrifugée et le culot est repris avec 200µl d'H₂O avant d'être étalé sur boîtes contenant le milieu adapté. Les boîtes sont incubées à 30°C pendant plusieurs jours jusqu'à apparition des colonies.

Etude des interactions entre les protéines de la RH par double-hybride de levure

Technique du double-hybride de levure (ou Yeast Two-Hybrid, Y2H)

Lors des co-transformations pour les analyses en double hybride, deux plasmides multicopies d'origine 2µ ont été utilisés : le plasmide pBTM116, portant le domaine d'activation du régulateur Gal4 (Gal4AD) et le marqueur de sélection TRP1, et le plasmide pACT2, portant le domaine de fixation à l'ADN du répresseur LexA (LexADBD) et le marqueur de sélection LEU2. Les gènes des protéines à étudier ont été clonés dans ces plasmides en phase et en C-terminal soit de la séquence Gal4AD ou de la séquence LexADBD afin d'exprimer des protéines hybrides et de tester leur interaction potentielle. Ces plasmides sont ensuite introduits par transformation dans la souche CTY10-5d, auxotrophe pour la leucine et le tryptophane, ce qui permet de sélectionner les co-transformants, et porteuse du gène lacZ. Si les protéines mutées interagissent, les domaines Gal4AD et LexADBD se fixent sur leur domaine partenaire

respectif (la boîte TATA et le domaine de fixation de LexA DBD), induisant l'expression du gène *lacZ* de la β -galactosidase (Figure M1).

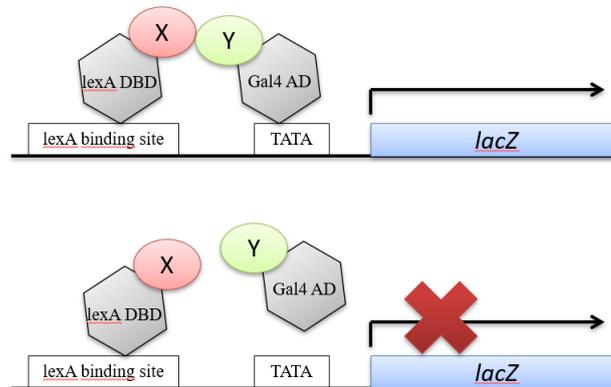


Figure M1. Représentation schématique du principe de double-hybride.

Dans le premier cas, les protéines X et Y, respectivement fusionnées au domaine de fixation à l'ADN de LexA et au domaine d'activation du gène GAL4, interagissent. L'expression du gène de la β -galactosidase est alors induite.

Dans le second cas, les protéines n'interagissent pas. Les domaines auxquels elles sont fusionnées sont incapables de se fixer à leur partenaire. L'expression du gène de la β -galactosidase n'est pas induite.

Coloration X-gal – Méthode qualitative

Les colonies transformantes sont directement mises en contact avec du Xgal sur les boîtes de transformation. Un mélange réactionnel contenant de l'agarose et du Xgal (0,5% agarose, 310mM K₂HPO₄, 190mM KH₂PO₄, 6% DMF, 0,1% SDS, 0,004% Xgal) est préparé à 50°C et versé sur l'une des deux boîtes issues de la transformation. Les boîtes sont laissées à température ambiante jusqu'à apparition de la coloration. Cette méthode est utilisée afin de tester des centaines de transformants à la fois et permet de s'assurer de l'homogénéité de la coloration d'un nombre important de colonies.

Test d'activité de la β -galactosidase – Méthode quantitative

Nous avons utilisé un kit de dosage de l'activité β -galactosidase de levure (Thermo Scientific) qui permet de mesurer précisément l'activité β -galactosidase après la lyse des cellules.

Les cellules d'une colonie issue d'un co-transformant sont incubées dans 500 μ l de tampon Y-PER Reagent dans une cuvette permettant de mesurer la densité optique à 660nm (DO660) dans un spectrophotomètre (Amersham Biosciences) afin de mesurer la concentration cellulaire. 250 μ l de chaque échantillon sont ensuite transférés dans des tubes Eppendorf de 1,5ml auxquels sont ajoutés 0,9X de Tampon β -galactosidase (Thermo Scientific) qui permet la lyse des cellules

et qui contient un substrat de la β -galactosidase, le o-nitrophényl- β -D-galactopyranoside (ONPG). Il est important de chronométrer le temps d'apparition de la réaction. Les tubes sont incubés jusqu'à apparition d'une coloration jaune, issue de la transformation de l'ONPG en o-nitrophénol (ONP). Le temps est noté et 200 μ l de solution Stop, contenant 1M Na₂CO₃ (Thermo Scientific), sont ajoutés à chaque échantillon. Après centrifugation à 19 314 x g durant 30s afin de se débarrasser des débris cellulaires, 600 μ L de solution sont transférés dans des cuvettes et les absorbances à 420nm (A₄₂₀) sont mesurées dans un spectrophotomètre (Amersham Biosciences) afin de mesurer la concentration en ONP.

L'activité β -galactosidase est calculée à l'aide de l'équation suivante :

$$\frac{1000 \times A_{420}}{t \times V \times DO_{660}} = \beta - \text{Galactosidase activity}$$

t : Temps d'incubation (en min) ;

V : Volume de cellules utilisé pour le test (en ml)

Analyse de l'expression des protéines mutantes intégrées au génome par Western blot

Des cultures en phase exponentielle sont préparées à partir de précultures O/N. Les cellules sont alorsensemencées dans le même milieu à une DO₆₀₀ de 0,2 et les cultures sont incubées à 30°C jusqu'à une DO₆₀₀ de 0,5-0,6. Un volume correspondant à 10UDO est prélevé et centrifugé à 19 314 x g durant 4min. Le culot est repris dans 1ml de tampon PBS (Phosphate-Buffered Saline ou Tampon phosphate salin). La solution est transférée dans un tube Eppendorf de 2ml et centrifugée à 19 314 x g, 1min. Les culots sont conservés à sec à -20°C.

Les extraits cellulaires sont réalisés par broyage mécanique après ajout de 200 μ l de billes de verres et 200 μ l de TCA 20% (Acide trichloroacétique). Les tubes sont agités au vortex 30min, à 4°C. Le surnageant est récupéré puis les billes sont lavées avec 200 μ l de TCA 5%. Le lavage est ajouté à l'extrait. Les extraits sont centrifugés à 19 314 x g à 4°C, 10min. Les culots sont repris avec 100 μ l de Laemmli pH8,8 1X puis 10 μ l de Tris 1,5M pH8,8 sont ajoutés pour neutraliser le pH et obtenir une couleur bleue. Les tubes sont chauffés 5min à 95°C et centrifugés à 19 314 x g à 4°C, 10min avant de récupérer le surnageant pour dépôt sur gel SDS-PAGE 10%.

Les protéines issues des extraits sont déposées sur gel SDS-PAGE 10%. Le gel est mis à migrer dans un tampon de migration 1X (Tris 25mM, Glycine 200mM, SDS 0,5%) 1h15 à 100V. Les protéines sont transférées sur membrane de nitrocellulose par un transfert semi-sec de 7min à

20V en suivant le protocole fourni pour le système iBlot™ 2 Dry Blotting (Invitrogen). Afin d'empêcher les interactions aspécifiques, la membrane est incubée 1h dans du tampon PBS-Tween 0,1%, lait 5%. Elle est ensuite incubée sur la nuit avec un anticorps monoclonal anti-FLAG (Sigma) de souris, dilué au 1/10000ème dans du tampon PBS-Tween 0,1%, lait 5%. Après trois lavages de 10min au PBS-Tween 0,1%, la membrane est incubée 1h avec un anticorps secondaire anti-souris produit chez la chèvre (IR800, Advansta), fluoromarcqué, dilué au 1/10000ème dans le même tampon. Après trois lavages de 10min au PBS-Tween 0,1%, le blot est révélé par fluorescence à l'aide du système IBright 1500 (Invitrogen).

Test de sensibilité au MMS

A partir d'une préculture sur la nuit, une dilution au 1/100 (DO_{600} environ 0,1-0,2) est effectuée dans 3mL de milieu YPD et incubée à 30°C pendant 4h. Les cellules sont alors diluées à une DO_{600} de 0,2 puis diluées 10x en série, trois fois. Ces dilutions sont déposées (5µL) sur des boîtes YPD avec des concentrations croissantes de MMS. Les boîtes sont incubées à 30°C pendant 4-5 jours.

Co-Immunoprécipitation

Les cellules ont été récoltées à partir de cultures en phase exponentielle dans du milieu YPD et préparées comme décrit précédemment (Strahl-Bolsinger et al., 1997) sans traitement DNase. 1mg d'extrait de cellules est incubé pendant 1 heure à 4°C avec 0,5µl de sérum contenant des anticorps polyclonaux anti-Rad51 de lapin (Eurogentec). 50µl de billes magnétiques Dynabeads Protein A (Invitrogen) sont ajoutés avant une incubation d'une heure supplémentaire. Les extraits immunoprécipités sont lavés deux fois avec 1ml de tampon de lyse (Hepes-KOH 50mM, 50mM NaCl, EDTA 1mM, Glycérol 10%, NP40 0,5%, AEBSF 1mM, Complete 1x) et remis en suspension dans 15µl de tampon Laemmli 1x.

Les protéines éluées sont ensuite analysées par Western blot sur gel dénaturant SDS-PAGE à 10% et transférées sur membrane de nitrocellulose comme décrit précédemment. Les protéines sont détectées avec un anticorps monoclonal anti-FLAG (ou anti-MYC) de souris (1/10000, Sigma) et un sérum contenant des anticorps polyclonaux anti-Rad51 de lapin (1/2000, Eurogentec). Les membranes sont ensuite incubées avec des anticorps secondaires anti-souris ou anti-lapin (1/10000, Advansta). Après trois lavages de 10min au PBS-Tween 0,1%, le blot est révélé par fluorescence à l'aide du système IBright 1500 (Invitrogen).

Survie après induction d'une CDB par l'endonucléase HO

Les cellules sont cultivées pendant la nuit dans un milieu de culture liquide contenant de l'acide lactique (YPL) comme seule source de carbone à la place du glucose. L'ensemencement des cellules dans du milieu contenant de l'acide lactique permet d'éviter la répression du promoteur gal par le glucose. L'endonucléase spécifique HO, placée sous contrôle d'un promoteur inductible par le galactose, est utilisée pour induire la formation d'une CDB unique.

La survie à la suite de la formation de CDB induite par HO a été mesurée en divisant le nombre de cellules se développant sur un milieu contenant du galactose par le nombre de colonies se développant sur YPD. Les résultats présentés sont les valeurs moyennes d'au moins 3 expériences indépendantes.

Irradiation, test de survie cellulaire et mesure de la fréquence des événements de recombinaison induits par les dommages à l'ADN (Collaboration Laurent Maloisel et Véronique Ménard)

Des cellules en phase stationnaire et en phase de croissance exponentielle ont été utilisées pour l'irradiation aux UV et aux rayons γ , respectivement. L'irradiation UV a été réalisée à l'aide d'une source de 264 nm. Les cellules de levure ont été irradiées avec 30, 60, 90 et 120 J/m² (taux de dose de 2 J/m²/s). L'irradiation γ a été réalisée à l'aide d'un irradiateur GSR D1 (Gamma-Service Medical GmbH). Il s'agit d'un irradiateur auto-blindé avec quatre sources de césium 137 (ou ¹³⁷Cs). L'activité totale était de 180,28 TBq en mars 2014. Les cellules de levure remises en suspension dans 1 mL d'H₂O stérile étant irradiées dans des microtubes en plastique de 1,5 mL. Les cellules de levure ont été irradiées à 100, 200, 400 et 600 Gy (doses uniques) et avec un débit de dose de 12 Gy/min qui tient compte de la décroissance radioactive.

Avant (UV) ou après (rayons γ) l'irradiation, les cellules sont étalées à la dilution appropriée sur un milieu riche (YPD) pour mesurer le taux de survie, et sur un milieu synthétique dépourvu d'arginine pour quantifier le nombre d'événements de recombinaison entre hétéro-allèles ARG4. Les fréquences RH-induites ont été déterminées en divisant le nombre de colonies recombinantes se développant sur milieu sélectif par le nombre de colonies non sélectionnées soumises à la même dose d'irradiation. Les valeurs obtenues ont été corrigées en soustrayant le nombre de recombinants sur les boîtes non irradiées. Le pourcentage moyen d'au moins trois expériences indépendantes est présenté.

Etude du recrutement des protéines de la RH à une CDB induite par l'endonucléase HO par ChIP et analyses par qPCR

Cinétique et prélèvement des cellules

Des cultures en phase exponentielle dans du milieu YPDF (glucose filtré) sont préparées à partir de précultures O/N. Les cellules sont alors ensemencées dans du milieu riche contenant de l'acide lactique (YPL) comme seule source de carbone, à une concentration assurant que les cellules sont en phase exponentielle le lendemain matin. L'ensemencement des cellules dans du milieu contenant de l'acide lactique permet d'éviter la répression du promoteur gal par le glucose. L'expression de l'endonucléase HO est induite par ajout de galactose dans le milieu de culture (2% final). Les cellules sont prélevées au temps 0 puis à 2h et 4h après l'ajout du galactose à DO constante (15UDO). A chaque temps de la cinétique, les cellules sont fixées avec 1% de formaldéhyde pendant 10min, neutralisé ensuite par 125mM de glycine pendant 5min, sous agitation. Les cellules sont centrifugées puis lavées trois fois avec un tampon TBS (20 mM Tris pH8, 150 mM NaCl). Les culots sont conservés à -20°C.

ChIP

Les cellules sont lysées par broyage mécanique pendant 45min en présence de billes de verre dans du tampon de lyse (HEPES pH7,5 50mM, EDTA 1mM, NaCl 140mM, Triton X-100 1%, Sodium Deoxycholate 0,1%, AEBSF 1mM). Après récupération, l'ADN des extraits cellulaires (650µl) est fragmenté en segments d'environ 500pb par sonication (High, 10min, 30s On/30s Off, 4°C). A ce stade, la fraction insoluble des extraits est éliminée. L'immunoprécipitation est réalisée par ajout de 2µg d'anticorps polyclonal de lapin anti-RPA (don de V. GELI), de 2µg d'anticorps monoclonal anti-FLAG de souris (Sigma) ou 5µl de sérum contenant des anticorps polyclonaux de lapin anti-Rad51 (Eurogentec) dans 350µl d'extrait. Les échantillons sont incubés 1h à 4°C. 50µl de billes magnétiques Dynabeads Protein A ou PanMouse (Invitrogen) sont ajoutés aux échantillons afin de fixer l'anticorps. Les billes sont ensuite lavées dans différents tampons : deux lavages en tampon de lyse, un lavage en tampon de lyse complété avec 0,5M NaCl, un lavage en tampon IP (Tris pH 8 10mM, Lithium Chloride 0,25M, EDTA 1mM, NP40 0,5%, Sodium Deoxycholate 0,5%) et un lavage en tampon TE 1X. Le complexe anticorps-antigène-ADN est alors élué des billes par ajout d'un tampon d'éluion 1X (Tris pH8 25mM, EDTA 5mM, SDS 0,3%). Les échantillons immunoprécipités et le reste des extraits sont traités à la pronase 1h à 37°C. Le lien protéine-ADN induit par le formaldéhyde est alors inversé par une incubation de 16h à 65°C. Enfin, l'ADN est traité à la RNase 1mg/ml, 1h à 37°C et purifié à l'aide du kit QIAquick PCR purification (QIAGEN).

qPCR

La méthode de qPCR est basée sur la détection « en temps réel » d'un signal fluorescent émis lors de l'amplification d'un produit de PCR néoformé. Ce signal fluorescent est obtenu par ajout au milieu réactionnel d'un intercalant de l'ADN, comme le SYBR Green, 20 fois plus fluorescent lorsqu'il se trouve intercalé à l'ADN plutôt que sous sa forme libre. La quantité de SYBR Green intercalée et donc la fluorescence émise à chaque fin de cycle d'amplification, est proportionnelle à la quantité d'ADN de l'échantillon. En parallèle, une courbe standard ($Ct=f(\log(\text{quantité d'ADN}))$) est réalisée à partir d'une gamme d'étalonnage obtenue par dilution en série d'un échantillon d'extrait total au temps 0. Le nombre de cycle suffisant pour détecter une intensité définie de fluorescence (Ct) définit la quantité d'ADN. La quantité d'ADN dans un échantillon donné est déterminée à partir de la courbe standard grâce au nombre de cycle Ct .

Les réactions de qPCR ont été menées avec le Platinum SYBR Green qPCR SuperMix-UDG (Invitrogen) et le système Eppendorf Realplex. Les cycles d'amplification sont présentés dans le tableau 3.

Etapas		Températures	Temps
Dénaturation		95°C	2'
Dénaturation	40 cycles	95°C	15''
Hybridation		55°C	15''
Elongation		68°C	20''
			(Lecture de la fluorescence)

Tableau 3. Programme pour la qPCR.

Les oligos utilisés pour l'amplification des différents loci lors des analyses de qPCR sont : EMO127 et EMO128 pour l'amplification de la CDB induite par HO ; EMO102 (CCC TGT GTG TTC TCG TTA TGT T) et EMO103 (TAA GGC GCC TGA TTC AAG A) pour l'amplification du locus se situant à 0,6kb de la CDB ; EMO65 (CCA AAT AGC CAA TGG TGT CA) et EMO66 (CCA AGA TGC AAA CCG AAT AA) pour l'amplification du locus se situant à 7,6kb de la CDB ; EMO100 (AGC AAA GTT GGG TGA AGT ATG GTA) et EMO101 (CAA ATT TGT CTA GTG TGG GAA CG) pour l'amplification du locus contrôle *ARG5,6*.

Le taux d'enrichissement relatif des ChIP correspond au ratio de la quantité d'ADN immunoprécipitée (IP) sur la quantité d'ADN de l'extrait brut (Input). Ces ratios sont calculés à chaque temps (0h, 2h et 4h) aux loci *ARG5,6*, 0,6kb et 7,6kb de la CDB pour chaque souche.

Culture cellulaire, synchronisation et irradiation avant microscopie (Collaboration Laurent Maloisel)

Les cellules sont cultivées à 30°C dans un milieu synthétique complet (Formedium). Avant l'irradiation UV et γ , les cellules en croissance ont été synchronisées en G1 en utilisant 17mg/ml de α -facteur pendant 180min. Elles sont relarguées de l'arrêt en G1 par trois lavages consécutifs avec de l'eau stérile. Les cellules sont ensuite remises en suspension dans 50ml de H₂O stérile et irradiées aux UV dans une plaque de verre de 190mm de diamètre. L'irradiation UV est réalisée à l'aide d'une source de 264 nm. Les cellules de levure dans l'eau sont irradiées avec 60J/m² (taux de dose de 2J/m²/s) puis remises en suspension dans du milieu complet frais. L'irradiation γ a été réalisée comme décrit pour les études de survie. Les cellules ont ensuite été remises en suspension dans un milieu complet frais. Les expériences sur le temps ont commencé avec des cultures de levure ajustées à une DO₆₀₀ de 0,5.

Microscopie (Collaboration Laurent Maloisel, Jamie Phipps et Karine Dubrana)

Les images de cellules vivantes ont été acquises à l'aide d'un microscope inversé à grand champ (Leica DMI-6000B) équipé d'un contrôle adaptatif de la mise au point pour éliminer la dérive Z, d'un objectif à immersion 100×/1,4 NA et d'un système de platine piézo Z à nanositionnement Prior NanoScanZ, d'une caméra CMOS (ORCA-Flash4.0 ; Hamamatsu) et d'une source de lumière à l'état solide (SpectraX, Lumencore). Le système est piloté par le logiciel MetaMorph (Molecular Device).

Les images YFP ont été acquises aux moments indiqués après la libération du bloc de facteur α et l'irradiation aux UV ou aux rayons γ ; 19 pas focaux de 0,20 μ m ont été acquis avec un temps d'exposition de 100ms en utilisant une diode 500-nm à l'état solide et un filtre YFP (excitation 470-510 nm et dichroïque 495 nm ; Chroma Technology Corp.). Une seule image en champ clair sur un plan focal a été acquise à chaque point dans le temps avec une exposition de 50ms. Toutes les images présentées sont des projections z d'images z-stack. L'analyse des images a été réalisée après traitement avec le logiciel ImageJ (National Institutes of Health), à l'aide de scripts écrits en langage macro ImageJ. Les projections en champ clair et en intensité maximale des images YFP ont été fusionnées, les foyers Rfa1-YPD ont ensuite été quantifiés en 2D.

Discussion

I. L'association d'AlphaFold2 et de tests double-hybride permet l'identification rapide de résidus impliqués spécifiquement dans les interactions protéine-protéine au sein d'un complexe

Mon projet de thèse est basé sur la modélisation structurale des complexes de paralogues de Rad51, Rad55-Rad57 et SHU, ainsi que sur l'identification des interfaces entre ces complexes et le filament Rad51. La conservation existante entre paralogues de Rad51 et la recombinase Rad51, ainsi que les structures déjà définies, nous ont permis en collaboration avec Raphaël Guérois, de proposer le premier modèle structural associant SHU, Rad55-Rad57 et Rad51. Ce modèle montre de manière frappante que les complexes de paralogues de Rad51 partagent les caractéristiques structurales des monomères de Rad51 assemblés en filament (**Figure R1 et R2**). Ainsi, les cœurs conservés de chaque paralogue de Rad51 sont largement impliqués dans les interactions protéine-protéine. Les complexes SHU et Rad55-Rad57 interagissent entre eux au travers d'une interaction entre Csm2 et Rad55. Cette interaction définit alors un mégacomplexe qui interagit avec une seule extrémité du filament Rad51. La structure du filament est orientée sur l'ADNsb définissant une extrémité 5' du filament ainsi qu'une extrémité 3'. Le mégacomplexe se fixe sur l'extrémité 5' du filament Rad51. Le complexe de paralogues de Rad51, RFS-1/RIP-1, chez *C. elegans* favorise la croissance 3'-5' du filament Rad51 *in vitro* (Belan et al., 2021). Ce résultat est en accord avec notre modèle dans lequel Rad55-Rad57 interagit en 5' du filament Rad51 chez la levure. Rad55-Rad57 pourrait favoriser une croissance polarisée 3'-5' en facilitant le chargement de monomères de Rad51 sur l'extrémité 5' du filament en croissance. Tandis que Rad55-Rad57 participerait au dynamisme de l'élongation du filament Rad51, la structure du mégacomplexe que nous proposons suggère plutôt la stabilisation d'un filament déjà formé à partir de son extrémité 5'. Une telle stabilisation du filament Rad51 à son extrémité 5' a également été observée *in vitro* avec les paralogues de Rad51 de *C. elegans* (Taylor et al., 2015).

Par ailleurs, Rad55 et Rad57 possèdent des régions non-conservées. Les extrémités N-terminales de Rad55 et Rad57 sont impliquées dans l'interaction avec Csm2 et Rad55, respectivement. L'extrémité C-terminale d'une cinquantaine d'acides aminés de Rad55 ne participe pas à l'interaction entre Rad55 et Rad57. Des expériences préliminaires et non décrites ici, ont montré que la délétion de l'extrémité C-terminale de Rad55 n'entraînait aucune sensibilité au MMS. Le rôle de cette longue extrémité reste incompris à ce jour. Finalement, des boucles peu conservées sortent de la structure globulaire à la fois de Rad55 et de Rad57.

L'importance de ces boucles dans les différentes interactions impliquant Rad55 et Rad57 est en cours d'investigation au laboratoire.

Au cours de ma thèse, le logiciel AlphaFold2 est devenu disponible et Raphaël Guérois a pu affiner le modèle construit précédemment. D'autres laboratoires ont exploité les potentialités qu'offre AlphaFold2 et, dès sa mise à disposition, des modèles structuraux ont été publiés à l'aide de ce logiciel. Notamment, un modèle pour le complexe Rad55-Rad57 en association avec Rad51 a été proposé (Humphreys et al., 2021). Par ailleurs, des analyses de cryo-microscopie électronique (cryo-EM), couplées à des modèles générés par AlphaFold2, ont permis de proposer un modèle pour le complexe humain BCDX2 en interaction avec RAD51 (Greenhough et al., 2023; Rawal et al., 2023). Enfin, indépendamment d'AlphaFold2, la structure du complexe CX3 a également été décrite récemment (Longo et al., 2023). Les connaissances structurales sur les complexes de paralogues de Rad51 ont ainsi progressé remarquablement depuis 2020. Ces études atteignent les mêmes conclusions que celles issues de notre modèle. En particulier, elles indiquent toutes une interaction des complexes de paralogues de Rad51 avec l'extrémité 5' du filament Rad51. Cette interaction serait donc conservée de la levure à l'Homme. En revanche, les données fonctionnelles *in vivo* restent plus éparses et s'appuient majoritairement sur des variants des paralogues de RAD51 identifiés dans différentes tumeurs (Prakash et al., 2022; Longo et al., 2023). De plus la structure du complexe SHU humain (SWS1-SWSAP1-SPIDR) n'est pas déterminée et ses interactions avec les autres complexes de paralogues de RAD51 et avec le filament RAD51 ne sont pas claires.

Notre modèle chez la levure, généré à l'aide d'AlphaFold2, a pu être testé grâce à nos expériences de double-hybride. Nous avons pu ainsi définir par mutagenèse dirigée les différentes interfaces au sein du mégacomplexe et l'interface entre Rad57 et Rad51. La force du couplage entre modélisation d'une part, et tests double-hybride d'autre part, est de définir des mutations spécifiques pour une interface donnée, et de pratiquer par la suite des tests fonctionnels *in vivo*. Ainsi, j'ai pu au cours de ma thèse, analyser des mutants de Rad55 et de Rad57 qui ne formaient plus le complexe Rad55-Rad57. J'ai pu analyser également un mutant du mégacomplexe SHU-Rad55-Rad57. Et finalement, j'ai pu analyser pour la première fois un mutant de perte d'interaction entre Rad55-Rad57 et Rad51. Les données obtenues montrent que la dissociation de Rad55-Rad57 ainsi que celle du mégacomplexe SHU-Rad55-Rad57 sont associées aux mêmes phénotypes que les mutants nuls. De plus, nous montrons qu'une perte partielle d'interaction entre Rad55 et Rad57 n'affecte pas l'efficacité de la réparation des CDB ; elle déstabiliserait cependant assez les filaments Rad51 pour diriger les brèches simple-brin de

l'ADN plus fréquemment vers la voie STL. Nous montrons que l'interaction entre Rad55-Rad57 et Rad51 est impliquée dans la protection des filaments Rad51 contre Srs2. Nous montrons que cette perte d'interaction peut être compensée par Rad52.

II. La formation du complexe Rad55-Rad57 est essentielle pour la formation et la stabilisation des filaments Rad51

Notre étude structurale du complexe Rad55-Rad57 nous a permis d'étudier de nouveaux mutants de *RAD55* et de *RAD57*. Nous avons à notre disposition deux mutants de perte complète d'interaction, *rad55-F80E* et *rad57-L390E*, et un mutant de perte partielle d'interaction, *rad55-D143K*. L'interface entre Rad55 et Rad57 est composée de deux domaines : un domaine impliquant les cœurs conservés des deux protéines et un domaine impliquant l'extrémité N-terminale de Rad57. Les mutations que nous décrivons sont situées dans les cœurs conservés. Les mutations Rad55-F80E et Rad57-L390E entraînent une perte complète du signal double-hybride bien que l'interface avec la partie N-terminale de Rad57 ne soit pas touchée. Cependant, nous remarquons que la sensibilité des mutants *rad55-F80E* et *rad57-L390E* à une CDB réparable par recombinaison ectopique est légèrement moindre que celle des mutants nuls (**Figure R5C**). Il est donc envisageable que le complexe Rad55-Rad57 ne soit pas complètement absent dans ces mutants. Quoiqu'il en soit, l'ensemble des autres phénotypes associés à *rad55-F80E* et *rad57-L390E* est rigoureusement identique à ceux observés dans les mutants nuls. Nous montrons que la protection contre Srs2 est perdue dans ces mutants entraînant leur sensibilité aux rayonnements γ (**Figure R7**). Nous montrons que l'installation du filament Rad51 à une CDB est défectueuse dans le mutant *rad55-F80E* de manière similaire au mutant *rad55 Δ* (**Figure R6B**). Nous montrons que le défaut réplcatif et la persistance des foyers RPA récemment découverts avec le mutant nul *rad55 Δ* , se retrouvent dans le mutant *rad55-F80E*. Enfin, la toxicité des filaments Rad51 disparaît de façon identique entre les mutants nuls et les mutants de perte d'interaction entre Rad55 et Rad57 (**Figure R9 et R10**). La perte du complexe conduit donc à la perte de ses différents rôles, bien que Rad55 et Rad57 soient toujours présentes dans les cellules. En particulier, dans le mutant *rad55-F80E*, le complexe SHU interagit toujours avec Rad55. Cependant, cette interaction seule n'est pas fonctionnelle. Elle ne permet pas de protéger les filaments Rad51 contre Srs2, ni de prendre en charge les brèches simple-brin. La formation du complexe Rad55-Rad57 est donc essentielle pour les différentes fonctions associées à ces deux protéines. Il est remarquable d'observer que

les mutations entraînant la perte du complexe RAD51C-XRCC3 (CX3), tel que le variant G125V de RAD51C, entraînent les défauts les plus prononcés parmi les variants de RAD51C (Prakash et al., 2022; Longo et al., 2023).

Nos tests double-hybride nous ont permis d'identifier une mutation affectant partiellement la formation du complexe Rad55-Rad57 (**Figure R4A**). Le mutant *rad55-D143K* n'est sensible ni au MMS, ni aux rayonnements γ , ni même aux CDB induites par l'endonucléase HO. Cependant, *rad55-D143K* supprime complètement la sensibilité du mutant *srs2 Δ* à une CDB réparable par la voie du SSA. Cette suppression dépend de la polymérase Pol δ puisque dans un mutant *pol32 Δ* , cette suppression diminue de moitié (**Figure R10C**). Nous proposons donc que dans le mutant *rad55-D143K*, les filaments Rad51 aient un défaut léger d'installation ou bien soient légèrement moins bien stabilisés. Ce défaut entraînerait la perte de l'inhibition de la synthèse réparatrice par le filament Rad51 et donc sa toxicité dans la voie du SSA. Remarquablement, *rad55-D143K* supprime également la létalité synthétique observée entre *mrc1 Δ* et *srs2 Δ* . L'origine de cette létalité pourrait être la formation de filaments Rad51 aux fourches de réplication due aux découplages fréquents entre les hélicases et les polymérases réplcatives (Katou et al., 2003). Les filaments Rad51 installés par Rad55-D143K-Rad57 ne seraient donc plus en mesure de bloquer les polymérases réplcatives. Enfin, nous observons une diminution drastique des recombinants Arg⁺ induits aux UV dans une souche *srs2 Δ* porteuse de l'allèle *rad55-D143K* (**Figure R11E**). Nous proposons que dans cette situation, une plus grande proportion des brèches simple-brin générées par les lésions UV-induites de l'ADN soient prises en charge par les polymérases translésionnelles. L'ensemble des données génétiques suggèrent donc qu'une compétition existe entre le filament Rad51 et la synthèse d'ADN. La déstabilisation partielle de Rad55-Rad57 déplacerait donc la balance et la synthèse ne serait plus inhibée. Le mutant *rad55-D143K* serait ainsi un mutant de séparation de fonction : l'installation des filaments permettrait la réparation des CDB et des brèches simple-brin, ainsi que la protection contre Srs2, mais ces mêmes filaments ne seraient plus en capacité de bloquer les polymérases (**Figure D1**). Il est possible que le filament Rad51 bloque l'accès à l'extrémité 3' d'une amorce pour les polymérases. L'étape limitante serait l'accès de l'extrémité 3' ; dès lors qu'une extrémité 3' se libère, une polymérase pourrait être recrutée, initier la synthèse et déplacer le filament.

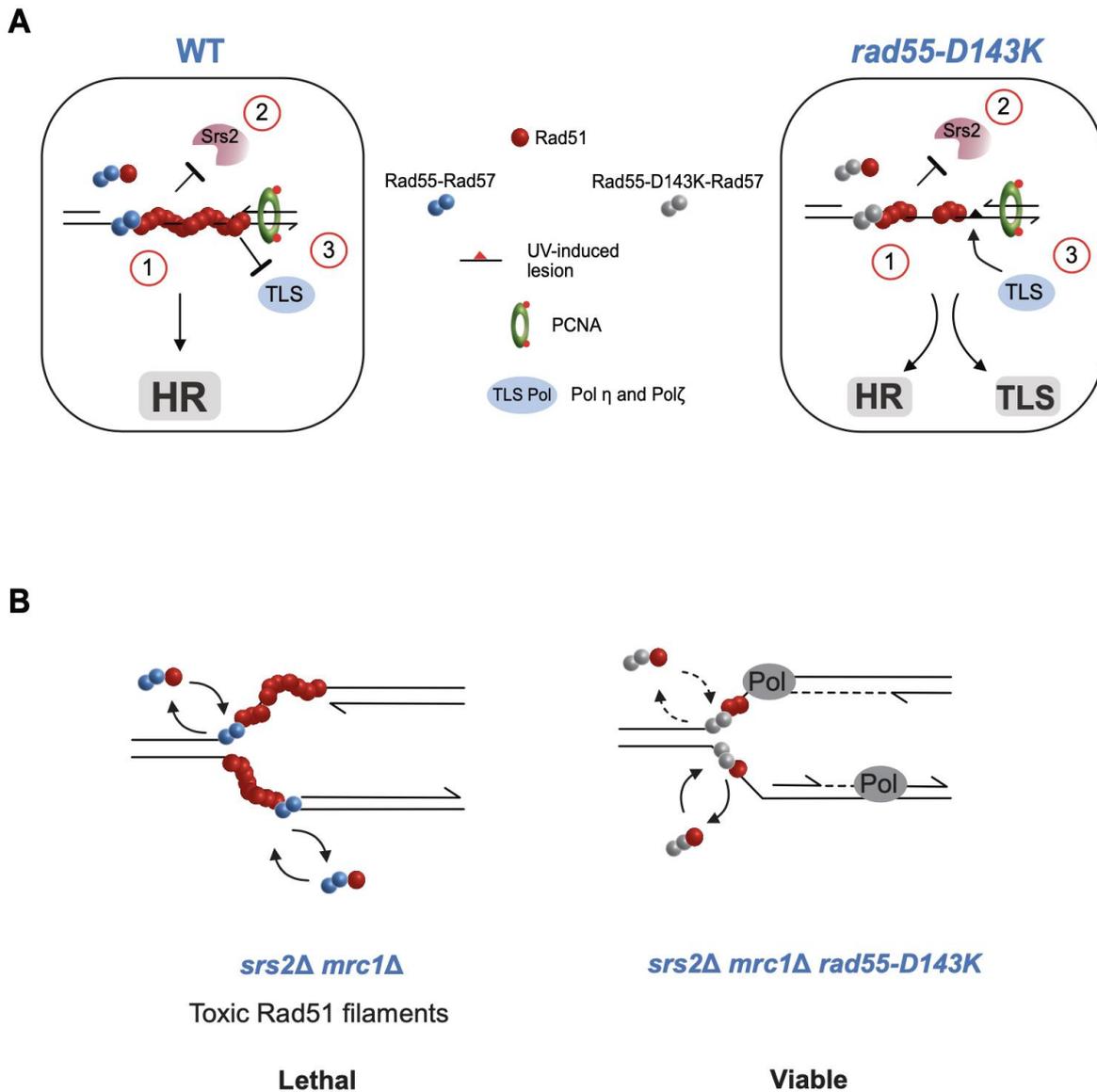


Figure D1. Modèle d'action pour Rad55-Rad57 dans la réparation post-répliquative des brèches simple brin et dans la formation de filaments Rad51 lors du découplage de fourche de réplication.

- (A) Les trois fonctions du complexe Rad55-Rad57 sont représentées : 1) Formation des filaments Rad51, 2) Protection des filaments contre l'activité de démantèlement de Srs2 et 3) Inhibition du recrutement des polymérase translésionnelles. Dans un contexte mutant *rad55-D143K*, les filaments Rad51 sont toujours formés mais sont potentiellement légèrement déstabilisés. Les polymérase sont alors plus facilement recrutées à la lésion.
- (B) La formation et/ou la stabilisation des filaments Rad51 par le complexe Rad55-Rad57 conduit à la formation de filaments toxiques à l'origine d'un blocage de la synthèse de l'ADN dans un contexte *srs2Δ mrc1Δ*. L'introduction du mutant *rad55-D143K* dans ce même contexte génétique permet de lever ce blocage.

Une récente étude décrit des variants de RAD51C identifiés dans certains cancers qui sont fonctionnels pour la RH mais déficients pour la protection des fourches (Longo et al., 2023). Ces mutants sont donc décrits comme des mutants de séparation de fonction. Certains de ces mutants fragilisent l'interaction avec XRCC3 et donc l'intégrité du complexe CX3. Cette déstabilisation ne permettrait plus aux filaments RAD51 de protéger les fourches de réplication bloquées par des dommages à l'ADN contre l'activité d'exonucléases (Cortez, 2019; Longo et al., 2023). Nous proposons que les filaments Rad51 pourraient également inhiber l'initiation de la synthèse d'ADN en bloquant les amorces pour les polymérases. Cette inhibition a pu être observée *in vitro* (Vasianovich et al., 2017). Nous proposons également qu'une perte partielle d'interaction d'un complexe de paralogues conduirait à la formation de filaments Rad51 fonctionnels en recombinaison mais déficients dans la prévention du recrutement des polymérases à une amorce 3'. De tels mutants conduiraient à un recrutement accru des polymérases translésionnelles et donc à une augmentation de la mutagenèse. Par ailleurs, de manière intéressante, il a été observé chez l'Homme que RAD51 bloquait la synthèse au niveau des fourches lorsque les cellules étaient soumises à un inhibiteur de POL α (Mehta et al., 2022). De plus, il est proposé que RAD51 soit requise pour faciliter la régression de fourche en étant recrutée entre une amorce 3' bloquée et le complexe hélicase CMG (W. Liu et al., 2023). Ainsi, le blocage des amorces par le filament RAD51 installé par les complexes de paralogues de RAD51 pourrait être une donnée importante dans la gestion des fourches bloquées chez les mammifères.

III. La formation du mégacomplexe SHU-Rad55-Rad57 facilite spécifiquement la réparation des brèches simple-brin de l'ADN dans les cellules végétatives

Notre étude structurale a permis de montrer que la partie N-terminale non conservée de Rad55 interagissait spécifiquement avec l'interface disponible de Csm2 du complexe SHU. Cette interaction entraîne la formation d'un mégacomplexe qui semble pouvoir stabiliser un filament Rad51 déjà formé. Nous avons donc pu construire *rad55- Δ 12Nter*, un nouvel allèle mutant de *RAD55*. La région N-terminale que nous avons délétée comporte les sérines 2 et 8 qui sont phosphorylées lorsque les cellules sont soumises à une exposition au MMS (Herzberg et al., 2006). Les mutations de ces deux sérines et de la sérine 14 en alanines entraînent une sensibilité au MMS équivalente à la sensibilité des mutants SHU et à celle du nouveau mutant *rad55- Δ 12Nter*. La mutation des sérines en alanines provoque la perte d'interaction entre Rad55

et Csm2 (Bonilla et al., 2021). En accord avec ce dernier résultat, notre modèle structural permet de proposer que la mutation des sérines entraîne une perte d'interaction avec Csm2, indépendamment de leur phosphorylation. Le rôle de la phosphorylation des sérines 2, 8 et 14 de Rad55 dans la stabilité du mégacomplexe reste à déterminer. De plus, nous montrons que les phénotypes de *rad55-Δ12Nter* sont identiques aux phénotypes du mutant *csm2Δ* et que *rad55-Δ12Nter* et *csm2Δ* ne montrent aucun effet additif. Nous proposons donc que l'extrémité N-terminale de Rad55 interagit avec Csm2 pour former un mégacomplexe SHU-Rad55-Rad57. Dans les cellules végétatives, c'est bien le mégacomplexe qui est fonctionnel puisque la perte d'interaction entre SHU et Rad55 conduit aux phénotypes des mutants nuls. Nos résultats sont en accord avec ceux obtenus avec la mutation Csm2-F46A qui entraîne la perte d'interaction avec Rad55 (Gaines et al., 2015). Le mégacomplexe stabiliserait le filament Rad51 à l'extrémité 5' du filament Rad51. D'après ce qui est observé *in vitro* avec le complexe de paralogues de Rad51 RFS-1/RIP-1 de *C. elegans* (Belan et al., 2021), nous pouvons proposer que le complexe Rad55-Rad57 stimulerait l'élongation du filament Rad51 de 3' en 5' au travers d'interactions transitoires avec Rad51 (**Figure D2A**). Rad55-Rad57 participerait également au déplacement de RPA au travers d'un mécanisme qu'il reste à élucider. Il est proposé par ailleurs, que le complexe SHU possède un site de fixation à l'ADNsb au niveau du sous-complexe Psy3-Csm2 et un site de fixation à l'ADNdb au niveau du sous-complexe Shu2-Shu1-Psy3 (S. Zhang et al., 2017). Comme le complexe SHU se lie préférentiellement sur des substrats contenant des extrémités 3' d'ADNsb, il est proposé que le complexe SHU soit positionné à la jonction 5' entre l'ADNsb et l'ADNdb (**Figure D2B**). Le mégacomplexe servirait donc d'un point d'ancrage à cette jonction pour stabiliser un filament Rad51 précédemment formé à l'aide de Rad55-Rad57.

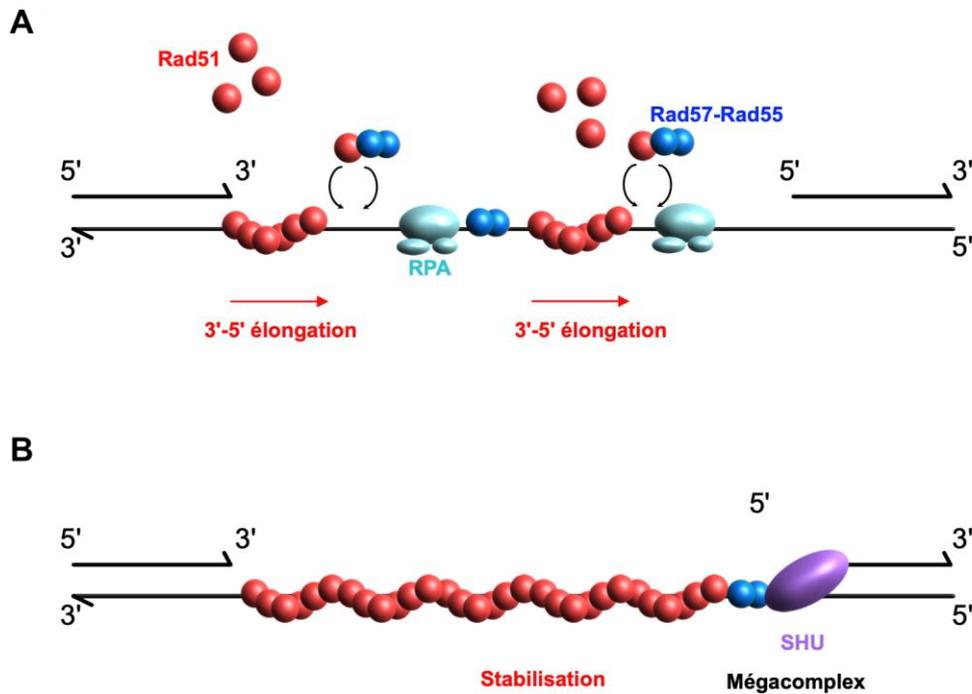


Figure D2. Modèle d'action pour Rad55-Rad57 et le mégacomplexe SHU-Rad55-Rad57 dans la formation et la stabilisation des filaments Rad51.

- (A) Rad55-Rad57 participe à l'élongation 3'-5' du filament Rad51 au travers d'interactions transitoires, ainsi qu'au déplacement de RPA.
- (B) Le mégacomplexe SHU-Rad55-Rad57 stabilise un filament Rad51 formé en se fixant à la jonction 5' ADNs/ADNdb.

Les mutants *shu* ne sont pas sensibles aux rayonnements γ (Martín et al., 2006 ; **Figure R14B et C**). La résistance aux rayonnements γ suggère que SHU n'est pas nécessaire pour la protection des filaments Rad51 formés aux CDB contre Srs2. De plus, la recombinaison hétéroallélique induite aux rayonnements γ n'est pas affectée en absence du mégacomplexe (**Figure R14D**). Nous n'observons aucun défaut de recombinaison ectopique initiée par une CDB induite par l'endonucléase HO (**Figure R14E**). Nos résultats montrent que le rôle de stabilisation des filaments Rad51 du mégacomplexe n'est pas requis pour l'efficacité de la réparation des CDB mitotiques par la RH. En revanche, les mutants *shu* montrent des phénotypes marqués en méiose (Sasanuma et al., 2013). La viabilité des spores est diminuée d'un facteur 2, tandis que la recombinaison hétéroallélique est diminuée d'un facteur 10. La première division de méiose est retardée de cinq heures et les CDB méiotiques induites par Spo11 persistent plus longtemps. Moins de foyers méiotiques Rad51 sont observés, tandis que les foyers Dmc1 sont toujours aussi fréquents dans les mutants *shu*. Finalement, des expériences de ChIP montrent le recrutement de Psy3-FLAG au niveau d'un point chaud de recombinaison méiotique et ce recrutement est indépendant du complexe Rad55-Rad57 (Sasanuma et al.,

2013). Le rôle de SHU dans la formation du filament Rad51 pourrait donc être radicalement différent en méiose et ne pas nécessiter son interaction avec Rad55-Rad57. L'étude du mutant *rad55-Δ12Nter* permettra de préciser si le mégacomplexe SHU-Rad55-Rad57 est impliqué en méiose. Par ailleurs, il a été montré que le complexe SHU humain, SWS1-SWSAP1-SPIDR était impliqué dans la recombinaison hétéroallélique induite par une CDB (Prakash et al., 2021). De plus, ce complexe interagit directement avec RAD51. Le complexe SHU humain se différencie donc du complexe SHU de levure et pourrait avoir un rôle sur la formation du filament RAD51, indépendamment d'interactions avec les autres complexes de paralogues de RAD51.

Les mutants *shu* sont sensibles au MMS probablement du fait de lésions de bases, telles que les sites abasiques et les bases méthylées, qui provoquent des arrêts de fourches de réplication ainsi que des brèches simple-brin de l'ADN en arrière des fourches. En accord avec cette hypothèse, l'expression de ALKBH2 humaine, responsable de la réparation des cytosines méthylées (3meC), supprime la sensibilité au MMS des mutants *shu* de levure (Bonilla et al., 2021). Pour continuer l'étude de SHU, nous avons étudié les phénotypes des mutants *shu* après irradiations aux UV. Les dimères de pyrimidines sont des lésions bloquantes pour les polymérases répliquatives et nécessitent les voies STL et RH pour être contournés pendant la réplication. Nous montrons au travers de notre étude du mutant *rad55-Δ12Nter*, que le mégacomplexe SHU-Rad55-Rad57 est impliqué dans la réparation des brèches simple-brin de l'ADN UV-induites au cours de la réplication. En absence du mégacomplexe, les cellules dépourvues de la polymérase translésionnelle Polζ sont plus sensibles aux UV (**Figure R16A**) et la recombinaison hétéroallélique UV-induite est diminuée (**Figure R16C**). Les foyers RPA persistent légèrement plus longtemps dans le mutant *rad55-Δ12Nter* (**Figure R17**), l'analyse du mutant *csm2Δ* est en cours. Nous proposons donc que le mégacomplexe SHU-Rad55-Rad57 stabilise le filament Rad51 à l'extrémité 5' des brèches simple-brin (**Figure D2B**). Cette stabilisation se ferait à travers de l'interaction entre Rad57 et Rad51 et conduirait soit à une inhibition de l'activité ATPase de Rad51, soit à un changement des caractéristiques structurales du filament (Taylor et al., 2015). Le complexe SWS1-SWSAP1-SPIDR-PDS5B montre la même implication que le complexe SHU de levure dans la résistance au MMS (Martino et al., 2019). Ce complexe interagit avec certaines sous-unités des complexes BCDX2 et CX3 (Martín et al., 2006; T. Liu et al., 2011). Il est donc envisageable qu'un mégacomplexe de paralogues de RAD51 stabilise les filaments RAD51 au niveau de brèches simple-brin en arrière des

fourches de réplication. Cette hypothèse pourra être testée à l'aide de mutants de perte d'interaction entre les différents complexes humains.

Les mutants *shu* montrent un phénotype mutateur qui dépend de la polymérase translésionnelle Pol ζ (Ball et al., 2009). Nous observons que les mutants du mégacomplexe suppriment partiellement la sensibilité aux UV du mutants *srs2* Δ et très fortement son phénotype hyper-recombinogène (**Figure R18A et B**). Nous proposons donc que dans ces mutants, plus de lésions UV-induites sont prises en charge par la voie STL. Dans ces mutants, la voie RH serait moins apte à contrebalancer les polymérases translésionnelles. Notre modèle, cohérent avec les données structurales récentes des paralogues de Rad51 de levure et humains (Humphreys et al., 2021; Greenhough et al., 2023; Rawal et al., 2023), propose que Rad55-Rad57 participe à l'élongation du filament Rad51 dans la direction 3'-5' au travers d'interactions transitoires avec Rad51 (Belan et al., 2021; Roy et al., 2021 ; **Figure D2A**). De plus, il propose que le mégacomplexe SHU-Rad55-Rad57 sur une brèche simple-brin soit à l'extrémité 5' et donc à l'opposé de l'extrémité 3' sur laquelle peuvent venir les polymérases translésionnelles (**Figure D2B**). Le rôle des complexes de paralogues dans la prévention du recrutement des polymérases translésionnelles serait donc indirecte. Cette prévention se ferait au travers de la présence de Rad51 devant l'extrémité 3'. Les phénotypes plus forts associés à la perte du complexe Rad55-Rad57 sont dus, selon notre modèle, aux différents rôles de ce complexe dans la formation et la stabilisation des filaments Rad51, tandis que le mégacomplexe participerait seulement à la stabilisation d'un filament déjà formé sur les brèches simple-chaine de l'ADN. Il a été montré *in vitro* que le complexe SHU se fixait sur des intermédiaires mimant une fourche de réplication. Il est donc possible que le mégacomplexe participe à la formation de filaments Rad51 toxiques dans le double mutant *mrc1* Δ *srs2* Δ . Si *rad55- Δ 12Nter* supprime la létalité de ce double mutant, nous proposerons alors un modèle selon lequel les filaments Rad51 toxiques seraient formés par le mégacomplexe et pourraient également inhiber les polymérases réplcatives.

IV. L'interaction entre Rad55-Rad57 et Rad51 protège les filaments Rad51 en collaboration avec Rad52

Les modèles générés à l'aide d'AlphaFold2 montre une interaction entre Rad57 et Rad51 (**Figure R19A** ; Humphreys et al., 2021). Nos tests double-hybride sont en accord avec ce modèle. Notamment, nous observons que le motif F₁₄₄VTA₁₄₇ de Rad51 est en interaction avec une poche sur l'interface accessible de Rad57, dans le complexe Rad55-Rad57, dans laquelle se trouvent les résidus Q207 et F190. Le motif FVTA de Rad51 participe à l'interaction entre deux monomères de Rad51 (Pellegrini et al., 2002; Conway et al., 2004; Scott et al., 2016 ; **Figure D3**). Ce motif est un motif conservé sous la forme FxxA et se retrouve dans RAD51 chez l'Homme (FTTA), ainsi que dans les répétitions BRC de BRCA2. La mutation du motif FTTA de RAD51 prévient l'oligomérisation de la protéine (Pellegrini et al., 2002). Nous montrons que la mutation Rad51-F144D abolit l'interaction entre Rad55-Rad57 et Rad51 dans nos tests double-hybride. L'importance de ce motif ainsi que sa conservation est un argument fort en faveur de notre modèle. Le motif FVTA est porté par Rad52 pour son interaction avec Rad51, et l'anti-recombinase FIGNL1 porte également ce motif pour son interaction avec RAD51 (Kagawa et al., 2014; Yuan & Chen, 2013). Ce motif est également présent dans Srs2 et son étude est en cours au laboratoire. Il est intéressant de noter que, au contraire de ces protéines, c'est le motif FVTA de Rad51 qui interagit avec Rad57 et non pas l'inverse. Cette interaction définit l'interaction de Rad55-Rad57 avec l'extrémité 5' du filament Rad51. De manière intéressante, XRCC3 du complexe CX3, contient la poche hydrophobe capable de recevoir la phénylalanine du motif FTTA de RAD51 et interagit avec RAD51 (Longo et al., 2023). Les données indiquent donc que CX3 interagit avec l'extrémité 5' du filament RAD51 et que cette interaction est conservée de la levure à l'Homme. Dans le complexe BCDX2, aucune protéine ne possède le motif FxxA. Par ailleurs, les régions correspondant à la poche hydrophobe recevant la phénylalanine de RAD51 du motif FTTA sont encombrées et ne peuvent donc plus la recevoir. RAD51B de BCDX2 interagit d'après les modèles avec RAD51 exclusivement au travers des domaines conservés ATPase (Greenhough et al., 2023; Rawal et al., 2023).

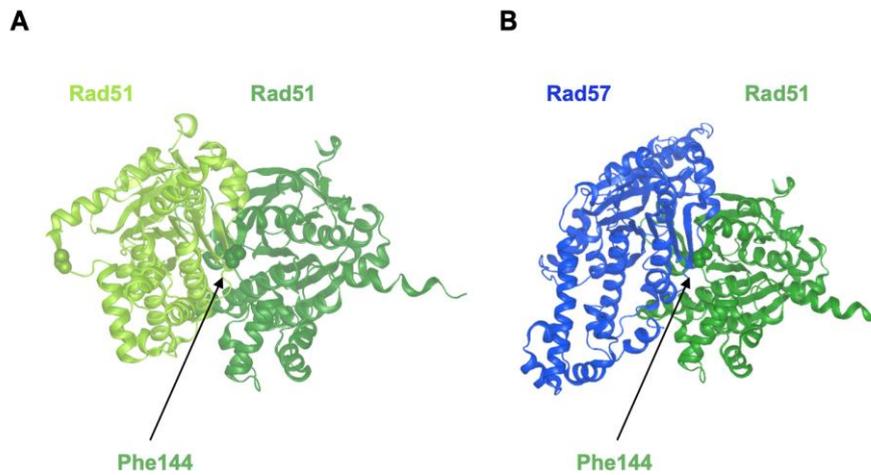


Figure D3. Implication de Rad51-F144 dans l'interaction avec (A) Rad51 et (B) Rad57.

Nous avons pu analyser pour la première fois un complexe de paralogues de Rad51 qui perdait son interaction avec Rad51. Étonnamment, le mutant *rad57-Q207K* n'est ni sensible au MMS ni à une CDB induite par une endonucléase, et ce mutant est très peu sensible aux rayonnements γ . De plus, le recrutement de Rad51 à une CDB mesuré par ChIP n'est pas modifié dans le mutant *rad57-Q207K* (**Figure R20**). Ces résultats étaient inattendus au regard des mutants nuls dans lesquels le recrutement de Rad51 est fortement diminué (**Figure R6B**). Différentes hypothèses pourraient rendre compte de cette absence d'effet. Les résultats du double-hybride pourraient être trompeurs et indiquer une perte complète entre Rad55-Rad57 et Rad51 pour une perte qui serait plutôt partielle. La purification de Rad55-Rad57 nous aidera à tester cette hypothèse. Cependant, un mutant de *RAD52*, entraînant la perte d'interaction entre Rad52 et Rad51, a été décrit au laboratoire et montrait également des phénotypes bien moins forts que ceux associés au mutant nul (E. Ma et al., 2018). Nous avons donc fait l'hypothèse d'un ou des rôles redondants pour Rad52 et Rad55-Rad57 et donc que chaque complexe pouvait se substituer à l'autre dans un contexte mutant. La combinaison des deux allèles, *rad57-Q207K* et *rad52-Y376A*, entraîne des effets synergiques (**Figure R21**). Ainsi, dans le mutant *rad57-Q207K*, Rad52 compense le défaut de Rad55-Rad57. Dans le mutant *rad52-Y376A*, Rad55-Rad57 compense le défaut de Rad52. Nous observons que la grande sensibilité aux dommages à l'ADN du double mutant *rad57-Q207K rad52-Y376A* est en grande partie due à l'activité déstabilisatrice de Srs2 : le triple mutant *rad57-Q207K rad52-Y376A srs2 Δ* n'est pas sensible au MMS et légèrement sensible aux rayonnements γ (**Figure R21B et C**). Ces résultats nous indiquent que l'interaction entre Rad55-Rad57 et le motif FVTA de Rad51 participe à la protection contre Srs2. Cette protection n'est probablement pas un blocage direct de Srs2 par Rad55-Rad57. En effet, tandis que Rad55-Rad57 interagit avec l'extrémité 5' du filament

Rad51, Srs2 désassemble le filament à partir de son extrémité 3' (Dupaigne et al., 2008). Une étude en molécule unique indique plutôt que Rad55-Rad57 stimule un réassemblage rapide du filament à la suite de Srs2 (Roy et al., 2021). Nous proposons donc que ce réassemblage rapide est dû à l'interaction entre Rad55-Rad57 et le motif FVTA de Rad51 (**Figure D4**). La perte de cette interaction est compensée par Rad52 au travers d'un mécanisme qu'il nous reste à comprendre : blocage direct de Srs2 par Rad52 ou bien recrutement compensatoire de Rad51. Nous avons également observé un effet synergique entre *rad52-Y376A* et *rad55Δ* mais cet effet est indépendant de Srs2 (**Figure R22**). L'installation du filament Rad51 dans le double mutant est compromise et la réparation des CDB n'est plus assurée par la RH. Un rôle majeur de Rad55-Rad57 pourrait donc être le déplacement de RPA et ce rôle pourrait être indépendant de l'interaction avec Rad51 qu'il aide pourtant à installer. La collaboration que nous décrivons pour la première fois entre Rad52 et Rad55-Rad57 *in vivo* à la fois sur l'installation du filament et sur sa protection ouvre de nouvelles perspectives sur le rôle de RAD52 humaine. En effet, RAD52 est essentielle dans des cellules humaines déficientes pour les paralogues de RAD51, RAD51B,C,D et XRCC2,3 (Hanamshet et al., 2016). En particulier, il est envisageable que CX3 interagissant avec le motif FTTA de RAD51 participe à la protection des fourches de réplication bloquées contre les exonucléases mais également les anti-recombinases telle que FIGNL1, et que cette protection se fasse en collaboration avec RAD52.

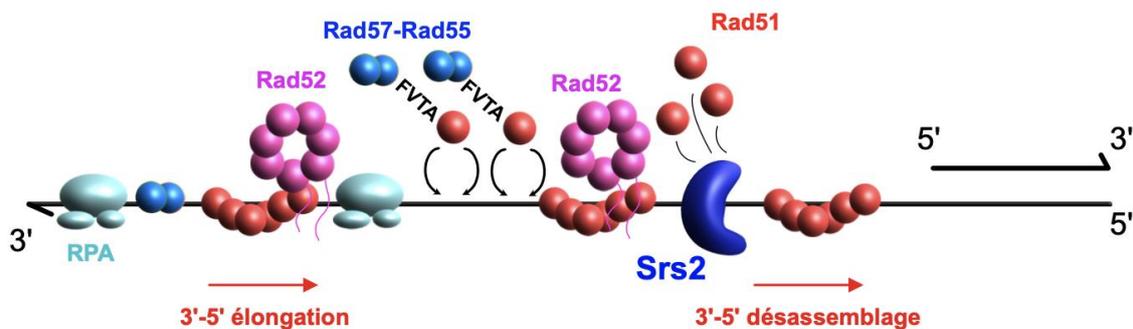


Figure D4. Modèle d'action pour Rad55-Rad57 et Rad52 dans la formation des filaments Rad51 et leur protection contre Srs2.

L'interaction entre Rad57 et Rad51 est symbolisée par le motif FVTA. Tandis que Srs2 désassemble le filament, Rad55-Rad57 permet sa réinstallation rapide grâce à son interaction au motif FVTA de Rad51.

Un défaut de recombinaison hétéro-allélique induite aux UV est observé dans le mutant *rad57-Q207K* (**Figure R24B**), y compris en absence de Srs2 (**Figure R25B**). L'installation des filaments Rad51 sur des brèches simple-brin de l'ADN serait donc déficiente dans ce mutant. Or, ce mutant ne montre aucune sensibilité aux UV, y compris dans un contexte où Polζ est

absente (**Figure R24A**). Pour rendre compte de ces données, nous proposons que Rad55-Rad57-Q207K entraîne un retard dans l'installation du filament permettant alors la prise en charge plus fréquente des brèches simple-brin par les polymérases translésionnelles. La perte de recombinants UV-induits dans le mutant *srs2Δ* indique que le défaut d'installation dans le mutant *rad57-Q207K* favoriserait le recrutement des polymérases même en absence de Srs2. En accord avec notre hypothèse, nous observons un retard dans la résolution des foyers RPA induits après une irradiation aux UV (**Figure R24**).

Contrairement aux mutants du mégacomplexe SHU-Rad55-Rad57, le mutant *rad57-Q207K* n'est associé à une sensibilité ni au MMS, ni à une irradiation aux UV. L'interaction entre Rad55-Rad57 et le motif FVTA de Rad51 ne participerait donc pas à la stabilisation du filament en collaboration avec le complexe SHU. Le modèle que nous avons proposé en **figure D2**, propose une stabilisation à la jonction 5' du filament avec l'ordre SHU-Rad55-Rad57-Rad51. Cet ordre devrait être interrompu par la mutation Rad57-Q207K et le mutant *rad57-Q207K* devrait montrer la même sensibilité au MMS que le mutant *rad55-Δ12Nter* qui conduit à l'interruption du mégacomplexe. Notre modèle structural peut certainement nous apporter des pistes pour tenter de lever cette ambiguïté. Nous observons dans les modèles que le domaine ATPasique de Rad51 est important pour l'interaction entre deux monomères (Conway et al., 2004). Notamment, l'histidine Rad51-His352 participe à l'interaction avec le domaine ATPasique du monomère adjacent (Conway et al., 2004 ; **Figure D5A**). Cette région participe à la fixation de Rad51 à l'ADN et la mutation Rad51-H352A entraîne une baisse drastique de la fixation de la protéine sur l'ADNsb (Conway et al., 2004). Nous proposons donc que le mégacomplexe SHU-Rad55-Rad57 interagisse avec le résidu His352 de Rad51 sur l'ADNsb. Dans notre modèle, les résidus de Rad57 qui seraient impliqués dans l'interaction avec Rad51-H352 sont le glutamate E161 et la serine S137 (**Figure D5B**). L'étude des mutations de ces deux résidus est en cours au laboratoire. Cette étude est prometteuse puisque les résultats pourront peut-être éclairer le rôle de l'interaction entre RAD51B du complexe BCDX2 et RAD51. Cette interaction ne fait pas intervenir le motif FTTA de RAD51 mais les domaines ATPasiques (Greenhough et al., 2023; Rawal et al., 2023). Par ailleurs, notre modèle suggère que la boucle interne non-conservée de Rad57, de la position 330 à la position 380, serait en interaction avec le quatrième monomère de Rad51 du filament à partir de Rad57 (**Figure D5C**). De même, une boucle interne de Rad55, de la position 276 à la position 297, serait également en interaction avec ce même quatrième monomère. Rad55-Rad57 pourrait donc former une pince autour de ce monomère et stabiliser un filament déjà formé, indépendamment de

l'interaction avec le motif FVTA de Rad51. L'étude de ces boucles sera déterminante pour mieux comprendre l'implication de l'interaction entre Rad55-Rad57 et Rad51 dans les différents rôles que nous pouvons désormais attribuer aux complexes de paralogues de Rad51.

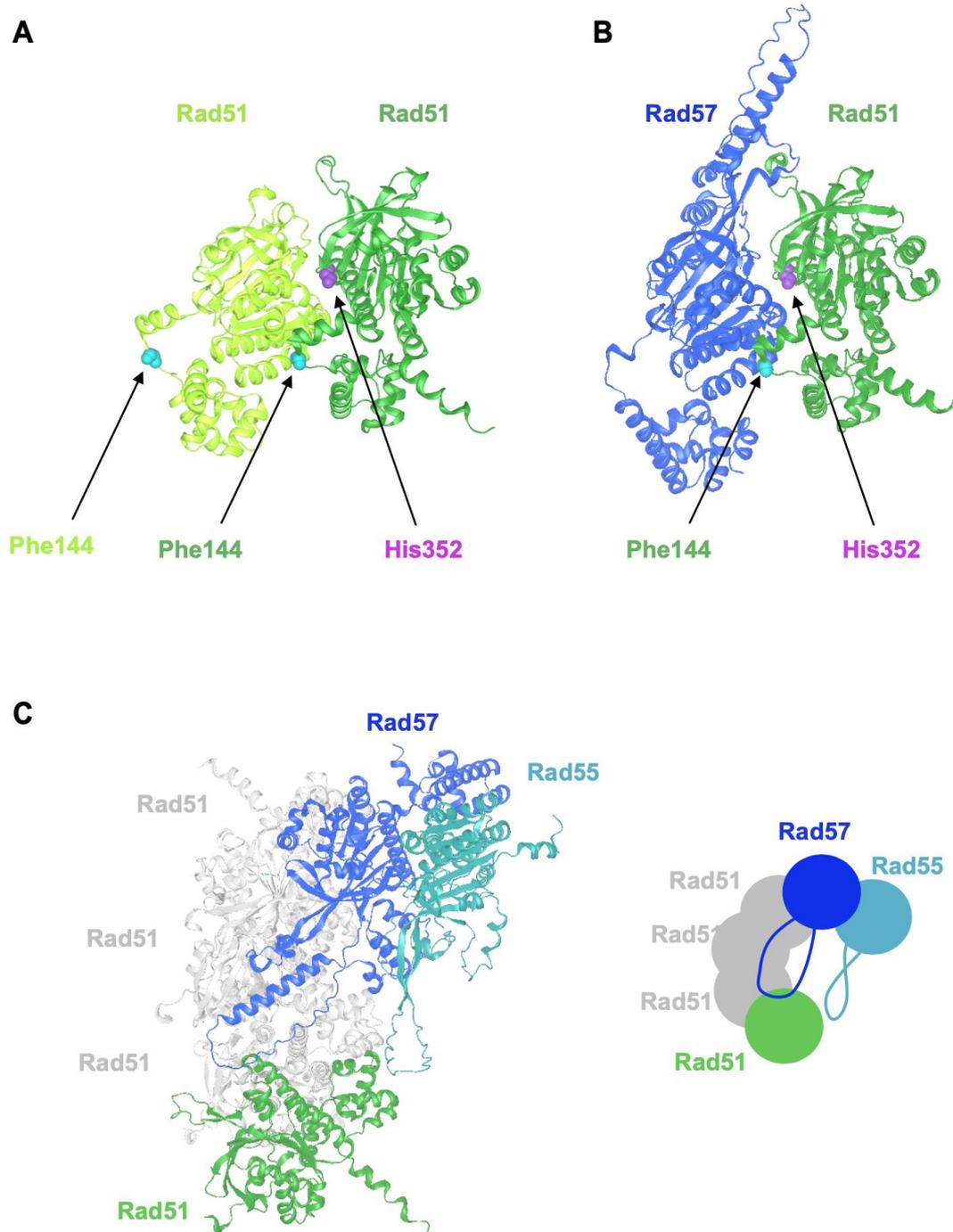


Figure D5. Modèles d'interaction entre Rad55-Rad57 et le filament Rad51.

- (A) Deux domaines d'interaction entre deux monomères de Rad51 : Phe144 indique la position du motif FVTA. His352 interagit avec le domaine ATPasique du monomère adjacent.
- (B) Phe144 et His352 définissent deux domaines potentiels d'interaction avec Rad57.
- (C) Selon le modèle, deux boucles internes non conservées dans Rad57 et dans Rad55 pourraient interagir avec le quatrième Rad51 du filament en partant de Rad57.

Bibliographie

- Aboussekhra, A., Chanet, R., Adjiri, A., & Fabre, F. (1992). Semidominant suppressors of Srs2 helicase mutations of *Saccharomyces cerevisiae* map in the RAD51 gene, whose sequence predicts a protein with similarities to procaryotic RecA proteins. *Molecular and Cellular Biology*, *12*(7), 3224-3234. <https://doi.org/10.1128/mcb.12.7.3224-3234.1992>
- Aboussekhra, A., Chanet, R., Zgaga, Z., Cassier-Chauvat, C., Heude, M., & Fabre, F. (1989). RADH , a gene of *Saccharomyces cerevisiae* encoding a putative DNA helicase involved in DNA repair. Characteristics of radH mutants and sequence of the gene. *Nucleic Acids Research*, *17*(18), 7211-7219. <https://doi.org/10.1093/nar/17.18.7211>
- Abreu, C. M., Prakash, R., Romanienko, P. J., Roig, I., Keeney, S., & Jasin, M. (2018). Shu complex SWS1-SWSAP1 promotes early steps in mouse meiotic recombination. *Nature Communications*, *9*(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-06384-x>
- Adolph, M. B., Garje, A. S., Balakrishnan, S., Morati, F., Modesti, M., Chazin, W. J., & Cortez, D. (2023). CRISPR-dependent Base Editing Screens Identify Separation of Function Mutants of RADX with Altered RAD51 Regulatory Activity. *Journal of Molecular Biology*, *435*(19), 168236. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2023.168236>
- Adolph, M. B., Mohamed, T. M., Balakrishnan, S., Xue, C., Morati, F., Modesti, M., Greene, E. C., Chazin, W. J., & Cortez, D. (2021). RADX controls RAD51 filament dynamics to regulate replication fork stability. *Molecular Cell*, *81*(5), 1074-1083.e5. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2020.12.036>
- Afshar, N., Argunhan, B., Palihati, M., Taniguchi, G., Tsubouchi, H., & Iwasaki, H. (2021). A novel motif of Rad51 serves as an interaction hub for recombination auxiliary factors. *eLife*, *10*, e64131. <https://doi.org/10.7554/eLife.64131>
- Aguilera, A., & Klein, H. L. (1988). Genetic control of intrachromosomal recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. I. Isolation and genetic characterization of hyper-recombination mutations. *Genetics*, *119*(4), 779-790. <https://doi.org/10.1093/genetics/119.4.779>
- Aihara, H., Ito, Y., Kurumizaka, H., Yokoyama, S., & Shibata, T. (1999). The N-terminal domain of the human Rad51 protein binds DNA : Structure and a DNA binding surface as revealed by NMR1 Edited by P. E. Wright. *Journal of Molecular Biology*, *290*(2), 495-504. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1999.2904>
- Akamatsu, Y., Dziadkowiec, D., Ikeguchi, M., Shinagawa, H., & Iwasaki, H. (2003). Two different Swi5-containing protein complexes are involved in mating-type switching and recombination repair in fission yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *100*(26), 15770-15775. <https://doi.org/10.1073/pnas.2632890100>
- Akamatsu, Y., Tsutsui, Y., Morishita, T., Siddique, M. S. P., Kurokawa, Y., Ikeguchi, M., Yamao, F., Arcangioli, B., & Iwasaki, H. (2007). Fission yeast Swi5/Sfr1 and Rhp55/Rhp57 differentially regulate Rhp51-dependent recombination outcomes. *The EMBO Journal*, *26*(5), 1352-1362. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601582>
- Alani, E., Thresher, R., Griffith, J. D., & Kolodner, R. D. (1992). Characterization of DNA-binding and strand-exchange stimulation properties of γ -RPA, a yeast single-strand-DNA-binding protein. *Journal of Molecular Biology*, *227*(1), 54-71. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(92\)90681-9](https://doi.org/10.1016/0022-2836(92)90681-9)
- Albala, J. S., Thelen, M. P., Prange, C., Fan, W., Christensen, M., Thompson, L. H., & Lennon, G. G. (1997). Identification of a Novel HumanRAD51Homolog,RAD51B. *Genomics*, *46*(3), 476-479. <https://doi.org/10.1006/geno.1997.5062>
- Alexeev, A., Mazin, A., & Kowalczykowski, S. C. (2003). Rad54 protein possesses chromatin-remodeling activity stimulated by the Rad51-ssDNA nucleoprotein filament. *Nature Structural & Molecular Biology*, *10*(3), Article 3. <https://doi.org/10.1038/nsb901>
- Alexiadis, V., Lusser, A., & Kadonaga, J. T. (2004). A Conserved N-terminal Motif in Rad54 Is Important for Chromatin Remodeling and Homologous Strand Pairing*. *Journal of Biological Chemistry*, *279*(26), 27824-27829. <https://doi.org/10.1074/jbc.M402648200>
- Allers, T., & Lichten, M. (2001). Differential Timing and Control of Noncrossover and Crossover Recombination during Meiosis. *Cell*, *106*(1), 47-57. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(01\)00416-0](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(01)00416-0)

- Altmannova, V., Eckert-Boulet, N., Arneric, M., Kolesar, P., Chaloupkova, R., Damborsky, J., Sung, P., Zhao, X., Lisby, M., & Krejci, L. (2010). Rad52 SUMOylation affects the efficiency of the DNA repair. *Nucleic Acids Research*, *38*(14), 4708-4721. <https://doi.org/10.1093/nar/gkq195>
- Amitani, I., Baskin, R. J., & Kowalczykowski, S. C. (2006). Visualization of Rad54, a Chromatin Remodeling Protein, Translocating on Single DNA Molecules. *Molecular Cell*, *23*(1), 143-148. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2006.05.009>
- Anand, R., Jasrotia, A., Bundschuh, D., Howard, S. M., Ranjha, L., Stucki, M., & Cejka, P. (2019). NBS1 promotes the endonuclease activity of the MRE11-RAD50 complex by sensing CtIP phosphorylation. *The EMBO Journal*, *38*(7), e101005. <https://doi.org/10.15252/embj.2018101005>
- Anand, R. P., Tsaponina, O., Greenwell, P. W., Lee, C.-S., Du, W., Petes, T. D., & Haber, J. E. (2014). Chromosome rearrangements via template switching between diverged repeated sequences. *Genes & Development*, *28*(21), 2394-2406. <https://doi.org/10.1101/gad.250258.114>
- Anand, R., Ranjha, L., Cannavo, E., & Cejka, P. (2016). Phosphorylated CtIP Functions as a Co-factor of the MRE11-RAD50-NBS1 Endonuclease in DNA End Resection. *Molecular Cell*, *64*(5), 940-950. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.10.017>
- Antony, E., Tomko, E. J., Xiao, Q., Krejci, L., Lohman, T. M., & Ellenberger, T. (2009). Srs2 Disassembles Rad51 Filaments by a Protein-Protein Interaction Triggering ATP Turnover and Dissociation of Rad51 from DNA. *Molecular Cell*, *35*(1), 105-115. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2009.05.026>
- Appleby, R., Joudeh, L., Cobbett, K., & Pellegrini, L. (2023). Structural basis for stabilisation of the RAD51 nucleoprotein filament by BRCA2. *Nature Communications*, *14*(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-42830-1>
- Argunhan, B., Sakakura, M., Afshar, N., Kurihara, M., Ito, K., Maki, T., Kanamaru, S., Murayama, Y., Tsubouchi, H., Takahashi, M., Takahashi, H., & Iwasaki, H. (2020). Cooperative interactions facilitate stimulation of Rad51 by the Swi5-Sfr1 auxiliary factor complex. *eLife*, *9*, e52566. <https://doi.org/10.7554/eLife.52566>
- Armstrong, A. A., Mohideen, F., & Lima, C. D. (2012). Recognition of SUMO-modified PCNA requires tandem receptor motifs in Srs2. *Nature*, *483*(7387), Article 7387. <https://doi.org/10.1038/nature10883>
- Asleson, E. N., Okagaki, R. J., & Livingston, D. M. (1999). A Core Activity Associated with the N Terminus of the Yeast RAD52 Protein Is Revealed by RAD51 Overexpression Suppression of C-Terminal rad52 Truncation Alleles. *Genetics*, *153*(2), 681-692. <https://doi.org/10.1093/genetics/153.2.681>
- Aylon, Y., Liefshitz, B., & Kupiec, M. (2004). The CDK regulates repair of double-strand breaks by homologous recombination during the cell cycle. *The EMBO Journal*, *23*(24), 4868-4875. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600469>
- Bai, Y., & Symington, L. S. (1996). A Rad52 homolog is required for RAD51-independent mitotic recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes & Development*, *10*(16), 2025-2037. <https://doi.org/10.1101/gad.10.16.2025>
- Baldock, R. A., Pressimone, C. A., Baird, J. M., Khodakov, A., Luong, T. T., Grundy, M. K., Smith, C. M., Karpenshif, Y., Bratton-Palmer, D. S., Prakash, R., Jasin, M., Garcin, E. B., Gon, S., Modesti, M., & Bernstein, K. A. (2019). RAD51D splice variants and cancer-associated mutations reveal XRCC2 interaction to be critical for homologous recombination. *DNA Repair*, *76*, 99-107. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2019.02.008>
- Ball, L. G., Zhang, K., Cobb, J. A., Boone, C., & Xiao, W. (2009). The yeast Shu complex couples error-free post-replication repair to homologous recombination. *Molecular Microbiology*, *73*(1), 89-102. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2009.06748.x>
- Barber, L. J., Youds, J. L., Ward, J. D., McIlwraith, M. J., O'Neil, N. J., Petalcorin, M. I. R., Martin, J. S., Collis, S. J., Cantor, S. B., Auclair, M., Tissenbaum, H., West, S. C., Rose, A. M., & Boulton, S. J. (2008). RTEL1 Maintains Genomic Stability by Suppressing Homologous Recombination. *Cell*, *135*(2), 261-271. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.08.016>

- Bashkirov, V. I., Herzberg, K., Haghazari, E., Vlasenko, A. S., & Heyer, W. (2006). DNA Damage-Induced Phosphorylation of Rad55 Protein as a Sentinel for DNA Damage Checkpoint Activation in *S. cerevisiae*. In *Methods in Enzymology* (Vol. 409, p. 166-182). Academic Press. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(05\)09010-5](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(05)09010-5)
- Bashkirov, V. I., King, J. S., Bashkirova, E. V., Schmuckli-Maurer, J., & Heyer, W.-D. (2000). DNA Repair Protein Rad55 Is a Terminal Substrate of the DNA Damage Checkpoints. *Molecular and Cellular Biology*, *20*(12), 4393-4404. <https://doi.org/10.1128/MCB.20.12.4393-4404.2000>
- Basile, G., Aker, M., & Mortimer, R. K. (1992). Nucleotide sequence and transcriptional regulation of the yeast recombinational repair gene RAD51. *Molecular and Cellular Biology*, *12*(7), 3235-3246. <https://doi.org/10.1128/mcb.12.7.3235-3246.1992>
- Bastin-Shanower, S. A., Fricke, W. M., Mullen, J. R., & Brill, S. J. (2003). The Mechanism of Mus81-Mms4 Cleavage Site Selection Distinguishes It from the Homologous Endonuclease Rad1-Rad10. *Molecular and Cellular Biology*, *23*(10), 3487-3496. <https://doi.org/10.1128/MCB.23.10.3487-3496.2003>
- Batté, A., Brocas, C., Bordelet, H., Hocher, A., Ruault, M., Adjiri, A., Taddei, A., & Dubrana, K. (2017). Recombination at subtelomeres is regulated by physical distance, double-strand break resection and chromatin status. *The EMBO Journal*, *36*(17), 2609-2625. <https://doi.org/10.15252/emj.201796631>
- Baudin, A., Ozier-Kalogeropoulos, O., Denouel, A., Lacroute, F., & Cullin, C. (1993). A simple and efficient method for direct gene deletion in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Research*, *21*(14), 3329-3330. <https://doi.org/10.1093/nar/21.14.3329>
- Baumann, P., & West, S. C. (1997). The human Rad51 protein : Polarity of strand transfer and stimulation by hRP-A. *The EMBO Journal*, *16*(17), 5198-5206. <https://doi.org/10.1093/emboj/16.17.5198>
- Belan, O., Barroso, C., Kaczmarczyk, A., Anand, R., Federico, S., O'Reilly, N., Newton, M. D., Maeots, E., Enchev, R. I., Martinez-Perez, E., Rueda, D. S., & Boulton, S. J. (2021). Single-molecule analysis reveals cooperative stimulation of Rad51 filament nucleation and growth by mediator proteins. *Molecular Cell*, *81*(5), 1058-1073.e7. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2020.12.020>
- Belan, O., Greenhough, L., Kuhlen, L., Anand, R., Kaczmarczyk, A., Gruszka, D. T., Yardimci, H., Zhang, X., Rueda, D. S., West, S. C., & Boulton, S. J. (2023). Visualization of direct and diffusion-assisted RAD51 nucleation by full-length human BRCA2 protein. *Molecular Cell*, *83*(16), 2925-2940.e8. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2023.06.031>
- Bennett, R. J., Noirot-Gros, M.-F., & Wang, J. C. (2000). Interaction between Yeast Sgs1 Helicase and DNA Topoisomerase III*. *Journal of Biological Chemistry*, *275*(35), 26898-26905. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)61459-6](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)61459-6)
- Benson, F. e., Stasiak, A., & West, S. c. (1994). Purification and characterization of the human Rad51 protein, an analogue of *E. coli* RecA. *The EMBO Journal*, *13*(23), 5764-5771. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1994.tb06914.x>
- Bernstein, K. A., Gangloff, S., & Rothstein, R. (2010). The RecQ DNA Helicases in DNA Repair. *Annual Review of Genetics*, *44*(1), 393-417. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-102209-163602>
- Bernstein, K. A., Reid, R. J. D., Sunjevaric, I., Demuth, K., Burgess, R. C., & Rothstein, R. (2011). The Shu complex, which contains Rad51 paralogues, promotes DNA repair through inhibition of the Srs2 anti-recombinase. *Molecular Biology of the Cell*, *22*(9), 1599-1607. <https://doi.org/10.1091/mbc.E10-08-0691>
- Berti, M., Cortez, D., & Lopes, M. (2020). The plasticity of DNA replication forks in response to clinically relevant genotoxic stress. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *21*(10), Article 10. <https://doi.org/10.1038/s41580-020-0257-5>
- Bertrand, P., Tishkoff, D. X., Filosi, N., Dasgupta, R., & Kolodner, R. D. (1998). Physical interaction between components of DNA mismatch repair and nucleotide excision repair. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *95*(24), 14278-14283. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.24.14278>

- Bhat, K. P., & Cortez, D. (2018). RPA and RAD51 : Fork reversal, fork protection, and genome stability. *Nature Structural & Molecular Biology*, 25(6), 446-453. <https://doi.org/10.1038/s41594-018-0075-z>
- Bhat, K. P., Krishnamoorthy, A., Dungrawala, H., Garcin, E. B., Modesti, M., & Cortez, D. (2018). RADX Modulates RAD51 Activity to Control Replication Fork Protection. *Cell Reports*, 24(3), 538-545. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.06.061>
- 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., & Doherty, A. J. (2013). PrimPol Bypasses UV Photoproducts during Eukaryotic Chromosomal DNA Replication. *Molecular Cell*, 52(4), 566-573. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2013.10.035>
- Bianco, P. R., Tracy, R. B., & Kowalczykowski, S. C. (1998). DNA strand exchange proteins : A biochemical and physical comparison. *Frontiers in Bioscience-Landmark*, 3(4), Article 4. <https://doi.org/10.2741/A304>
- Binz, S. K., Lao, Y., Lowry, D. F., & Wold, M. S. (2003). The phosphorylation domain of the 32-kDa subunit of replication protein A (RPA) modulates RPA-DNA interactions. Evidence for an intersubunit interaction. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(37), 35584-35591. <https://doi.org/10.1074/jbc.M305388200>
- Bishop, D. K. (1994). RecA homologs Dmc1 and Rad51 interact to form multiple nuclear complexes prior to meiotic chromosome synapsis. *Cell*, 79(6), 1081-1092. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(94\)90038-8](https://doi.org/10.1016/0092-8674(94)90038-8)
- Bishop, D. K. (2012). Rad51, the lead in mitotic recombinational DNA repair, plays a supporting role in budding yeast meiosis. *Cell Cycle*, 11(22), 4105-4106. <https://doi.org/10.4161/cc.22396>
- Bishop, D. K., Park, D., Xu, L., & Kleckner, N. (1992). DMC1 : A meiosis-specific yeast homolog of E. coli recA required for recombination, synaptonemal complex formation, and cell cycle progression. *Cell*, 69(3), 439-456. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(92\)90446-J](https://doi.org/10.1016/0092-8674(92)90446-J)
- Bizard, A. H., & Hickson, I. D. (2014). The Dissolution of Double Holliday Junctions. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 6(7), a016477. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a016477>
- Blanco, M. G., Matos, J., Rass, U., Ip, S. C. Y., & West, S. C. (2010). Functional overlap between the structure-specific nucleases Yen1 and Mus81-Mms4 for DNA-damage repair in *S. cerevisiae*. *DNA Repair*, 9(4), 394-402. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2009.12.017>
- Bochkareva, E., Korolev, S., Lees-Miller, S. P., & Bochkarev, A. (2002). Structure of the RPA trimerization core and its role in the multistep DNA-binding mechanism of RPA. *The EMBO Journal*, 21(7), 1855-1863. <https://doi.org/10.1093/emboj/21.7.1855>
- Boni, J., Idani, A., Roca, C., Feliubadaló, L., Tomiak, E., Weber, E., Foulkes, W. D., Orthwein, A., El Haffaf, Z., Lazaro, C., & Rivera, B. (2022). A decade of RAD51C and RAD51D germline variants in cancer. *Human Mutation*, 43(3), 285-298. <https://doi.org/10.1002/humu.24319>
- Bonilla, B., Brown, A. J., Hengel, S. R., Rapchak, K. S., Mitchell, D., Pressimone, C. A., Fagunloye, A. A., Luong, T. T., Russell, R. A., Vyas, R. K., Mertz, T. M., Zaher, H. S., Mosammamarast, N., Malc, E. P., Mieczkowski, P. A., Roberts, S. A., & Bernstein, K. A. (2021). The Shu complex prevents mutagenesis and cytotoxicity of single-strand specific alkylation lesions. *eLife*, 10, e68080. <https://doi.org/10.7554/eLife.68080>
- Bosco, G., & Haber, J. E. (1998). Chromosome Break-Induced DNA Replication Leads to Nonreciprocal Translocations and Telomere Capture. *Genetics*, 150(3), 1037-1047. <https://doi.org/10.1093/genetics/150.3.1037>
- Boulet, A., Simon, M., Faye, G., Bauer, G. A., & Burgers, P. M. (1989). Structure and function of the *Saccharomyces cerevisiae* CDC2 gene encoding the large subunit of DNA polymerase III. *The EMBO Journal*, 8(6), 1849-1854. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1989.tb03580.x>
- Branzei, D., & Foiani, M. (2010). Maintaining genome stability at the replication fork. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 11(3), 208-219. <https://doi.org/10.1038/nrm2852>
- Branzei, D., & Psakhye, I. (2016). DNA damage tolerance. *Current Opinion in Cell Biology*, 40, 137-144. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2016.03.015>

- Branzei, D., & Szakal, B. (2016). DNA damage tolerance by recombination : Molecular pathways and DNA structures. *DNA Repair*, *44*, 68-75. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2016.05.008>
- Branzei, D., Vanoli, F., & Foiani, M. (2008). SUMOylation regulates Rad18-mediated template switch. *Nature*, *456*(7224), Article 7224. <https://doi.org/10.1038/nature07587>
- Braybrooke, J. P., Spink, K. G., Thacker, J., & Hickson, I. D. (2000). The RAD51 family member, RAD51L3, is a DNA-stimulated ATPase that forms a complex with XRCC2. *The Journal of Biological Chemistry*, *275*(37), 29100-29106. <https://doi.org/10.1074/jbc.M002075200>
- Brill, S. J., & Stillman, B. (1989). Yeast replication factor-A functions in the unwinding of the SV40 origin of DNA replication. *Nature*, *342*(6245), Article 6245. <https://doi.org/10.1038/342092a0>
- Brill, S. J., & Stillman, B. (1991). Replication factor-A from *Saccharomyces cerevisiae* is encoded by three essential genes coordinately expressed at S phase. *Genes & Development*, *5*(9), 1589-1600. <https://doi.org/10.1101/gad.5.9.1589>
- Brocas, C., Charbonnier, J.-B., Dhérin, C., Gangloff, S., & Maloisel, L. (2010). Stable interactions between DNA polymerase δ catalytic and structural subunits are essential for efficient DNA repair. *DNA Repair*, *9*(10), 1098-1111. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2010.07.013>
- Bronstein, A., Gershon, L., Grinberg, G., Alonso-Perez, E., & Kupiec, M. (2018). The Main Role of Srs2 in DNA Repair Depends on Its Helicase Activity, Rather than on Its Interactions with PCNA or Rad51. *mBio*, *9*(4), 10.1128/mbio.01192-18. <https://doi.org/10.1128/mbio.01192-18>
- Brouwer, I., Moschetti, T., Candelli, A., Garcin, E. B., Modesti, M., Pellegrini, L., Wuite, G. J., & Peterman, E. J. (2018). Two distinct conformational states define the interaction of human RAD51-ATP with single-stranded DNA. *The EMBO Journal*, *37*(7), e98162. <https://doi.org/10.15252/emj.201798162>
- Brush, G. S., & Kelly, T. J. (2000). Phosphorylation of the replication protein A large subunit in the *Saccharomyces cerevisiae* checkpoint response. *Nucleic Acids Research*, *28*(19), 3725-3732. <https://doi.org/10.1093/nar/28.19.3725>
- 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. *Nature*, *434*(7035), Article 7035. <https://doi.org/10.1038/nature03443>
- Bugreev, D. V., & Mazin, A. V. (2004). Ca²⁺ activates human homologous recombination protein Rad51 by modulating its ATPase activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *101*(27), 9988-9993. <https://doi.org/10.1073/pnas.0402105101>
- Bugreev, D. V., Mazina, O. M., & Mazin, A. V. (2006). Rad54 protein promotes branch migration of Holliday junctions. *Nature*, *442*(7102), Article 7102. <https://doi.org/10.1038/nature04889>
- Bugreev, D. V., Yu, X., Egelman, E. H., & Mazin, A. V. (2007). Novel pro- and anti-recombination activities of the Bloom's syndrome helicase. *Genes & Development*, *21*(23), 3085-3094. <https://doi.org/10.1101/gad.1609007>
- Burgess, R. C., Lisby, M., Altmannova, V., Krejci, L., Sung, P., & Rothstein, R. (2009). Localization of recombination proteins and Srs2 reveals anti-recombinase function in vivo. *Journal of Cell Biology*, *185*(6), 969-981. <https://doi.org/10.1083/jcb.200810055>
- Burkovics, P., Dome, L., Juhasz, S., Altmannova, V., Sebesta, M., Pacesa, M., Fugger, K., Sorensen, C. S., Lee, M. Y. W. T., Haracska, L., & Krejci, L. (2016). The PCNA-associated protein PARI negatively regulates homologous recombination via the inhibition of DNA repair synthesis. *Nucleic Acids Research*, *44*(7), 3176-3189. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw024>
- Buzovetsky, O., Kwon, Y., Pham, N. T., Kim, C., Ira, G., Sung, P., & Xiong, Y. (2017). Role of the Pif1-PCNA Complex in Pol δ -Dependent Strand Displacement DNA Synthesis and Break-Induced Replication. *Cell Reports*, *21*(7), 1707-1714. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.10.079>
- Cabello-Lobato, M. J., González-Garrido, C., Cano-Linares, M. I., Wong, R. P., Yáñez-Vílchez, A., Morillo-Huesca, M., Roldán-Romero, J. M., Vicioso, M., González-Prieto, R., Ulrich, H. D., & Prado, F. (2021). Physical interactions between MCM and Rad51 facilitate replication fork lesion bypass and ssDNA gap filling by non-recombinogenic functions. *Cell Reports*, *36*(4). <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2021.109440>

- Caldwell, C. C., & Spies, M. (2020). Dynamic elements of replication protein A at the crossroads of DNA replication, recombination, and repair. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 55(5), 482-507. <https://doi.org/10.1080/10409238.2020.1813070>
- Candelli, A., Holthausen, J. T., Depken, M., Brouwer, I., Franker, M. A. M., Marchetti, M., Heller, I., Bernard, S., Garcin, E. B., Modesti, M., Wyman, C., Wuite, G. J. L., & Peterman, E. J. G. (2014). Visualization and quantification of nascent RAD51 filament formation at single-monomer resolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(42), 15090-15095. <https://doi.org/10.1073/pnas.1307824111>
- Cannavo, E., & Cejka, P. (2014). Sae2 promotes dsDNA endonuclease activity within Mre11–Rad50–Xrs2 to resect DNA breaks. *Nature*, 514(7520), Article 7520. <https://doi.org/10.1038/nature13771>
- Cannavo, E., Cejka, P., & Kowalczykowski, S. C. (2013). Relationship of DNA degradation by *Saccharomyces cerevisiae* Exonuclease 1 and its stimulation by RPA and Mre11–Rad50–Xrs2 to DNA end resection. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(18), E1661–E1668. <https://doi.org/10.1073/pnas.1305166110>
- Cannavo, E., Johnson, D., Andres, S. N., Kissling, V. M., Reinert, J. K., Garcia, V., Erie, D. A., Hess, D., Thomä, N. H., Enchev, R. I., Peter, M., Williams, R. S., Neale, M. J., & Cejka, P. (2018). Regulatory control of DNA end resection by Sae2 phosphorylation. *Nature Communications*, 9(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-06417-5>
- Cannavo, E., Reginato, G., & Cejka, P. (2019). Stepwise 5' DNA end-specific resection of DNA breaks by the Mre11–Rad50–Xrs2 and Sae2 nuclease ensemble. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 116(12), 5505–5513. <https://doi.org/10.1073/pnas.1820157116>
- Cannon, B., Kuhnlein, J., Yang, S.-H., Cheng, A., Schindler, D., Stark, J. M., Russell, R., & Paull, T. T. (2013). Visualization of local DNA unwinding by Mre11/Rad50/Nbs1 using single-molecule FRET. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(47), 18868–18873. <https://doi.org/10.1073/pnas.1309816110>
- Carney, J. P., Maser, R. S., Olivares, H., Davis, E. M., Beau, M. L., Yates, J. R., Hays, L., Morgan, W. F., & Petrini, J. H. J. (1998). The hMre11/hRad50 Protein Complex and Nijmegen Breakage Syndrome : Linkage of Double-Strand Break Repair to the Cellular DNA Damage Response. *Cell*, 93(3), 477–486. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81175-7](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81175-7)
- Carreira, A., & Kowalczykowski, S. C. (2011). Two classes of BRC repeats in BRCA2 promote RAD51 nucleoprotein filament function by distinct mechanisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(26), 10448–10453. <https://doi.org/10.1073/pnas.1106971108>
- Cartwright, R., Tambini, C. E., Simpson, P. J., & Thacker, J. (1998). The XRCC2 DNA repair gene from human and mouse encodes a novel member of the recA/RAD51 family. *Nucleic Acids Research*, 26(13), 3084–3089.
- Cassani, C., Vertemara, J., Bassani, M., Marsella, A., Tisi, R., Zampella, G., & Longhese, M. P. (2019). The ATP-bound conformation of the Mre11–Rad50 complex is essential for Tel1/ATM activation. *Nucleic Acids Research*, 47(7), 3550–3567. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz038>
- 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(2), 221–233. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2013.08.036>
- Ceballos, S. J., & Heyer, W.-D. (2011). Functions of the Snf2/Swi2 family Rad54 motor protein in homologous recombination. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms*, 1809(9), 509–523. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2011.06.006>
- Cejka, P., Cannavo, E., Polaczek, P., Masuda-Sasa, T., Pokharel, S., Campbell, J. L., & Kowalczykowski, S. C. (2010). DNA end resection by Dna2–Sgs1–RPA and its stimulation by Top3–Rmi1 and Mre11–Rad50–Xrs2. *Nature*, 467(7311), Article 7311. <https://doi.org/10.1038/nature09355>
- Cejka, P., Plank, J. L., Bachrati, C. Z., Hickson, I. D., & Kowalczykowski, S. C. (2010). Rmi1 stimulates decatenation of double Holliday junctions during dissolution by Sgs1–Top3. *Nature Structural & Molecular Biology*, 17(11), Article 11. <https://doi.org/10.1038/nsmb.1919>

- Chan, Y. W., & West, S. (2015). GEN1 promotes Holliday junction resolution by a coordinated nick and counter-nick mechanism. *Nucleic Acids Research*, *43*(22), 10882-10892. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv1207>
- Chan, Y.-L., Zhang, A., Weissman, B. P., & Bishop, D. K. (2019). RPA resolves conflicting activities of accessory proteins during reconstitution of Dmc1-mediated meiotic recombination. *Nucleic Acids Research*, *47*(2), 747-761. <https://doi.org/10.1093/nar/gky1160>
- Chanet, R., Heude, M., Adjiri, A., Maloisel, L., & Fabre, F. (1996). Semidominant Mutations in the Yeast Rad51 Protein and Their Relationships with the Srs2 Helicase. *Molecular and Cellular Biology*, *16*(9), 4782-4789. <https://doi.org/10.1128/MCB.16.9.4782>
- Chang, M., Bellaoui, M., Zhang, C., Desai, R., Morozov, P., Delgado-Cruzata, L., Rothstein, R., Freyer, G. A., Boone, C., & Brown, G. W. (2005). RMI1/NCE4, a suppressor of genome instability, encodes a member of the RecQ helicase/Topo III complex. *The EMBO Journal*, *24*(11), 2024-2033. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600684>
- Chen, C.-C., Feng, W., Lim, P. X., Kass, E. M., & Jasin, M. (2018). Homology-Directed Repair and the Role of BRCA1, BRCA2, and Related Proteins in Genome Integrity and Cancer. *Annual Review of Cancer Biology*, *2*(1), 313-336. <https://doi.org/10.1146/annurev-cancerbio-030617-050502>
- Chen, H., Lisby, M., & Symington, L. S. (2013). RPA Coordinates DNA End Resection and Prevents Formation of DNA Hairpins. *Molecular Cell*, *50*(4), 589-600. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2013.04.032>
- Chen, L., Trujillo, K., Ramos, W., Sung, P., & Tomkinson, A. E. (2001). Promotion of Dnl4-Catalyzed DNA End-Joining by the Rad50/Mre11/Xrs2 and Hdf1/Hdf2 Complexes. *Molecular Cell*, *8*(5), 1105-1115. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(01\)00388-4](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(01)00388-4)
- Chen, P.-L., Chen, C.-F., Chen, Y., Xiao, J., Sharp, Z. D., & Lee, W.-H. (1998). The BRC repeats in BRCA2 are critical for RAD51 binding and resistance to methyl methanesulfonate treatment. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *95*(9), 5287-5292. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.9.5287>
- Chen, R., & Wold, M. S. (2014). Replication protein A : Single-stranded DNA's first responder: dynamic DNA-interactions allow replication protein A to direct single-strand DNA intermediates into different pathways for synthesis or repair. *BioEssays: News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology*, *36*(12), 1156-1161. <https://doi.org/10.1002/bies.201400107>
- Chi, P., Kwon, Y., Seong, C., Epshtein, A., Lam, I., Sung, P., & Klein, H. L. (2006). Yeast Recombination Factor Rdh54 Functionally Interacts with the Rad51 Recombinase and Catalyzes Rad51 Removal from DNA *. *Journal of Biological Chemistry*, *281*(36), 26268-26279. <https://doi.org/10.1074/jbc.M602983200>
- Chi, P., Van Komen, S., Sehorn, M. G., Sigurdsson, S., & Sung, P. (2006). Roles of ATP binding and ATP hydrolysis in human Rad51 recombinase function. *DNA Repair*, *5*(3), 381-391. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2005.11.005>
- Chien, C. T., Bartel, P. L., Sternglanz, R., & Fields, S. (1991). The two-hybrid system : A method to identify and clone genes for proteins that interact with a protein of interest. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *88*(21), 9578-9582. <https://doi.org/10.1073/pnas.88.21.9578>
- Chiolo, I., Saponaro, M., Baryshnikova, A., Kim, J.-H., Seo, Y.-S., & Liberi, G. (2007). The Human F-Box DNA Helicase FBH1 Faces Saccharomyces cerevisiae Srs2 and Postreplication Repair Pathway Roles. *Molecular and Cellular Biology*, *27*(21), 7439-7450. <https://doi.org/10.1128/MCB.00963-07>
- Chiu, R. K., Brun, J., Ramaekers, C., Theys, J., Weng, L., Lambin, P., Gray, D. A., & Wouters, B. G. (2006). Lysine 63-Polyubiquitination Guards against Translesion Synthesis-Induced Mutations. *PLOS Genetics*, *2*(7), e116. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.0020116>
- Choi, J.-H., Lindsey-Boltz, L. A., Kemp, M., Mason, A. C., Wold, M. S., & Sancar, A. (2010). Reconstitution of RPA-covered single-stranded DNA-activated ATR-Chk1 signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *107*(31), 13660-13665. <https://doi.org/10.1073/pnas.1007856107>

- Chun, J., Buechelmaier, E. S., & Powell, S. N. (2013). Rad51 Paralog Complexes BCDX2 and CX3 Act at Different Stages in the BRCA1-BRCA2-Dependent Homologous Recombination Pathway. *Molecular and Cellular Biology*, 33(2), 387-395. <https://doi.org/10.1128/MCB.00465-12>
- Ciccia, A., & Elledge, S. J. (2010). The DNA Damage Response : Making it safe to play with knives. *Molecular cell*, 40(2), 179-204. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.09.019>
- Clever, B., Interthal, H., Schmuckli-Maurer, J., King, J., Sigrist, M., & Heyer, W.-D. (1997). Recombinational repair in yeast : Functional interactions between Rad51 and Rad54 proteins. *The EMBO Journal*, 16(9), 2535-2544. <https://doi.org/10.1093/emboj/16.9.2535>
- Clever, B., Schmuckli-Maurer, J., Sigrist, M., Glassner, B. J., & Heyer, W.-D. (1999). Specific negative effects resulting from elevated levels of the recombinational repair protein Rad54p in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 15(9), 721-740. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0061\(19990630\)15:9<721::AID-YEA414>3.0.CO;2-W](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0061(19990630)15:9<721::AID-YEA414>3.0.CO;2-W)
- Cloud, V., Chan, Y.-L., Grubb, J., Budke, B., & Bishop, D. K. (2012). Rad51 Is an Accessory Factor for Dmc1-Mediated Joint Molecule Formation During Meiosis. *Science*, 337(6099), 1222-1225. <https://doi.org/10.1126/science.1219379>
- Coïc, E., Gluck, L., & Fabre, F. (2000). Evidence for short-patch mismatch repair in *Saccharomyces cerevisiae*. *The EMBO Journal*, 19(13), 3408-3417. <https://doi.org/10.1093/emboj/19.13.3408>
- Colavito, S., Macris-Kiss, M., Seong, C., Gleeson, O., Greene, E. C., Klein, H. L., Krejci, L., & Sung, P. (2009). Functional significance of the Rad51-Srs2 complex in Rad51 presynaptic filament disruption. *Nucleic Acids Research*, 37(20), 6754-6764. <https://doi.org/10.1093/nar/gkp748>
- Collins, I., & Newlon, C. S. (1994). Meiosis-specific formation of joint DNA molecules containing sequences from homologous chromosomes. *Cell*, 76(1), 65-75. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(94\)90173-2](https://doi.org/10.1016/0092-8674(94)90173-2)
- Colot, V., & Rossignol, J.-L. (1999). Eukaryotic DNA methylation as an evolutionary device. *BioEssays*, 21(5), 402-411. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1521-1878\(199905\)21:5<402::AID-BIES7>3.0.CO;2-B](https://doi.org/10.1002/(SICI)1521-1878(199905)21:5<402::AID-BIES7>3.0.CO;2-B)
- Conway, A. B., Lynch, T. W., Zhang, Y., Fortin, G. S., Fung, C. W., Symington, L. S., & Rice, P. A. (2004). Crystal structure of a Rad51 filament. *Nature Structural & Molecular Biology*, 11(8), 791-796. <https://doi.org/10.1038/nsmb795>
- Cortés-Ledesma, F., & Aguilera, A. (2006). Double-strand breaks arising by replication through a nick are repaired by cohesin-dependent sister-chromatid exchange. *EMBO reports*, 7(9), 919-926. <https://doi.org/10.1038/sj.embor.7400774>
- Cortez, D. (2019). Replication-Coupled DNA Repair. *Molecular Cell*, 74(5), 866-876. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2019.04.027>
- 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. (2014). Break-Induced Replication Repair of Damaged Forks Induces Genomic Duplications in Human Cells. *Science*, 343(6166), 88-91. <https://doi.org/10.1126/science.1243211>
- Crickard, J. B., Kwon, Y., Sung, P., & Greene, E. C. (2020). Rad54 and Rdh54 occupy spatially and functionally distinct sites within the Rad51-ssDNA presynaptic complex. *The EMBO Journal*, 39(20), e105705. <https://doi.org/10.15252/emboj.2020105705>
- Crickard, J. B., Moevus, C. J., Kwon, Y., Sung, P., & Greene, E. C. (2020). Rad54 Drives ATP Hydrolysis-Dependent DNA Sequence Alignment during Homologous Recombination. *Cell*, 181(6), 1380-1394.e18. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.04.056>
- D'Amours, D., & Jackson, S. P. (2002). The MRE11 complex : At the crossroads of DNA repair and checkpoint signalling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 3(5), Article 5. <https://doi.org/10.1038/nrm805>
- Danilowicz, C., Peacock-Villada, A., Vlassakis, J., Facon, A., Feinstein, E., Kleckner, N., & Prentiss, M. (2014). The differential extension in dsDNA bound to Rad51 filaments may play important roles in homology recognition and strand exchange. *Nucleic Acids Research*, 42(1), 526-533. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt867>

- Davis, A. P., & Symington, L. S. (2001). The Yeast Recombinational Repair Protein Rad59 Interacts With Rad52 and Stimulates Single-Strand Annealing. *Genetics*, *159*(2), 515-525. <https://doi.org/10.1093/genetics/159.2.515>
- De Tullio, L., Kaniecki, K., Kwon, Y., Crickard, J. B., Sung, P., & Greene, E. C. (2017). Yeast Srs2 Helicase Promotes Redistribution of Single-Stranded DNA-Bound RPA and Rad52 in Homologous Recombination Regulation. *Cell Reports*, *21*(3), 570-577. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.09.073>
- Deem, A., Barker, K., VanHulle, K., Downing, B., Vayl, A., & Malkova, A. (2008). Defective Break-Induced Replication Leads to Half-Crossovers in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, *179*(4), 1845-1860. <https://doi.org/10.1534/genetics.108.087940>
- Deem, A., Keszthelyi, A., Blackgrove, T., Vayl, A., Coffey, B., Mathur, R., Chabes, A., & Malkova, A. (2011). Break-Induced Replication Is Highly Inaccurate. *PLOS Biology*, *9*(2), e1000594. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000594>
- de Mayolo, A. A., Lisby, M., Erdeniz, N., Thybo, T., Mortensen, U. H., & Rothstein, R. (2006). Multiple start codons and phosphorylation result in discrete Rad52 protein species. *Nucleic Acids Research*, *34*(9), 2587-2597. <https://doi.org/10.1093/nar/gkl280>
- Deshpande, R. A., Williams, G. J., Limbo, O., Williams, R. S., Kuhnlein, J., Lee, J.-H., Classen, S., Guenther, G., Russell, P., Tainer, J. A., & Paull, T. T. (2014). ATP-driven Rad50 conformations regulate DNA tethering, end resection, and ATM checkpoint signaling. *The EMBO Journal*, *33*(5), 482-500. <https://doi.org/10.1002/emboj.201386100>
- Deveryshetty, J., Chadda, R., Mattice, J. R., Karunakaran, S., Rau, M. J., Basore, K., Pokhrel, N., Englander, N., Fitzpatrick, J. A. J., Bothner, B., & Antony, E. (2023). Yeast Rad52 is a homodecamer and possesses BRCA2-like bipartite Rad51 binding modes. *Nature Communications*, *14*(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-41993-1>
- Diamante, G., Phan, C., Celis, A. S., Krueger, J., Kelson, E. P., & Fischhaber, P. L. (2014). SAW1 is required for SDSA double-strand break repair in *S. cerevisiae*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *445*(3), 602-607. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.02.048>
- Dilley, R. L., Verma, P., Cho, N. W., Winters, H. D., Wondisford, A. R., & Greenberg, R. A. (2016). Break-induced telomere synthesis underlies alternative telomere maintenance. *Nature*, *539*(7627), Article 7627. <https://doi.org/10.1038/nature20099>
- Ding, J., Li, X., Shen, J., Zhao, Y., Zhong, S., Lai, L., Niu, H., & Qi, Z. (2023). ssDNA accessibility of Rad51 is regulated by orchestrating multiple RPA dynamics. *Nature Communications*, *14*(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-39579-y>
- Donnianni, R. A., & Symington, L. S. (2013). Break-induced replication occurs by conservative DNA synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *110*(33), 13475-13480. <https://doi.org/10.1073/pnas.1309800110>
- Donovan, J. W., Milne, G. T., & Weaver, D. T. (1994). Homotypic and heterotypic protein associations control Rad51 function in double-strand break repair. *Genes & Development*, *8*(21), 2552-2562. <https://doi.org/10.1101/gad.8.21.2552>
- Dosanjh, M. K., Collins, D. W., Fan, W., Lennon, G. G., Albala, J. S., Shen, Z., & Schild, D. (1998). Isolation and characterization of RAD51C, a new human member of the RAD51 family of related genes. *Nucleic Acids Research*, *26*(5), 1179-1184. <https://doi.org/10.1093/nar/26.5.1179>
- Dresser, M. E., Ewing, D. J., Conrad, M. N., Dominguez, A. M., Barstead, R., Jiang, H., & Kodadek, T. (1997). DMC1 Functions in a *Saccharomyces cerevisiae* Meiotic Pathway That Is Largely Independent of the RAD51 Pathway. *Genetics*, *147*(2), 533-544. <https://doi.org/10.1093/genetics/147.2.533>
- Dueva, R., & Iliakis, G. (2020). Replication protein A : A multifunctional protein with roles in DNA replication, repair and beyond. *NAR Cancer*, *2*(3), zcaa022. <https://doi.org/10.1093/narcan/zcaa022>
- Dungrawala, H., Bhat, K. P., Le Meur, R., Chazin, W. J., Ding, X., Sharan, S. K., Wessel, S. R., Sathe, A. A., Zhao, R., & Cortez, D. (2017). RADX promotes genome stability and modulates

- chemosensitivity by regulating RAD51 at replication forks. *Molecular cell*, 67(3), 374-386.e5. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.06.023>
- 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(6), 998-1010. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.07.030>
- Dupaigne, P., Breton, C. L., Fabre, F., Gangloff, S., Cam, E. L., & Veaute, X. (2008). The Srs2 Helicase Activity Is Stimulated by Rad51 Filaments on dsDNA : Implications for Crossover Incidence during Mitotic Recombination. *Molecular Cell*, 29(2), 243-254. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2007.11.033>
- Eggler, A. L., Inman, R. B., & Cox, M. M. (2002). The Rad51-dependent Pairing of Long DNA Substrates Is Stabilized by Replication Protein A *. *Journal of Biological Chemistry*, 277(42), 39280-39288. <https://doi.org/10.1074/jbc.M204328200>
- Eichmiller, R., Medina-Rivera, M., DeSanto, R., Minca, E., Kim, C., Holland, C., Seol, J.-H., Schmit, M., Oramus, D., Smith, J., Gallardo, I. F., Finkelstein, I. J., Lee, S. E., & Surtees, J. A. (2018). Coordination of Rad1–Rad10 interactions with Msh2–Msh3, Saw1 and RPA is essential for functional 3' non-homologous tail removal. *Nucleic Acids Research*, 46(10), 5075-5096. <https://doi.org/10.1093/nar/gky254>
- Eisen, J. A., Sweder, K. S., & Hanawalt, P. C. (1995). Evolution of the SNF2 family of proteins : Subfamilies with distinct sequences and functions. *Nucleic Acids Research*, 23(14), 2715-2723. <https://doi.org/10.1093/nar/23.14.2715>
- Elango, R., Kockler, Z., Liu, L., & Malkova, A. (2018). Chapter Nine—Investigation of Break-Induced Replication in Yeast. In M. Spies & A. Malkova (Éds.), *Methods in Enzymology* (Vol. 601, p. 161-203). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/bs.mie.2017.12.010>
- Elango, R., Osia, B., Harcy, V., Malc, E., Mieczkowski, P. A., Roberts, S. A., & Malkova, A. (2019). Repair of base damage within break-induced replication intermediates promotes kataegis associated with chromosome rearrangements. *Nucleic Acids Research*, 47(18), 9666-9684. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz651>
- Elango, R., Sheng, Z., Jackson, J., DeCata, J., Ibrahim, Y., Pham, N. T., Liang, D. H., Sakofsky, C. J., Vindigni, A., Lobachev, K. S., Ira, G., & Malkova, A. (2017). Break-induced replication promotes formation of lethal joint molecules dissolved by Srs2. *Nature Communications*, 8(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-01987-2>
- Ellis, N. A., Groden, J., Ye, T. Z., Straughen, J., Lennon, D. J., Ciocci, S., Proytcheva, M., & German, J. (1995). The Bloom's syndrome gene product is homologous to RecQ helicases. *Cell*, 83(4), 655-666. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(95\)90105-1](https://doi.org/10.1016/0092-8674(95)90105-1)
- Esashi, F., Galkin, V. E., Yu, X., Egelman, E. H., & West, S. C. (2007). Stabilization of RAD51 nucleoprotein filaments by the C-terminal region of BRCA2. *Nature Structural & Molecular Biology*, 14(6), Article 6. <https://doi.org/10.1038/nsmb1245>
- Esposito, M. S. (1978). Evidence that spontaneous mitotic recombination occurs at the two-strand stage. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 75(9), 4436-4440. <https://doi.org/10.1073/pnas.75.9.4436>
- Essers, J., Hendriks, R. W., Swagemakers, S. M. A., Troelstra, C., de Wit, J., Bootsma, D., Hoeijmakers, J. H. J., & Kanaar, R. (1997). Disruption of Mouse RAD54 Reduces Ionizing Radiation Resistance and Homologous Recombination. *Cell*, 89(2), 195-204. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80199-3](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80199-3)
- Essers, J., Hendriks, R. W., Wesoly, J., Beerens, C. E. M. T., Smit, B., Hoeijmakers, J. H. J., Wyman, C., Dronkert, M. L. G., & Kanaar, R. (2002). Analysis of mouse Rad54 expression and its implications for homologous recombination. *DNA Repair*, 1(10), 779-793. [https://doi.org/10.1016/S1568-7864\(02\)00110-6](https://doi.org/10.1016/S1568-7864(02)00110-6)
- Esta, A., Ma, E., Dupaigne, P., Maloïsel, L., Guerois, R., Le Cam, E., Veaute, X., & Coïc, E. (2013). Rad52 sumoylation prevents the toxicity of unproductive Rad51 filaments independently of the anti-recombinase Srs2. *PLoS Genetics*, 9(10), e1003833. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003833>

- Evans, E., Sugawara, N., Haber, J. E., & Alani, E. (2000). The *Saccharomyces cerevisiae* Msh2 Mismatch Repair Protein Localizes to Recombination Intermediates In Vivo. *Molecular Cell*, 5(5), 789-799. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(00\)80319-6](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(00)80319-6)
- Evans, R., O'Neill, M., Pritzel, A., Antropova, N., Senior, A., Green, T., Židek, A., Bates, R., Blackwell, S., Yim, J., Ronneberger, O., Bodenstern, S., Zielinski, M., Bridgland, A., Potapenko, A., Cowie, A., Tunyasuvunakool, K., Jain, R., Clancy, E., ... Hassabis, D. (2021). *Protein complex prediction with AlphaFold-Multimer* (p. 2021.10.04.463034). bioRxiv. <https://doi.org/10.1101/2021.10.04.463034>
- Fabre, F., Boulet, A., & Faye, G. (1991). Possible involvement of the yeast POLIII DNA polymerase in induced gene conversion. *Molecular and General Genetics MGG*, 229(3), 353-356. <https://doi.org/10.1007/BF00267455>
- Fabre, F., Chan, A., Heyer, W.-D., & Gangloff, S. (2002). Alternate pathways involving Sgs1/Top3, Mus81/ Mms4, and Srs2 prevent formation of toxic recombination intermediates from single-stranded gaps created by DNA replication. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(26), 16887-16892. <https://doi.org/10.1073/pnas.252652399>
- Fairman, M. P., & Stillman, B. (1988). Cellular factors required for multiple stages of SV40 DNA replication in vitro. *The EMBO Journal*, 7(4), 1211-1218. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1988.tb02933.x>
- Fan, J., & Pavletich, N. P. (2012). Structure and conformational change of a replication protein A heterotrimer bound to ssDNA. *Genes & Development*, 26(20), 2337-2347. <https://doi.org/10.1101/gad.194787.112>
- Fan, L., Bi, T., Wang, L., & Xiao, W. (2020). DNA-damage tolerance through PCNA ubiquitination and sumoylation. *Biochemical Journal*, 477(14), 2655-2677. <https://doi.org/10.1042/BCJ20190579>
- Fanning, E., Klimovich, V., & Nager, A. R. (2006). A dynamic model for replication protein A (RPA) function in DNA processing pathways. *Nucleic Acids Research*, 34(15), 4126-4137. <https://doi.org/10.1093/nar/gkl550>
- Fasching, C. L., Cejka, P., Kowalczykowski, S. C., & Heyer, W.-D. (2015). Top3-Rmi1 Dissolve Rad51-Mediated D Loops by a Topoisomerase-Based Mechanism. *Molecular Cell*, 57(4), 595-606. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.01.022>
- Fekairi, S., Scaglione, S., Chahwan, C., Taylor, E. R., Tissier, A., Coulon, S., Dong, M.-Q., Ruse, C., Yates, J. R., Russell, P., Fuchs, R. P., McGowan, C. H., & Gaillard, P.-H. L. (2009). Human SLX4 Is a Holliday Junction Resolvase Subunit that Binds Multiple DNA Repair/Recombination Endonucleases. *Cell*, 138(1), 78-89. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.06.029>
- Feng, Q., Düring, L., de Mayolo, A. A., Lettier, G., Lisby, M., Erdeniz, N., Mortensen, U. H., & Rothstein, R. (2007). Rad52 and Rad59 exhibit both overlapping and distinct functions. *DNA Repair*, 6(1), 27-37. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2006.08.007>
- Feng, Z., Scott, S. P., Bussen, W., Sharma, G. G., Guo, G., Pandita, T. K., & Powell, S. N. (2011). Rad52 inactivation is synthetically lethal with BRCA2 deficiency. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(2), 686-691. <https://doi.org/10.1073/pnas.1010959107>
- Ferguson, D. O., & Holloman, W. K. (1996). Recombinational repair of gaps in DNA is asymmetric in *Ustilago maydis* and can be explained by a migrating D-loop model. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(11), 5419-5424. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.11.5419>
- Fiorentini, P., Huang, K. N., Tishkoff, D. X., Kolodner, R. D., & Symington, L. S. (1997). Exonuclease I of *Saccharomyces cerevisiae* Functions in Mitotic Recombination In Vivo and In Vitro. *Molecular and Cellular Biology*, 17(5), 2764-2773. <https://doi.org/10.1128/MCB.17.5.2764>
- Firmenich, A. A., Elias-Arnanz, M., & Berg, P. (1995). A Novel Allele of *Saccharomyces cerevisiae* RFA1 That Is Deficient in Recombination and Repair and Suppressible by RAD52. *Molecular and Cellular Biology*, 15(3), 1620-1631. <https://doi.org/10.1128/MCB.15.3.1620>
- Fishman-Lobell, J., & Haber, J. E. (1992). Removal of Nonhomologous DNA Ends in Double-Strand Break Recombination : The Role of the Yeast Ultraviolet Repair Gene RAD1. *Science*, 258(5081), 480-484. <https://doi.org/10.1126/science.1411547>

- Fishman-Lobell, J., Rudin, N., & Haber, J. E. (1992). Two Alternative Pathways of Double-Strand Break Repair That Are Kinetically Separable and Independently Modulated. *Molecular and Cellular Biology*, *12*(3), 1292-1303. <https://doi.org/10.1128/mcb.12.3.1292-1303.1992>
- Flaus, A., Martin, D. M. A., Barton, G. J., & Owen-Hughes, T. (2006). Identification of multiple distinct Snf2 subfamilies with conserved structural motifs. *Nucleic Acids Research*, *34*(10), 2887-2905. <https://doi.org/10.1093/nar/gkl295>
- Fogel, S., & Hurst, D. D. (1967). MEIOTIC GENE CONVERSION IN YEAST TETRADS AND THE THEORY OF RECOMBINATION. *Genetics*, *57*(2), 455-481. <https://doi.org/10.1093/genetics/57.2.455>
- Fogel, S., & Mortimer, R. K. (1969). Informational transfer in meiotic gene conversion*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *62*(1), 96-103. <https://doi.org/10.1073/pnas.62.1.96>
- Fong, P. C., Boss, D. S., Yap, T. A., Tutt, A., Wu, P., Mergui-Roelvink, M., Mortimer, P., Swaisland, H., Lau, A., O'Connor, M. J., Ashworth, A., Carmichael, J., Kaye, S. B., Schellens, J. H. M., & de Bono, J. S. (2009). Inhibition of Poly(ADP-Ribose) Polymerase in Tumors from BRCA Mutation Carriers. *New England Journal of Medicine*, *361*(2), 123-134. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0900212>
- Fortin, G. S., & Symington, L. S. (2002). Mutations in yeast Rad51 that partially bypass the requirement for Rad55 and Rad57 in DNA repair by increasing the stability of Rad51-DNA complexes. *The EMBO Journal*, *21*(12), 3160-3170. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdf293>
- Fricke, W. M., & Brill, S. J. (2003). Slx1—Slx4 is a second structure-specific endonuclease functionally redundant with Sgs1—Top3. *Genes & Development*, *17*(14), 1768-1778. <https://doi.org/10.1101/gad.1105203>
- Friedl, A. A., Liefshitz, B., Steinlauf, R., & Kupiec, M. (2001). Deletion of the SRS2 gene suppresses elevated recombination and DNA damage sensitivity in rad5 and rad18 mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mutation Research/DNA Repair*, *486*(2), 137-146. [https://doi.org/10.1016/S0921-8777\(01\)00086-6](https://doi.org/10.1016/S0921-8777(01)00086-6)
- Fuchs, R. P. (2016). Tolerance of lesions in *E. coli* : Chronological competition between Translesion Synthesis and Damage Avoidance. *DNA Repair*, *44*, 51-58. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2016.05.006>
- Fugger, K., Mistrik, M., Danielsen, J. R., Dinant, C., Falck, J., Bartek, J., Lukas, J., & Mailand, N. (2009). Human Fbh1 helicase contributes to genome maintenance via pro- and anti-recombinase activities. *Journal of Cell Biology*, *186*(5), 655-663. <https://doi.org/10.1083/jcb.200812138>
- Fujii, S., Isogawa, A., & Fuchs, R. P. (2018). Chronological Switch from Translesion Synthesis to Homology-Dependent Gap Repair In Vivo. *Toxicological Research*, *34*(4), 297-302. <https://doi.org/10.5487/TR.2018.34.4.297>
- Fujimori, A., Tachiiri, S., Sonoda, E., Thompson, L. H., Dhar, P. K., Hiraoka, M., Takeda, S., Zhang, Y., Reth, M., & Takata, M. (2001). Rad52 partially substitutes for the Rad51 paralog XRCC3 in maintaining chromosomal integrity in vertebrate cells. *The EMBO Journal*, *20*(19), 5513-5520. <https://doi.org/10.1093/emboj/20.19.5513>
- Fujitani, Y., & Kobayashi, I. (1999). Effect of DNA Sequence Divergence on Homologous Recombination as Analyzed by a Random-Walk Model. *Genetics*, *153*(4), 1973-1988. <https://doi.org/10.1093/genetics/153.4.1973>
- Fujitani, Y., Yamamoto, K., & Kobayashi, I. (1995). Dependence of frequency of homologous recombination on the homology length. *Genetics*, *140*(2), 797-809. <https://doi.org/10.1093/genetics/140.2.797>
- Fung, C. W., Fortin, G. S., Peterson, S. E., & Symington, L. S. (2006). The rad51-K191R ATPase-Defective Mutant Is Impaired for Presynaptic Filament Formation. *Molecular and Cellular Biology*, *26*(24), 9544-9554. <https://doi.org/10.1128/MCB.00599-06>
- Fung, C. W., Mozlin, A. M., & Symington, L. S. (2009). Suppression of the Double-Strand-Break-Repair Defect of the *Saccharomyces cerevisiae* rad57 Mutant. *Genetics*, *181*(4), 1195-1206. <https://doi.org/10.1534/genetics.109.100842>
- Gaillard, H., García-Muse, T., & Aguilera, A. (2015). Replication stress and cancer. *Nature Reviews Cancer*, *15*(5), Article 5. <https://doi.org/10.1038/nrc3916>

- Gaines, W. A., Godin, S. K., Kabbinavar, F. F., Rao, T., VanDemark, A. P., Sung, P., & Bernstein, K. A. (2015). Promotion of presynaptic filament assembly by the ensemble of *S. cerevisiae* Rad51 paralogues with Rad52. *Nature Communications*, 6. <https://doi.org/10.1038/ncomms8834>
- Game, J. C., & Mortimer, R. K. (1974). A genetic study of x-ray sensitive mutants in yeast. *Mutation Research*, 24(3), 281-292. [https://doi.org/10.1016/0027-5107\(74\)90176-6](https://doi.org/10.1016/0027-5107(74)90176-6)
- Gangloff, S., McDonald, J. P., Bendixen, C., Arthur, L., & Rothstein, R. (1994). The Yeast Type I Topoisomerase Top3 Interacts with Sgsl, a DNA Helicase Homolog : A Potential Eukaryotic Reverse Gyrase. *Molecular and Cellular Biology*, 14(12), 8391-8398. <https://doi.org/10.1128/mcb.14.12.8391-8398.1994>
- Gangloff, S., Soustelle, C., & Fabre, F. (2000). Homologous recombination is responsible for cell death in the absence of the Sgs1 and Srs2 helicases. *Nature Genetics*, 25(2), Article 2. <https://doi.org/10.1038/76055>
- Gao, Y., Mutter-Rottmayer, E., Zlatanou, A., Vaziri, C., & Yang, Y. (2017). Mechanisms of Post-Replication DNA Repair. *Genes*, 8(2). <https://doi.org/10.3390/genes8020064>
- Garcia, V., Phelps, S. E. L., Gray, S., & Neale, M. J. (2011). Bidirectional resection of DNA double-strand breaks by Mre11 and Exo1. *Nature*, 479(7372), Article 7372. <https://doi.org/10.1038/nature10515>
- Garcin, E. B., Gon, S., Sullivan, M. R., Brunette, G. J., Cian, A. D., Concordet, J.-P., Giovannangeli, C., Dirks, W. G., Eberth, S., Bernstein, K. A., Prakash, R., Jasin, M., & Modesti, M. (2019). Differential Requirements for the RAD51 Paralogs in Genome Repair and Maintenance in Human Cells. *PLoS Genetics*, 15(10). <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1008355>
- Gasior, S. L., Wong, A. K., Kora, Y., Shinohara, A., & Bishop, D. K. (1998). Rad52 associates with RPA and functions with Rad55 and Rad57 to assemble meiotic recombination complexes. *Genes & Development*, 12(14), 2208-2221. <https://doi.org/10.1101/gad.12.14.2208>
- Gerik, K. J., Li, X., Pautz, A., & Burgers, P. M. J. (1998). Characterization of the Two Small Subunits of *Saccharomyces cerevisiae* DNA Polymerase δ^* . *Journal of Biological Chemistry*, 273(31), 19747-19755. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.31.19747>
- Gibb, B., Ye, L. F., Kwon, Y., Niu, H., Sung, P., & Greene, E. C. (2014). Protein dynamics during presynaptic-complex assembly on individual single-stranded DNA molecules. *Nature Structural & Molecular Biology*, 21(10), Article 10. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2886>
- Gilbertson, L. A., & Stahl, F. W. (1996). A Test of the Double-Strand Break Repair Model for Meiotic Recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 144(1), 27-41. <https://doi.org/10.1093/genetics/144.1.27>
- Gloor, G. B., Nassif, N. A., Johnson-Schlitz, D. M., Preston, C. R., & Engels, W. R. (1991). Targeted Gene Replacement in *Drosophila* Via P Element-Induced Gap Repair. *Science*, 253(5024), 1110-1117. <https://doi.org/10.1126/science.1653452>
- Gobbini, E., Cassani, C., Vertemara, J., Wang, W., Mambretti, F., Casari, E., Sung, P., Tisi, R., Zampella, G., & Longhese, M. P. (2018). The MRX complex regulates Exo1 resection activity by altering DNA end structure. *The EMBO Journal*, 37(16), e98588. <https://doi.org/10.15252/emj.201798588>
- Godin, S. K., Meslin, C., Kabbinavar, F., Bratton-Palmer, D. S., Hornack, C., Mihalevic, M. J., Yoshida, K., Sullivan, M., Clark, N. L., & Bernstein, K. A. (2015). Evolutionary and Functional Analysis of the Invariant SWIM Domain in the Conserved Shu2/SWS1 Protein Family from *Saccharomyces cerevisiae* to *Homo sapiens*. *Genetics*, 199(4), 1023-1033. <https://doi.org/10.1534/genetics.114.173518>
- Godin, S. K., Zhang, Z., Herken, B. W., Westmoreland, J. W., Lee, A. G., Mihalevic, M. J., Yu, Z., Sobol, R. W., Resnick, M. A., & Bernstein, K. A. (2016). The Shu complex promotes error-free tolerance of alkylation-induced base excision repair products. *Nucleic Acids Research*, 44(17), 8199-8215. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw535>
- Godin, S., Wier, A., Kabbinavar, F., Bratton-Palmer, D. S., Ghodke, H., Van Houten, B., VanDemark, A. P., & Bernstein, K. A. (2013). The Shu complex interacts with Rad51 through the Rad51

- paralogues Rad55–Rad57 to mediate error-free recombination. *Nucleic Acids Research*, 41(8), 4525-4534. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt138>
- Golin, J. E., & Esposito, M. S. (1984). COINCIDENT GENE CONVERSION DURING MITOSIS IN SACCHAROMYCES. *Genetics*, 107(3), 355-365. <https://doi.org/10.1093/genetics/107.3.355>
- Golmard, L., Castéra, L., Krieger, S., Moncoutier, V., Abidallah, K., Tenreiro, H., Laugé, A., Tarabeux, J., Millot, G. A., Nicolas, A., Laé, M., Abadie, C., Berthet, P., Polycarpe, F., Frébourg, T., Elan, C., de Pauw, A., Gauthier-Villars, M., Buecher, B., ... Houdayer, C. (2017). Contribution of germline deleterious variants in the RAD51 paralogs to breast and ovarian cancers. *European Journal of Human Genetics*, 25(12), Article 12. <https://doi.org/10.1038/s41431-017-0021-2>
- Golub, E. I., Gupta, R. C., Haaf, T., Wold, M. S., & Radding, C. M. (1998). Interaction of human Rad51 recombination protein with single-stranded DNA binding protein, RPA. *Nucleic Acids Research*, 26(23), 5388-5393. <https://doi.org/10.1093/nar/26.23.5388>
- Golub, E. I., Kovalenko, O. V., Gupta, R. C., Ward, D. C., & Radding, C. M. (1997). Interaction of human recombination proteins Rad51 and Rad54. *Nucleic Acids Research*, 25(20), 4106-4110. <https://doi.org/10.1093/nar/25.20.4106>
- González-Prieto, R., Muñoz-Cabello, A. M., Cabello-Lobato, M. J., & Prado, F. (2013). Rad51 replication fork recruitment is required for DNA damage tolerance. *The EMBO Journal*, 32(9), 1307-1321. <https://doi.org/10.1038/emboj.2013.73>
- Goodman, M. F., & Woodgate, R. (2013). Translesion DNA Polymerases. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 5(10). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a010363>
- Gorbalenya, A. E., & Koonin, E. V. (1993). Helicases : Amino acid sequence comparisons and structure-function relationships. *Current Opinion in Structural Biology*, 3(3), 419-429. [https://doi.org/10.1016/S0959-440X\(05\)80116-2](https://doi.org/10.1016/S0959-440X(05)80116-2)
- Goyal, N., Rossi, M. J., Mazina, O. M., Chi, Y., Moritz, R. L., Clurman, B. E., & Mazin, A. V. (2018). RAD54 N-terminal domain is a DNA sensor that couples ATP hydrolysis with branch migration of Holliday junctions. *Nature Communications*, 9(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-02497-x>
- Gravel, S., Chapman, J. R., Magill, C., & Jackson, S. P. (2008). DNA helicases Sgs1 and BLM promote DNA double-strand break resection. *Genes & Development*, 22(20), 2767-2772. <https://doi.org/10.1101/gad.503108>
- Greenhough, L. A., Liang, C.-C., Belan, O., Kunzelmann, S., Maslen, S., Rodrigo-Brenni, M. C., Anand, R., Skehel, M., Boulton, S. J., & West, S. C. (2023). Structure and function of the RAD51B–RAD51C–RAD51D–XRCC2 tumour suppressor. *Nature*, 619(7970), Article 7970. <https://doi.org/10.1038/s41586-023-06179-1>
- Haber, J. E. (2012). Mating-type genes and MAT switching in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 191(1), 33-64. <https://doi.org/10.1534/genetics.111.134577>
- Hanamshet, K., & Mazin, A. V. (2020). The function of RAD52 N-terminal domain is essential for viability of BRCA-deficient cells. *Nucleic Acids Research*, 48(22), 12778-12791. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa1145>
- Hanamshet, K., Mazina, O. M., & Mazin, A. V. (2016). Reappearance from Obscurity : Mammalian Rad52 in Homologous Recombination. *Genes*, 7(9), Article 9. <https://doi.org/10.3390/genes7090063>
- Haruta, N., Kurokawa, Y., Murayama, Y., Akamatsu, Y., Unzai, S., Tsutsui, Y., & Iwasaki, H. (2006). The Swi5–Sfr1 complex stimulates Rhp51/Rad51—And Dmc1-mediated DNA strand exchange in vitro. *Nature Structural & Molecular Biology*, 13(9), Article 9. <https://doi.org/10.1038/nsmb1136>
- Hashimoto, Y., Ray Chaudhuri, A., Lopes, M., & Costanzo, V. (2010). Rad51 protects nascent DNA from Mre11-dependent degradation and promotes continuous DNA synthesis. *Nature Structural & Molecular Biology*, 17(11), Article 11. <https://doi.org/10.1038/nsmb.1927>
- Hayase, A., Takagi, M., Miyazaki, T., Oshiumi, H., Shinohara, M., & Shinohara, A. (2004). A Protein Complex Containing Mei5 and Sae3 Promotes the Assembly of the Meiosis-Specific RecA Homolog Dmc1. *Cell*, 119(7), 927-940. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.10.031>

- Hays, S. L., Firmenich, A. A., & Berg, P. (1995). Complex formation in yeast double-strand break repair : Participation of Rad51, Rad52, Rad55, and Rad57 proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *92*(15), 6925-6929. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.15.6925>
- Hays, S. L., Firmenich, A. A., Massey, P., Banerjee, R., & Berg, P. (1998). Studies of the Interaction between Rad52 Protein and the Yeast Single-Stranded DNA Binding Protein RPA. *Molecular and Cellular Biology*, *18*(7), 4400-4406. <https://doi.org/10.1128/MCB.18.7.4400>
- Herzberg, K., Bashkirov, V. I., Rolfsmeier, M., Haghazari, E., McDonald, W. H., Anderson, S., Bashkirova, E. V., Yates, J. R., & Heyer, W.-D. (2006). Phosphorylation of Rad55 on Serines 2, 8, and 14 Is Required for Efficient Homologous Recombination in the Recovery of Stalled Replication Forks. *Molecular and Cellular Biology*, *26*(22), 8396-8409. <https://doi.org/10.1128/MCB.01317-06>
- Heyer, W. D., Rao, M. R., Erdile, L. F., Kelly, T. J., & Kolodner, R. D. (1990). An essential *Saccharomyces cerevisiae* single-stranded DNA binding protein is homologous to the large subunit of human RP-A. *The EMBO Journal*, *9*(7), 2321-2329. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1990.tb07404.x>
- Hilario, J., Amitani, I., Baskin, R. J., & Kowalczykowski, S. C. (2009). Direct imaging of human Rad51 nucleoprotein dynamics on individual DNA molecules. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *106*(2), 361-368. <https://doi.org/10.1073/pnas.0811965106>
- Ho, C. K., Mazón, G., Lam, A. F., & Symington, L. S. (2010). Mus81 and Yen1 Promote Reciprocal Exchange during Mitotic Recombination to Maintain Genome Integrity in Budding Yeast. *Molecular Cell*, *40*(6), 988-1000. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.11.016>
- Hoege, C., Pfander, B., Moldovan, G.-L., Pyrowolakis, G., & Jentsch, S. (2002). RAD6-dependent DNA repair is linked to modification of PCNA by ubiquitin and SUMO. *Nature*, *419*(6903), Article 6903. <https://doi.org/10.1038/nature00991>
- Hoeijmakers, J. H. J. (2001). Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature*, *411*(6835), 366-374. <https://doi.org/10.1038/35077232>
- Hoeijmakers, J. H. J. (2009). DNA Damage, Aging, and Cancer. *New England Journal of Medicine*, *361*(15), 1475-1485. <https://doi.org/10.1056/NEJMra0804615>
- Holliday, R. (1964). A mechanism for gene conversion in fungi. *Genetics Research*, *5*(2), 282-304. <https://doi.org/10.1017/S0016672300001233>
- Holzen, T. M., Shah, P. P., Olivares, H. A., & Bishop, D. K. (2006). Tid1/Rdh54 promotes dissociation of Dmc1 from nonrecombinogenic sites on meiotic chromatin. *Genes & Development*, *20*(18), 2593-2604. <https://doi.org/10.1101/gad.1447106>
- Hong, E. L., Shinohara, A., & Bishop, D. K. (2001). *Saccharomyces cerevisiae* Dmc1 Protein Promotes Renaturation of Single-strand DNA (ssDNA) and Assimilation of ssDNA into Homologous Super-coiled Duplex DNA *. *Journal of Biological Chemistry*, *276*(45), 41906-41912. <https://doi.org/10.1074/jbc.M105563200>
- Hong, S., & Kim, K. P. (2013). Shu1 promotes homolog bias of meiotic recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecules and Cells*, *36*(5), 446-454. <https://doi.org/10.1007/s10059-013-0215-6>
- Hou, K., Yu, Y., Li, D., Zhang, Y., Zhang, K., Tong, J., Yang, K., & Jia, S. (2022). Alternative Lengthening of Telomeres and Mediated Telomere Synthesis. *Cancers*, *14*(9), Article 9. <https://doi.org/10.3390/cancers14092194>
- Howlett, N. G., Taniguchi, T., Olson, S., Cox, B., Waisfisz, Q., de Die-Smulders, C., Persky, N., Grompe, M., Joenje, H., Pals, G., Ikeda, H., Fox, E. A., & D'Andrea, A. D. (2002). Biallelic Inactivation of BRCA2 in Fanconi Anemia. *Science*, *297*(5581), 606-609. <https://doi.org/10.1126/science.1073834>
- Hu, Y., Raynard, S., Sehorn, M. G., Lu, X., Bussen, W., Zheng, L., Stark, J. M., Barnes, E. L., Chi, P., Janscak, P., Jasin, M., Vogel, H., Sung, P., & Luo, G. (2007). RECQL5/Recql5 helicase regulates homologous recombination and suppresses tumor formation via disruption of Rad51

- presynaptic filaments. *Genes & Development*, 21(23), 3073-3084.
<https://doi.org/10.1101/gad.1609107>
- Huang, M.-E., Rio, A.-G., Nicolas, A., & Kolodner, R. D. (2003). A genomewide screen in *Saccharomyces cerevisiae* for genes that suppress the accumulation of mutations. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(20), 11529-11534.
<https://doi.org/10.1073/pnas.2035018100>
- Humphreys, I. R., Pei, J., Baek, M., Krishnakumar, A., Anishchenko, I., Ovchinnikov, S., Zhang, J., Ness, T. J., Banjade, S., Bagde, S. R., Stancheva, V. G., Li, X.-H., Liu, K., Zheng, Z., Barrero, D. J., Roy, U., Kuper, J., Fernández, I. S., Szakal, B., ... Baker, D. (2021). Computed structures of core eukaryotic protein complexes. *Science*, 374(6573), eabm4805.
<https://doi.org/10.1126/science.abm4805>
- Hunter, N., & Kleckner, N. (2001). The Single-End Invasion : An Asymmetric Intermediate at the Double-Strand Break to Double-Holliday Junction Transition of Meiotic Recombination. *Cell*, 106(1), 59-70. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(01\)00430-5](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(01)00430-5)
- Hurst, D. D., Fogel, S., & Mortimer, R. K. (1972). Conversion-Associated Recombination in Yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 69(1), 101-105.
<https://doi.org/10.1073/pnas.69.1.101>
- Iftode, C., & Borowiec, J. A. (2000). 5' → 3' Molecular Polarity of Human Replication Protein A (hRPA) Binding to Pseudo-Origin DNA Substrates. *Biochemistry*, 39(39), 11970-11981.
<https://doi.org/10.1021/bi0005761>
- Iftode, C., Daniely, Y., & Borowiec, J. A. (1999). Replication Protein A (RPA) : The Eukaryotic SSB. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 34(3), 141-180.
<https://doi.org/10.1080/10409239991209255>
- Ines, O. D., Degroote, F., Goubely, C., Amiard, S., Gallego, M. E., & White, C. I. (2013). Meiotic Recombination in Arabidopsis Is Catalysed by DMC1, with RAD51 Playing a Supporting Role. *PLOS Genetics*, 9(9), e1003787. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003787>
- Interthal, H., & Heyer, W.-D. (2000). MUS81 encodes a novel Helix-hairpin-Helix protein involved in the response to UV- and methylation-induced DNA damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and General Genetics MGG*, 263(5), 812-827.
<https://doi.org/10.1007/s004380000241>
- Ip, S. C. Y., Rass, U., Blanco, M. G., Flynn, H. R., Skehel, J. M., & West, S. C. (2008). Identification of Holliday junction resolvases from humans and yeast. *Nature*, 456(7220), Article 7220.
<https://doi.org/10.1038/nature07470>
- Ira, G., Malkova, A., Liberi, G., Foiani, M., & Haber, J. E. (2003). Srs2 and Sgs1–Top3 Suppress Crossovers during Double-Strand Break Repair in Yeast. *Cell*, 115(4), 401-411.
[https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(03\)00886-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(03)00886-9)
- Ira, G., Pelliccioli, A., Balijja, A., Wang, X., Fiorani, S., Carotenuto, W., Liberi, G., Bressan, D., Wan, L., Hollingsworth, N. M., Haber, J. E., & Foiani, M. (2004). DNA end resection, homologous recombination and DNA damage checkpoint activation require CDK1. *Nature*, 431(7011), Article 7011. <https://doi.org/10.1038/nature02964>
- Ito, K., Murayama, Y., Kurokawa, Y., Kanamaru, S., Kokabu, Y., Maki, T., Mikawa, T., Argunhan, B., Tsubouchi, H., Ikeguchi, M., Takahashi, M., & Iwasaki, H. (2020). Real-time tracking reveals catalytic roles for the two DNA binding sites of Rad51. *Nature Communications*, 11(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-16750-3>
- Ito, M., & Shinohara, A. (2023). Chromosome architecture and homologous recombination in meiosis. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 10, 1097446.
<https://doi.org/10.3389/fcell.2022.1097446>
- Ito, T., Chiba, T., Ozawa, R., Yoshida, M., Hattori, M., & Sakaki, Y. (2001). A comprehensive two-hybrid analysis to explore the yeast protein interactome. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(8), 4569-4574. <https://doi.org/10.1073/pnas.061034498>

- Ivanov, E. L., & Haber, J. E. (1995). RAD1 and RAD10, but Not Other Excision Repair Genes, Are Required for Double-Strand Break-Induced Recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology*, *15*(4), 2245-2251. <https://doi.org/10.1128/MCB.15.4.2245>
- Ivanov, E. L., Sugawara, N., Fishman-Lobell, J., & Haber, J. E. (1996). Genetic requirements for the single-strand annealing pathway of double-strand break repair in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, *142*(3), 693-704. <https://doi.org/10.1093/genetics/142.3.693>
- Jackson, D., Dhar, K., Wahl, J. K., Wold, M. S., & Borgstahl, G. E. O. (2002). Analysis of the Human Replication Protein A:Rad52 Complex : Evidence for Crosstalk Between RPA32, RPA70, Rad52 and DNA. *Journal of Molecular Biology*, *321*(1), 133-148. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(02\)00541-7](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(02)00541-7)
- Jackson, S. P., & Bartek, J. (2009). The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature*, *461*(7267), 1071-1078. <https://doi.org/10.1038/nature08467>
- Jager, M. de, Noort, J. van, Gent, D. C. van, Dekker, C., Kanaar, R., & Wyman, C. (2001). Human Rad50/Mre11 Is a Flexible Complex that Can Tether DNA Ends. *Molecular Cell*, *8*(5), 1129-1135. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(01\)00381-1](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(01)00381-1)
- Jasin, M. (2002). Homologous repair of DNA damage and tumorigenesis:the BRCA connection. *Oncogene*, *21*(58), Article 58. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1206176>
- Jaskelioff, M., Van Komen, S., Krebs, J. E., Sung, P., & Peterson, C. L. (2003). Rad54p Is a Chromatin Remodeling Enzyme Required for Heteroduplex DNA Joint Formation with Chromatin*. *Journal of Biological Chemistry*, *278*(11), 9212-9218. <https://doi.org/10.1074/jbc.M211545200>
- Jenkins, S. S., Gore, S., Guo, X., Liu, J., Ede, C., Veaute, X., Jinks-Robertson, S., Kowalczykowski, S. C., & Heyer, W.-D. (2019). Role of the Srs2–Rad51 Interaction Domain in Crossover Control in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, *212*(4), 1133-1145. <https://doi.org/10.1534/genetics.119.302337>
- Jensen, R. B., Carreira, A., & Kowalczykowski, S. C. (2010). Purified human BRCA2 stimulates RAD51-mediated recombination. *Nature*, *467*(7316), Article 7316. <https://doi.org/10.1038/nature09399>
- Jiang, H., Xie, Y., Houston, P., Stemke-Hale, K., Mortensen, U. H., Rothstein, R., & Kodadek, T. (1996). Direct Association between the Yeast Rad51 and Rad54 Recombination Proteins*. *Journal of Biological Chemistry*, *271*(52), 33181-33186. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.52.33181>
- Johansson, E., Majka, J., & Burgers, P. M. J. (2001). Structure of DNA Polymerase δ from *Saccharomyces cerevisiae* *. *Journal of Biological Chemistry*, *276*(47), 43824-43828. <https://doi.org/10.1074/jbc.M108842200>
- Johnson, R. D., & Symington, L. S. (1995). Functional differences and interactions among the putative RecA homologs Rad51, Rad55, and Rad57. *Molecular and Cellular Biology*, *15*(9), 4843-4850.
- Jumper, J., Evans, R., Pritzel, A., Green, T., Figurnov, M., Ronneberger, O., Tunyasuvunakool, K., Bates, R., Žídek, A., Potapenko, A., Bridgland, A., Meyer, C., Kohl, S. A. A., Ballard, A. J., Cowie, A., Romera-Paredes, B., Nikolov, S., Jain, R., Adler, J., ... Hassabis, D. (2021). Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature*, *596*(7873), Article 7873. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03819-2>
- Kagawa, W., Arai, N., Ichikawa, Y., Saito, K., Sugiyama, S., Saotome, M., Shibata, T., & Kurumizaka, H. (2014). Functional analyses of the C-terminal half of the *Saccharomyces cerevisiae* Rad52 protein. *Nucleic Acids Research*, *42*(2), 941-951. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt986>
- Kagawa, W., Kagawa, A., Saito, K., Ikawa, S., Shibata, T., Kurumizaka, H., & Yokoyama, S. (2008). Identification of a Second DNA Binding Site in the Human Rad52 Protein *. *Journal of Biological Chemistry*, *283*(35), 24264-24273. <https://doi.org/10.1074/jbc.M802204200>
- Kagawa, W., Kurumizaka, H., Ishitani, R., Fukai, S., Nureki, O., Shibata, T., & Yokoyama, S. (2002). Crystal Structure of the Homologous-Pairing Domain from the Human Rad52 Recombinase in the Undecameric Form. *Molecular Cell*, *10*(2), 359-371. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(02\)00587-7](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(02)00587-7)

- Kanaar, R., Troelstra, C., Swagemakers, S. M. A., Essers, J., Smit, B., Franssen, J.-H., Pastink, A., Bezzubova, O. Y., Buerstedde, J.-M., Clever, B., Heyer, W.-D., & Hoeijmakers, J. H. J. (1996). Human and mouse homologs of the *Saccharomyces cerevisiae* RAD54 DNA repair gene : Evidence for functional conservation. *Current Biology*, *6*(7), 828-838. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(02\)00606-1](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(02)00606-1)
- Kanao, R., & Masutani, C. (2017). Regulation of DNA damage tolerance in mammalian cells by post-translational modifications of PCNA. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, *803-805*, 82-88. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2017.06.004>
- Kaniecki, K., Tullio, L. D., Gibb, B., Kwon, Y., Sung, P., & Greene, E. C. (2017). Dissociation of Rad51 Presynaptic Complexes and Heteroduplex DNA Joints by Tandem Assemblies of Srs2. *Cell Reports*, *21*(11), 3166-3177. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.11.047>
- Kannouche, P. L., Wing, J., & Lehmann, A. R. (2004). Interaction of Human DNA Polymerase η with Monoubiquitinated PCNA : A Possible Mechanism for the Polymerase Switch in Response to DNA Damage. *Molecular Cell*, *14*(4), 491-500. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(04\)00259-X](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(04)00259-X)
- Kans, J. A., & Mortimer, R. K. (1991). Nucleotide sequence of the RAD57 gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene*, *105*(1), 139-140. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(91\)90527-I](https://doi.org/10.1016/0378-1119(91)90527-I)
- Kantake, N., Sugiyama, T., Kolodner, R. D., & Kowalczykowski, S. C. (2003). The Recombination-deficient Mutant RPA (rfa1-t11) Is Displaced Slowly from Single-stranded DNA by Rad51 Protein *. *Journal of Biological Chemistry*, *278*(26), 23410-23417. <https://doi.org/10.1074/jbc.M302995200>
- Karow, J. K., Constantinou, A., Li, J.-L., West, S. C., & Hickson, I. D. (2000). The Bloom's syndrome gene product promotes branch migration of Holliday junctions. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *97*(12), 6504-6508. <https://doi.org/10.1073/pnas.100448097>
- Karras, G. I., Fumasoni, M., Sienski, G., Vanoli, F., Branzei, D., & Jentsch, S. (2013). Noncanonical Role of the 9-1-1 Clamp in the Error-Free DNA Damage Tolerance Pathway. *Molecular Cell*, *49*(3), 536-546. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2012.11.016>
- Katoh, K., & Standley, D. M. (2013). MAFFT multiple sequence alignment software version 7 : Improvements in performance and usability. *Molecular Biology and Evolution*, *30*(4), 772-780. <https://doi.org/10.1093/molbev/mst010>
- Katou, Y., Kanoh, Y., Bando, M., Noguchi, H., Tanaka, H., Ashikari, T., Sugimoto, K., & Shirahige, K. (2003). S-phase checkpoint proteins Tof1 and Mrc1 form a stable replication-pausing complex. *Nature*, *424*(6952), Article 6952. <https://doi.org/10.1038/nature01900>
- Kawamoto, T., Araki, K., Sonoda, E., Yamashita, Y. M., Harada, K., Kikuchi, K., Masutani, C., Hanaoka, F., Nozaki, K., Hashimoto, N., & Takeda, S. (2005). Dual Roles for DNA Polymerase η in Homologous DNA Recombination and Translesion DNA Synthesis. *Molecular Cell*, *20*(5), 793-799. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2005.10.016>
- Keyamura, K., Arai, K., & Hishida, T. (2016). Srs2 and Mus81-Mms4 Prevent Accumulation of Toxic Inter-Homolog Recombination Intermediates. *PLOS Genetics*, *12*(7), e1006136. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1006136>
- Keymakh, M., Dau, J., Hu, J., Ferlez, B., Lisby, M., & Crickard, J. B. (2022). Rdh54 stabilizes Rad51 at displacement loop intermediates to regulate genetic exchange between chromosomes. *PLOS Genetics*, *18*(9), e1010412. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1010412>
- Khade, N. V., & Sugiyama, T. (2016). Roles of C-Terminal Region of Yeast and Human Rad52 in Rad51-Nucleoprotein Filament Formation and ssDNA Annealing. *PLOS ONE*, *11*(6), e0158436. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0158436>
- Kiiianitsa, K., Solinger, J. A., & Heyer, W.-D. (2002). Rad54 Protein Exerts Diverse Modes of ATPase Activity on Duplex DNA Partially and Fully Covered with Rad51 Protein*. *Journal of Biological Chemistry*, *277*(48), 46205-46215. <https://doi.org/10.1074/jbc.M207967200>

- Kiianitsa, K., Solinger, J. A., & Heyer, W.-D. (2006). Terminal association of Rad54 protein with the Rad51–dsDNA filament. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *103*(26), 9767-9772. <https://doi.org/10.1073/pnas.0604240103>
- Kim, C., Paulus, B. F., & Wold, M. S. (1994). Interactions of human replication protein A with oligonucleotides. *Biochemistry*, *33*(47), 14197-14206. <https://doi.org/10.1021/bi00251a031>
- Kim, C., Snyder, R. O., & Wold, M. S. (1992). Binding Properties of Replication Protein A from Human and Yeast Cells. *Molecular and Cellular Biology*, *12*(7), 3050-3059. <https://doi.org/10.1128/mcb.12.7.3050-3059.1992>
- Kinoshita, C., Takizawa, Y., Saotome, M., Ogino, S., Kurumizaka, H., & Kagawa, W. (2023). The cryo-EM structure of full-length RAD52 protein contains an undecameric ring. *FEBS Open Bio*, *13*(3), 408-418. <https://doi.org/10.1002/2211-5463.13565>
- Klein, H. L. (1997). RDH54, a RAD54 Homologue in *Saccharomyces cerevisiae*, Is Required for Mitotic Diploid-Specific Recombination and Repair and for Meiosis. *Genetics*, *147*(4), 1533-1543. <https://doi.org/10.1093/genetics/147.4.1533>
- Klein, H. L. (2001). Mutations in Recombinational Repair and in Checkpoint Control Genes Suppress the Lethal Combination of *srs2Δ* With Other DNA Repair Genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, *157*(2), 557-565. <https://doi.org/10.1093/genetics/157.2.557>
- Kobayashi, K., Guillian, T. A., Tsuda, M., Yamamoto, J., Bailey, L. J., Iwai, S., Takeda, S., Doherty, A. J., & Hirota, K. (2016). Repriming by PrimPol is critical for DNA replication restart downstream of lesions and chain-terminating nucleosides. *Cell Cycle*, *15*(15), 1997-2008. <https://doi.org/10.1080/15384101.2016.1191711>
- Kogoma, T. (1997). Stable DNA replication : Interplay between DNA replication, homologous recombination, and transcription. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, *61*(2), 212-238. <https://doi.org/10.1128/mmr.61.2.212-238.1997>
- Kohzaki, M., Hatanaka, A., Sonoda, E., Yamazoe, M., Kikuchi, K., Vu Trung, N., Szüts, D., Sale, J. E., Shinagawa, H., Watanabe, M., & Takeda, S. (2007). Cooperative Roles of Vertebrate Fbh1 and Blm DNA Helicases in Avoidance of Crossovers during Recombination Initiated by Replication Fork Collapse. *Molecular and Cellular Biology*, *27*(8), 2812-2820. <https://doi.org/10.1128/MCB.02043-06>
- Kolesar, P., Altmannova, V., Silva, S., Lisby, M., & Krejci, L. (2016). Pro-recombination Role of Srs2 Protein Requires SUMO (Small Ubiquitin-like Modifier) but Is Independent of PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen) Interaction *. *Journal of Biological Chemistry*, *291*(14), 7594-7607. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.685891>
- Kolpashchikov, D. M., Khodyreva, S. N., Khlimankov, D. Yu., Wold, M. S., Favre, A., & Lavrik, O. I. (2001). Polarity of human replication protein A binding to DNA. *Nucleic Acids Research*, *29*(2), 373-379. <https://doi.org/10.1093/nar/29.2.373>
- Komen, S. V., Petukhova, G., Sigurdsson, S., & Sung, P. (2002). Functional Cross-talk among Rad51, Rad54, and Replication Protein A in Heteroduplex DNA Joint Formation *. *Journal of Biological Chemistry*, *277*(46), 43578-43587. <https://doi.org/10.1074/jbc.M205864200>
- Komen, S. V., Reddy, M. S., Krejci, L., Klein, H., & Sung, P. (2003). ATPase and DNA Helicase Activities of the *Saccharomyces cerevisiae* Anti-recombinase Srs2 *. *Journal of Biological Chemistry*, *278*(45), 44331-44337. <https://doi.org/10.1074/jbc.M307256200>
- Kondrashova, O., Nguyen, M., Shield-Artin, K., Tinker, A. V., Teng, N. N. H., Harrell, M. I., Kuiper, M. J., Ho, G.-Y., Barker, H., Jasin, M., Prakash, R., Kass, E. M., Sullivan, M. R., Brunette, G. J., Bernstein, K. A., Coleman, R. L., Floquet, A., Friedlander, M., Kichenadasse, G., ... on behalf of the AOCS Study Group. (2017). Secondary Somatic Mutations Restoring RAD51C and RAD51D Associated with Acquired Resistance to the PARP Inhibitor Rucaparib in High-Grade Ovarian Carcinoma. *Cancer Discovery*, *7*(9), 984-998. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-17-0419>
- Kostriken, R., Strathern, J. N., Klar, A. J. S., Hicks, J. B., & Heffron, F. (1983). A site-specific endonuclease essential for mating-type switching in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell*, *35*(1), 167-174. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(83\)90219-2](https://doi.org/10.1016/0092-8674(83)90219-2)

- Krejci, L., Damborsky, J., Thomsen, B., Duno, M., & Bendixen, C. (2001). Molecular Dissection of Interactions between Rad51 and Members of the Recombination-Repair Group. *Molecular and Cellular Biology*, 21(3), 966-976. <https://doi.org/10.1128/MCB.21.3.966-976.2001>
- Krejci, L., Macris, M., Li, Y., Komen, S. V., Villemain, J., Ellenberger, T., Klein, H., & Sung, P. (2004). Role of ATP Hydrolysis in the Antirecombinase Function of *Saccharomyces cerevisiae* Srs2 Protein *. *Journal of Biological Chemistry*, 279(22), 23193-23199. <https://doi.org/10.1074/jbc.M402586200>
- Krejci, L., Song, B., Bussen, W., Rothstein, R., Mortensen, U. H., & Sung, P. (2002). Interaction with Rad51 is indispensable for recombination mediator function of Rad52. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(42), 40132-40141. <https://doi.org/10.1074/jbc.M206511200>
- Krejci, L., Van Komen, S., Li, Y., Villemain, J., Reddy, M. S., Klein, H., Ellenberger, T., & Sung, P. (2003). DNA helicase Srs2 disrupts the Rad51 presynaptic filament. *Nature*, 423(6937), Article 6937. <https://doi.org/10.1038/nature01577>
- Krishnamoorthy, A., Jackson, J., Mohamed, T., Adolph, M., Vindigni, A., & Cortez, D. (2021). RADX prevents genome instability by confining replication fork reversal to stalled forks. *Molecular Cell*, 81(14), 3007-3017.e5. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2021.05.014>
- Krogh, B. O., & Symington, L. S. (2004). Recombination proteins in yeast. *Annual Review of Genetics*, 38, 233-271. <https://doi.org/10.1146/annurev.genet.38.072902.091500>
- Kunz, B. A., Ramachandran, K., & Vonarx, E. J. (1998). DNA Sequence Analysis of Spontaneous Mutagenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 148(4), 1491-1505. <https://doi.org/10.1093/genetics/148.4.1491>
- Kurokawa, Y., Murayama, Y., Haruta-Takahashi, N., Urabe, I., & Iwasaki, H. (2008). Reconstitution of DNA Strand Exchange Mediated by Rhp51 Recombinase and Two Mediators. *PLOS Biology*, 6(4), e88. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0060088>
- Kurumizaka, H., Ikawa, S., Nakada, M., Eda, K., Kagawa, W., Takata, M., Takeda, S., Yokoyama, S., & Shibata, T. (2001). Homologous-pairing activity of the human DNA-repair proteins Xrcc3·Rad51C. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(10), 5538-5543. <https://doi.org/10.1073/pnas.091603098>
- Kurumizaka, H., Ikawa, S., Nakada, M., Enomoto, R., Kagawa, W., Kinebuchi, T., Yamazoe, M., Yokoyama, S., & Shibata, T. (2002). Homologous Pairing and Ring and Filament Structure Formation Activities of the Human Xrcc2·Rad51D Complex *. *Journal of Biological Chemistry*, 277(16), 14315-14320. <https://doi.org/10.1074/jbc.M105719200>
- Kuwabara, N., Hashimoto, H., Yamada, N., Unzai, S., Ikeguchi, M., Sato, M., Murayama, Y., Iwasaki, H., & Shimizu, T. (2010). Expression, purification and crystallization of Swi5 and the Swi5–Sfr1 complex from fission yeast. *Acta Crystallographica Section F: Structural Biology and Crystallization Communications*, 66(Pt 9), 1124-1126. <https://doi.org/10.1107/S1744309110032239>
- Kuwabara, N., Murayama, Y., Hashimoto, H., Kokabu, Y., Ikeguchi, M., Sato, M., Mayanagi, K., Tsutsui, Y., Iwasaki, H., & Shimizu, T. (2012). Mechanistic Insights into the Activation of Rad51-Mediated Strand Exchange from the Structure of a Recombination Activator, the Swi5-Sfr1 Complex. *Structure*, 20(3), 440-449. <https://doi.org/10.1016/j.str.2012.01.005>
- Kwon, Y., Seong, C., Chi, P., Greene, E. C., Klein, H., & Sung, P. (2008). ATP-dependent Chromatin Remodeling by the *Saccharomyces cerevisiae* Homologous Recombination Factor Rdh54 *. *Journal of Biological Chemistry*, 283(16), 10445-10452. <https://doi.org/10.1074/jbc.M800082200>
- Laat, W. L. de, Appeldoorn, E., Sugasawa, K., Weterings, E., Jaspers, N. G. J., & Hoeijmakers, J. H. J. (1998). DNA-binding polarity of human replication protein A positions nucleases in nucleotide excision repair. *Genes & Development*, 12(16), 2598-2609. <https://doi.org/10.1101/gad.12.16.2598>
- Lambert, S., & Lopez, B. S. (2002). Inactivation of the RAD51 recombination pathway stimulates UV-induced mutagenesis in mammalian cells. *Oncogene*, 21(25), Article 25. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1205535>

- Lan, W.-H., Lin, S.-Y., Kao, C.-Y., Chang, W.-H., Yeh, H.-Y., Chang, H.-Y., Chi, P., & Li, H.-W. (2020). Rad51 facilitates filament assembly of meiosis-specific Dmc1 recombinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *117*(21), 11257-11264. <https://doi.org/10.1073/pnas.1920368117>
- Laureti, L., Lee, L., Philippin, G., Kahi, M., & Pagès, V. (2022). Single strand gap repair : The presynaptic phase plays a pivotal role in modulating lesion tolerance pathways. *PLOS Genetics*, *18*(6), e1010238. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1010238>
- Lawrence, C. W., & Christensen, R. B. (1979). Metabolic suppressors of trimethoprim and ultraviolet light sensitivities of *Saccharomyces cerevisiae* rad6 mutants. *Journal of Bacteriology*, *139*(3), 866-876. <https://doi.org/10.1128/jb.139.3.866-876.1979>
- Le Breton, C., Dupaigne, P., Robert, T., Le Cam, E., Gangloff, S., Fabre, F., & Veaute, X. (2008). Srs2 removes deadly recombination intermediates independently of its interaction with SUMO-modified PCNA. *Nucleic Acids Research*, *36*(15), 4964-4974. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn441>
- Le, S., Moore, J. K., Haber, J. E., & Greider, C. W. (1999). RAD50 and RAD51 Define Two Pathways That Collaborate to Maintain Telomeres in the Absence of Telomerase. *Genetics*, *152*(1), 143-152. <https://doi.org/10.1093/genetics/152.1.143>
- Lee, J. Y., Terakawa, T., Qi, Z., Steinfeld, J. B., Redding, S., Kwon, Y., Gaines, W. A., Zhao, W., Sung, P., & Greene, E. C. (2015). Base triplet stepping by the Rad51/RecA family of recombinases. *Science*, *349*(6251), 977-981. <https://doi.org/10.1126/science.aab2666>
- Lee, J.-H., & Paull, T. T. (2005). ATM Activation by DNA Double-Strand Breaks Through the Mre11-Rad50-Nbs1 Complex. *Science*, *308*(5721), 551-554. <https://doi.org/10.1126/science.1108297>
- Lemontt, J. F. (1971). Pathways of ultraviolet mutability in *Saccharomyces cerevisiae* : I. Some properties of double mutants involving *uvs9* and *rev*. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, *13*(4), 311-317. [https://doi.org/10.1016/0027-5107\(71\)90041-8](https://doi.org/10.1016/0027-5107(71)90041-8)
- Lemontt, J. F. (1972). Induction of forward mutations in mutationally defective yeast. *Molecular and General Genetics MGG*, *119*(1), 27-42. <https://doi.org/10.1007/BF00270441>
- Lengert, N., Spies, J., & Drossel, B. (2019). Rad54 Phosphorylation Promotes Homologous Recombination by Balancing Rad54 Mobility and DNA Binding. *Biophysical Journal*, *116*(8), 1406-1419. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2019.03.001>
- Lengsfeld, B. M., Rattray, A. J., Bhaskara, V., Ghirlando, R., & Paull, T. T. (2007). Sae2 Is an Endonuclease that Processes Hairpin DNA Cooperatively with the Mre11/Rad50/Xrs2 Complex. *Molecular Cell*, *28*(4), 638-651. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2007.11.001>
- Lettier, G., Feng, Q., Mayolo, A. A. de, Erdeniz, N., Reid, R. J. D., Lisby, M., Mortensen, U. H., & Rothstein, R. (2006). The Role of DNA Double-Strand Breaks in Spontaneous Homologous Recombination in *S. cerevisiae*. *PLOS Genetics*, *2*(11), e194. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.0020194>
- Lewis, L. K., Karthikeyan, G., Westmoreland, J. W., & Resnick, M. A. (2002). Differential Suppression of DNA Repair Deficiencies of Yeast *rad50*, *mre11* and *xrs2* Mutants by EXO1 and TLC1 (the RNA Component of Telomerase). *Genetics*, *160*(1), 49-62. <https://doi.org/10.1093/genetics/160.1.49>
- Li, F., Dong, J., Eichmiller, R., Holland, C., Minca, E., Prakash, R., Sung, P., Yong Shim, E., Surtees, J. A., & Eun Lee, S. (2013). Role of Saw1 in Rad1/Rad10 complex assembly at recombination intermediates in budding yeast. *The EMBO Journal*, *32*(3), 461-472. <https://doi.org/10.1038/emboj.2012.345>
- Li, F., Dong, J., Pan, X., Oum, J.-H., Boeke, J. D., & Lee, S. E. (2008). Microarray-Based Genetic Screen Defines SAW1, a Gene Required for Rad1/Rad10-Dependent Processing of Recombination Intermediates. *Molecular Cell*, *30*(3), 325-335. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2008.02.028>
- Li, J., Holzschu, D. L., & Sugiyama, T. (2013). PCNA is efficiently loaded on the DNA recombination intermediate to modulate polymerase δ , η , and ζ activities. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *110*(19), 7672-7677. <https://doi.org/10.1073/pnas.1222241110>

- Li, S., Wang, H., Jehi, S., Li, J., Liu, S., Wang, Z., Truong, L., Chiba, T., Wang, Z., & Wu, X. (2021). PIF1 helicase promotes break-induced replication in mammalian cells. *The EMBO Journal*, *40*(8), e104509. <https://doi.org/10.15252/embj.2020104509>
- Li, W., & Ma, H. (2006). Double-stranded DNA breaks and gene functions in recombination and meiosis. *Cell Research*, *16*(5), Article 5. <https://doi.org/10.1038/sj.cr.7310052>
- Li, X., & Heyer, W.-D. (2009). RAD54 controls access to the invading 3'-OH end after RAD51-mediated DNA strand invasion in homologous recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Research*, *37*(2), 638-646. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn980>
- Li, X., Stith, C. M., Burgers, P. M., & Heyer, W.-D. (2009). PCNA Is Required for Initiation of Recombination-Associated DNA Synthesis by DNA Polymerase δ . *Molecular Cell*, *36*(4), 704-713. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2009.09.036>
- Li, X., Zhang, X.-P., Solinger, J. A., Kiianitsa, K., Yu, X., Egelman, E. H., & Heyer, W.-D. (2007). Rad51 and Rad54 ATPase activities are both required to modulate Rad51-dsDNA filament dynamics. *Nucleic Acids Research*, *35*(12), 4124-4140. <https://doi.org/10.1093/nar/gkm412>
- Li, Z., Golub, E. I., Gupta, R., & Radding, C. M. (1997). Recombination activities of HsDmc1 protein, the meiotic human homolog of RecA protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *94*(21), 11221-11226. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.21.11221>
- Liang, J., Suhandynata, R. T., & Zhou, H. (2015). Phosphorylation of Sae2 Mediates Forkhead-associated (FHA) Domain-specific Interaction and Regulates Its DNA Repair Function *. *Journal of Biological Chemistry*, *290*(17), 10751-10763. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.625293>
- Liang, P., Lister, K., Yates, L., Argunhan, B., & Zhang, X. (2023). Phosphoregulation of DNA repair via the Rad51 auxiliary factor Swi5-Sfr1. *Journal of Biological Chemistry*, *299*(8). <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2023.104929>
- Liberi, G., Maffioletti, G., Lucca, C., Chiolo, I., Baryshnikova, A., Cotta-Ramusino, C., Lopes, M., Pelliccioli, A., Haber, J. E., & Foiani, M. (2005). Rad51-dependent DNA structures accumulate at damaged replication forks in *sgs1* mutants defective in the yeast ortholog of BLM RecQ helicase. *Genes & Development*, *19*(3), 339-350. <https://doi.org/10.1101/gad.322605>
- Lim, D. S., & Hasty, P. (1996). A mutation in mouse *rad51* results in an early embryonic lethal that is suppressed by a mutation in *p53*. *Molecular and Cellular Biology*, *16*(12), 7133-7143.
- Lim, D.-S., & Hasty, P. (1996). A Mutation in Mouse *rad51* Results in an Early Embryonic Lethal That Is Suppressed by a Mutation in *p53*. *Molecular and Cellular Biology*, *16*(12), 7133-7143. <https://doi.org/10.1128/MCB.16.12.7133>
- Lim, G., Chang, Y., & Huh, W.-K. (2020). Phosphoregulation of Rad51/Rad52 by CDK1 functions as a molecular switch for cell cycle-specific activation of homologous recombination. *Science Advances*, *6*(6), eaay2669. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aay2669>
- Lim, H. S., Kim, J. S., Park, Y. B., Gwon, G. H., & Cho, Y. (2011). Crystal structure of the Mre11-Rad50-ATPyS complex : Understanding the interplay between Mre11 and Rad50. *Genes & Development*, *25*(10), 1091-1104. <https://doi.org/10.1101/gad.2037811>
- Lin, F.-L., Sperle, K., & Sternberg, N. (1984). Model for Homologous Recombination During Transfer of DNA into Mouse L Cells : Role for DNA Ends in the Recombination Process. *Molecular and Cellular Biology*, *4*(6), 1020-1034. <https://doi.org/10.1128/mcb.4.6.1020-1034.1984>
- Lin, Z., Kong, H., Nei, M., & Ma, H. (2006). Origins and evolution of the *recA/RAD51* gene family : Evidence for ancient gene duplication and endosymbiotic gene transfer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *103*(27), 10328-10333. <https://doi.org/10.1073/pnas.0604232103>
- Lio, Y.-C., Mazin, A. V., Kowalczykowski, S. C., & Chen, D. J. (2003). Complex Formation by the Human Rad51B and Rad51C DNA Repair Proteins and Their Activities in Vitro *. *Journal of Biological Chemistry*, *278*(4), 2469-2478. <https://doi.org/10.1074/jbc.M211038200>
- Lisby, M., Barlow, J. H., Burgess, R. C., & Rothstein, R. (2004). Choreography of the DNA Damage Response : Spatiotemporal Relationships among Checkpoint and Repair Proteins. *Cell*, *118*(6), 699-713. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.08.015>

- Lisby, M., & Rothstein, R. (2009). Choreography of recombination proteins during the DNA damage response. *DNA Repair*, 8(9), 1068-1076. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2009.04.007>
- Liu, J., Doty, T., Gibson, B., & Heyer, W.-D. (2010). Human BRCA2 protein promotes RAD51 filament formation on RPA-covered single-stranded DNA. *Nature Structural & Molecular Biology*, 17(10), Article 10. <https://doi.org/10.1038/nsmb.1904>
- Liu, J., Ede, C., Wright, W. D., Gore, S. K., Jenkins, S. S., Freudenthal, B. D., Todd Washington, M., Veaute, X., & Heyer, W.-D. (2017). Srs2 promotes synthesis-dependent strand annealing by disrupting DNA polymerase δ -extending D-loops. *eLife*, 6, e22195. <https://doi.org/10.7554/eLife.22195>
- Liu, J., Renault, L., Veaute, X., Fabre, F., Stahlberg, H., & Heyer, W.-D. (2011). Rad51 paralogs Rad55-Rad57 balance the anti-recombinase Srs2 in Rad51 filament formation. *Nature*, 479(7372), 245-248. <https://doi.org/10.1038/nature10522>
- Liu, T., Wan, L., Wu, Y., Chen, J., & Huang, J. (2011). hSWS1-SWSAP1 Is an Evolutionarily Conserved Complex Required for Efficient Homologous Recombination Repair *. *Journal of Biological Chemistry*, 286(48), 41758-41766. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.271080>
- Liu, W., Saito, Y., Jackson, J., Bhowmick, R., Kanemaki, M. T., Vindigni, A., & Cortez, D. (2023). RAD51 bypasses the CMG helicase to promote replication fork reversal. *Science*, 380(6643), 382-387. <https://doi.org/10.1126/science.add7328>
- Lloyd, J. A., McGrew, D. A., & Knight, K. L. (2005). Identification of Residues Important for DNA Binding in the Full-length Human Rad52 Protein. *Journal of Molecular Biology*, 345(2), 239-249. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2004.10.065>
- Lo, T., Pellegrini, L., Venkitaraman, A. R., & Blundell, T. L. (2003). Sequence fingerprints in BRCA2 and RAD51 : Implications for DNA repair and cancer. *DNA Repair*, 2(9), 1015-1028. [https://doi.org/10.1016/S1568-7864\(03\)00097-1](https://doi.org/10.1016/S1568-7864(03)00097-1)
- Lobachev, K., Vitriol, E., Stemple, J., Resnick, M. A., & Bloom, K. (2004). Chromosome fragmentation after induction of a double-strand break is an active process prevented by the RMX repair complex. *Current Biology: CB*, 14(23), 2107-2112. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2004.11.051>
- Lok, B. H., Carley, A. C., Tchang, B., & Powell, S. N. (2013). RAD52 inactivation is synthetically lethal with deficiencies in BRCA1 and PALB2 in addition to BRCA2 through RAD51-mediated homologous recombination. *Oncogene*, 32(30), Article 30. <https://doi.org/10.1038/onc.2012.391>
- Lok, B. H., & Powell, S. N. (2012). Molecular Pathways : Understanding the Role of Rad52 in Homologous Recombination for Therapeutic Advancement. *Clinical Cancer Research*, 18(23), 6400-6406. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-11-3150>
- Longhese, M. P., Plevani, P., & Lucchini, G. (1994). Replication factor A is required in vivo for DNA replication, repair, and recombination. *Molecular and Cellular Biology*, 14(12), 7884-7890. <https://doi.org/10.1128/mcb.14.12.7884-7890.1994>
- Longo, M. A., Roy, S., Chen, Y., Tomaszowski, K.-H., Arvai, A. S., Pepper, J. T., Boisvert, R. A., Kunnimalaiyaan, S., Keshvani, C., Schild, D., Bacolla, A., Williams, G. J., Tainer, J. A., & Schlacher, K. (2023). RAD51C-XRCC3 structure and cancer patient mutations define DNA replication roles. *Nature Communications*, 14(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-40096-1>
- Longtine, M. S., Mckenzie III, A., Demarini, D. J., Shah, N. G., Wach, A., Brachat, A., Philippsen, P., & Pringle, J. R. (1998). Additional modules for versatile and economical PCR-based gene deletion and modification in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 14(10), 953-961. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0061\(199807\)14:10<953::AID-YEA293>3.0.CO;2-U](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0061(199807)14:10<953::AID-YEA293>3.0.CO;2-U)
- Lopes, M., Foiani, M., & Sogo, J. M. (2006). Multiple Mechanisms Control Chromosome Integrity after Replication Fork Uncoupling and Restart at Irreparable UV Lesions. *Molecular Cell*, 21(1), 15-27. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2005.11.015>
- Lovett, S. T., & Mortimer, R. K. (1987). Characterization of null mutants of the RAD55 gene of *Saccharomyces cerevisiae* : Effects of temperature, osmotic strength and mating type. *Genetics*, 116(4), 547-553.

- Lu, C.-H., Yeh, H.-Y., Su, G.-C., Ito, K., Kurokawa, Y., Iwasaki, H., Chi, P., & Li, H.-W. (2018). Swi5–Sfr1 stimulates Rad51 recombinase filament assembly by modulating Rad51 dissociation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *115*(43), E10059-E10068. <https://doi.org/10.1073/pnas.1812753115>
- Lundin, C., North, M., Erixon, K., Walters, K., Jessen, D., Goldman, A. S. H., & Helleday, T. (2005). Methyl methanesulfonate (MMS) produces heat-labile DNA damage but no detectable in vivo DNA double-strand breaks. *Nucleic Acids Research*, *33*(12), 3799-3811. <https://doi.org/10.1093/nar/gki681>
- Luo, S.-C., Yeh, M.-C., Lien, Y.-H., Yeh, H.-Y., Siao, H.-L., Tu, I.-P., Chi, P., & Ho, M.-C. (2023). A RAD51–ADP double filament structure unveils the mechanism of filament dynamics in homologous recombination. *Nature Communications*, *14*(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-40672-5>
- Lydeard, J. R., Jain, S., Yamaguchi, M., & Haber, J. E. (2007). Break-induced replication and telomerase-independent telomere maintenance require Pol32. *Nature*, *448*(7155), Article 7155. <https://doi.org/10.1038/nature06047>
- Lydeard, J. R., Lipkin-Moore, Z., Sheu, Y.-J., Stillman, B., Burgers, P. M., & Haber, J. E. (2010). Break-induced replication requires all essential DNA replication factors except those specific for pre-RC assembly. *Genes & Development*, *24*(11), 1133-1144. <https://doi.org/10.1101/gad.1922610>
- Lyndaker, A. M., & Alani, E. (2009). A tale of tails : Insights into the coordination of 3' end processing during homologous recombination. *BioEssays*, *31*(3), 315-321. <https://doi.org/10.1002/bies.200800195>
- Ma, C. J., Gibb, B., Kwon, Y., Sung, P., & Greene, E. C. (2017). Protein dynamics of human RPA and RAD51 on ssDNA during assembly and disassembly of the RAD51 filament. *Nucleic Acids Research*, *45*(2), 749-761. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw1125>
- Ma, E., Dupaigne, P., Maloisel, L., Guerois, R., Le Cam, E., & Coïc, E. (2018). Rad52-Rad51 association is essential to protect Rad51 filaments against Srs2, but facultative for filament formation. *eLife*, *7*. <https://doi.org/10.7554/eLife.32744>
- Ma, E., Maloisel, L., Le Falher, L., Guérois, R., & Coïc, E. (2021). Rad52 Oligomeric N-Terminal Domain Stabilizes Rad51 Nucleoprotein Filaments and Contributes to Their Protection against Srs2. *Cells*, *10*(6), Article 6. <https://doi.org/10.3390/cells10061467>
- Ma, W., Westmoreland, J. W., & Resnick, M. A. (2013). Homologous recombination rescues ssDNA gaps generated by nucleotide excision repair and reduced translesion DNA synthesis in yeast G2 cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *110*(31), E2895-E2904. <https://doi.org/10.1073/pnas.1301676110>
- Mahajan, S., Raina, K., Verma, S., & Rao, B. J. (2019). Human RAD52 protein regulates homologous recombination and checkpoint function in BRCA2 deficient cells. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, *107*, 128-139. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2018.12.013>
- Malkova, A., Ivanov, E. L., & Haber, J. E. (1996). Double-strand break repair in the absence of RAD51 in yeast : A possible role for break-induced DNA replication. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *93*(14), 7131-7136. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.14.7131>
- Maloisel, L., Bhargava, J., & Roeder, G. S. (2004). A Role for DNA Polymerase δ in Gene Conversion and Crossing Over During Meiosis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, *167*(3), 1133-1142. <https://doi.org/10.1534/genetics.104.026260>
- Maloisel, L., Fabre, F., & Gangloff, S. (2008). DNA Polymerase δ Is Preferentially Recruited during Homologous Recombination To Promote Heteroduplex DNA Extension. *Molecular and Cellular Biology*, *28*(4), 1373-1382. <https://doi.org/10.1128/MCB.01651-07>
- Maloisel, L., Ma, E., Phipps, J., Deshayes, A., Mattarocci, S., Marcand, S., Dubrana, K., & Coïc, E. (2023). Rad51 filaments assembled in the absence of the complex formed by the Rad51 paralogs Rad55 and Rad57 are outcompeted by translesion DNA polymerases on UV-induced ssDNA gaps. *PLOS Genetics*, *19*(2), e1010639. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1010639>

- Malone, R. E., & Esposito, R. E. (1980). The RAD52 gene is required for homothallic interconversion of mating types and spontaneous mitotic recombination in yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 77(1), 503-507. <https://doi.org/10.1073/pnas.77.1.503>
- Mankouri, H. W., & Hickson, I. D. (2007). The RecQ helicase–topoisomerase III–Rmi1 complex : A DNA structure-specific ‘dissolvasome’? *Trends in Biochemical Sciences*, 32(12), 538-546. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2007.09.009>
- Mankouri, H. W., Ngo, H.-P., & Hickson, I. D. (2007). Shu Proteins Promote the Formation of Homologous Recombination Intermediates That Are Processed by Sgs1-Rmi1-Top3. *Molecular Biology of the Cell*, 18(10), 4062-4073. <https://doi.org/10.1091/mbc.e07-05-0490>
- Maréchal, A., & Zou, L. (2015). RPA-coated single-stranded DNA as a platform for post-translational modifications in the DNA damage response. *Cell Research*, 25(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/cr.2014.147>
- Marini, V., & Krejci, L. (2012). Unwinding of synthetic replication and recombination substrates by Srs2. *DNA Repair*, 11(10), 789-798. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2012.05.007>
- Martín, V., Chahwan, C., Gao, H., Blais, V., Wohlschlegel, J., Yates III, J. R., McGowan, C. H., & Russell, P. (2006). Sws1 is a conserved regulator of homologous recombination in eukaryotic cells. *The EMBO Journal*, 25(11), 2564-2574. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601141>
- Martino, J., Brunette, G. J., Barroso-González, J., Moiseeva, T. N., Smith, C. M., Bakkenist, C. J., O’Sullivan, R. J., & Bernstein, K. A. (2019). The human Shu complex functions with PDS5B and SPIDR to promote homologous recombination. *Nucleic Acids Research*, 47(19), 10151-10165. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz738>
- Maryon, E., & Carroll, D. (1991). Characterization of Recombination Intermediates from DNA Injected into *Xenopus laevis* Oocytes : Evidence for a Nonconservative Mechanism of Homologous Recombination. *Molecular and Cellular Biology*, 11(6), 3278-3287. <https://doi.org/10.1128/mcb.11.6.3278-3287.1991>
- Mason, J. M., Chan, Y.-L., Weichselbaum, R. W., & Bishop, D. K. (2019). Non-enzymatic roles of human RAD51 at stalled replication forks. *Nature Communications*, 10(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-12297-0>
- Masson, J.-Y., Davies, A. A., Hajibagheri, N., Van Dyck, E., Benson, F. E., Stasiak, A. Z., Stasiak, A., & West, S. C. (1999). The meiosis-specific recombinase hDmc1 forms ring structures and interacts with hRad51. *The EMBO Journal*, 18(22), 6552-6560. <https://doi.org/10.1093/emboj/18.22.6552>
- Masson, J.-Y., Stasiak, A. Z., Stasiak, A., Benson, F. E., & West, S. C. (2001). Complex formation by the human RAD51C and XRCC3 recombination repair proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(15), 8440-8446. <https://doi.org/10.1073/pnas.111005698>
- Masson, J.-Y., Tarsounas, M. C., Stasiak, A. Z., Stasiak, A., Shah, R., McIlwraith, M. J., Benson, F. E., & West, S. C. (2001). Identification and purification of two distinct complexes containing the five RAD51 paralogs. *Genes & Development*, 15(24), 3296-3307. <https://doi.org/10.1101/gad.947001>
- Masson, J.-Y., & West, S. C. (2001). The Rad51 and Dmc1 recombinases : A non-identical twin relationship. *Trends in Biochemical Sciences*, 26(2), 131-136. [https://doi.org/10.1016/S0968-0004\(00\)01742-4](https://doi.org/10.1016/S0968-0004(00)01742-4)
- Matos, J., Blanco, M. G., Maslen, S., Skehel, J. M., & West, S. C. (2011). Regulatory Control of the Resolution of DNA Recombination Intermediates during Meiosis and Mitosis. *Cell*, 147(1), 158-172. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.08.032>
- Matos, J., & West, S. C. (2014). Holliday junction resolution : Regulation in space and time. *DNA Repair*, 19, 176-181. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2014.03.013>
- Matsuzaki, K., Kondo, S., Ishikawa, T., & Shinohara, A. (2019). Human RAD51 paralogue SWSAP1 fosters RAD51 filament by regulating the anti-recombinase FIGNL1 AAA+ ATPase. *Nature Communications*, 10. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-09190-1>

- Matulova, P., Marini, V., Burgess, R. C., Sisakova, A., Kwon, Y., Rothstein, R., Sung, P., & Krejci, L. (2009). Cooperativity of Mus81-Mms4 with Rad54 in the Resolution of Recombination and Replication Intermediates*. *Journal of Biological Chemistry*, 284(12), 7733-7745. <https://doi.org/10.1074/jbc.M806192200>
- Mavaddat, N., Peock, S., Frost, D., Ellis, S., Platte, R., Fineberg, E., Evans, D. G., Izatt, L., Eeles, R. A., Adlard, J., Davidson, R., Eccles, D., Cole, T., Cook, J., Brewer, C., Tischkowitz, M., Douglas, F., Hodgson, S., Walker, L., ... on behalf of EMBRACE. (2013). Cancer Risks for BRCA1 and BRCA2 Mutation Carriers : Results From Prospective Analysis of EMBRACE. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, 105(11), 812-822. <https://doi.org/10.1093/jnci/djt095>
- Mayle, R., Campbell, I. M., Beck, C. R., Yu, Y., Wilson, M., Shaw, C. A., Bjergbaek, L., Lupski, J. R., & Ira, G. (2015). Mus81 and converging forks limit the mutagenicity of replication fork breakage. *Science*, 349(6249), 742-747. <https://doi.org/10.1126/science.aaa8391>
- Mazin, A. V., Alexeev, A. A., & Kowalczykowski, S. C. (2003). A Novel Function of Rad54 Protein : STABILIZATION OF THE Rad51 NUCLEOPROTEIN FILAMENT *. *Journal of Biological Chemistry*, 278(16), 14029-14036. <https://doi.org/10.1074/jbc.M212779200>
- Mazin, A. V., Bornarth, C. J., Solinger, J. A., Heyer, W.-D., & Kowalczykowski, S. C. (2000). Rad54 Protein Is Targeted to Pairing Loci by the Rad51 Nucleoprotein Filament. *Molecular Cell*, 6(3), 583-592. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(00\)00057-5](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(00)00057-5)
- Mazin, A. V., & Kowalczykowski, S. C. (1998). The function of the secondary DNA-binding site of RecA protein during DNA strand exchange. *The EMBO Journal*, 17(4), 1161-1168. <https://doi.org/10.1093/emboj/17.4.1161>
- Mazina, O. M., & Mazin, A. V. (2004). Human Rad54 Protein Stimulates DNA Strand Exchange Activity of hRad51 Protein in the Presence of Ca²⁺*♦. *Journal of Biological Chemistry*, 279(50), 52042-52051. <https://doi.org/10.1074/jbc.M410244200>
- Mazina, O. M., & Mazin, A. V. (2008). Human Rad54 protein stimulates human Mus81–Eme1 endonuclease. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(47), 18249-18254. <https://doi.org/10.1073/pnas.0807016105>
- Mazina, O. M., Rossi, M. J., Thomaö, N. H., & Mazin, A. V. (2007). Interactions of Human Rad54 Protein with Branched DNA Molecules*. *Journal of Biological Chemistry*, 282(29), 21068-21080. <https://doi.org/10.1074/jbc.M701992200>
- Mazón, G., & Symington, L. S. (2013). Mph1 and Mus81-Mms4 Prevent Aberrant Processing of Mitotic Recombination Intermediates. *Molecular Cell*, 52(1), 63-74. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2013.09.007>
- McDonald, J. P., Levine, A. S., & Woodgate, R. (1997). The *Saccharomyces cerevisiae* RAD30 Gene, a Homologue of *Escherichia coli* dinB and umuC, Is DNA Damage Inducible and Functions in a Novel Error-Free Postreplication Repair Mechanism. *Genetics*, 147(4), 1557-1568. <https://doi.org/10.1093/genetics/147.4.1557>
- McEachern, M. J., & Haber, J. E. (2006). Break-Induced Replication and Recombinational Telomere Elongation in Yeast. *Annual Review of Biochemistry*, 75(1), 111-135. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.74.082803.133234>
- McGill, C., Shafer, B., & Strathern, J. (1989). Coconversion of flanking sequences with homothallic switching. *Cell*, 57(3), 459-467. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(89\)90921-5](https://doi.org/10.1016/0092-8674(89)90921-5)
- McIlwraith, M. J., Vaisman, A., Liu, Y., Fanning, E., Woodgate, R., & West, S. C. (2005). Human DNA Polymerase η Promotes DNA Synthesis from Strand Invasion Intermediates of Homologous Recombination. *Molecular Cell*, 20(5), 783-792. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2005.10.001>
- Mehta, K. P. M., Thada, V., Zhao, R., Krishnamoorthy, A., Leser, M., Lindsey Rose, K., & Cortez, D. (2022). CHK1 phosphorylates PRIMPOL to promote replication stress tolerance. *Science Advances*, 8(13), eabm0314. <https://doi.org/10.1126/sciadv.abm0314>
- Meindl, A., Hellebrand, H., Wiek, C., Erven, V., Wappenschmidt, B., Niederacher, D., Freund, M., Lichtner, P., Hartmann, L., Schaal, H., Ramser, J., Honisch, E., Kubisch, C., Wichmann, H. E., Kast, K., Deißler, H., Engel, C., Müller-Myhsok, B., Neveling, K., ... Hanenberg, H. (2010).

- Germline mutations in breast and ovarian cancer pedigrees establish RAD51C as a human cancer susceptibility gene. *Nature Genetics*, 42(5), Article 5. <https://doi.org/10.1038/ng.569>
- Meselson, M. S., & Radding, C. M. (1975). A general model for genetic recombination. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 72(1), 358-361. <https://doi.org/10.1073/pnas.72.1.358>
- Mijic, S., Zellweger, R., Chappidi, N., Berti, M., Jacobs, K., Mutreja, K., Ursich, S., Ray Chaudhuri, A., Nussenzweig, A., Janscak, P., & Lopes, M. (2017). Replication fork reversal triggers fork degradation in BRCA2-defective cells. *Nature Communications*, 8(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-01164-5>
- Miller, K. A., Yoshikawa, D. M., McConnell, I. R., Clark, R., Schild, D., & Albalá, J. S. (2002). RAD51C Interacts with RAD51B and Is Central to a Larger Protein Complex in Vivo Exclusive of RAD51. *Journal of Biological Chemistry*, 277(10), 8406-8411. <https://doi.org/10.1074/jbc.M108306200>
- Milne, G. T., & Weaver, D. T. (1993). Dominant negative alleles of RAD52 reveal a DNA repair/recombination complex including Rad51 and Rad52. *Genes & Development*, 7(9), 1755-1765. <https://doi.org/10.1101/gad.7.9.1755>
- Mimitou, E. P., & Symington, L. S. (2008). Sae2, Exo1 and Sgs1 collaborate in DNA double-strand break processing. *Nature*, 455(7214), Article 7214. <https://doi.org/10.1038/nature07312>
- Minca, E. C., & Kowalski, D. (2010). Multiple Rad5 Activities Mediate Sister Chromatid Recombination to Bypass DNA Damage at Stalled Replication Forks. *Molecular Cell*, 38(5), 649-661. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.03.020>
- Miné, J., Disseau, L., Takahashi, M., Cappello, G., Dutreix, M., & Viovy, J.-L. (2007). Real-time measurements of the nucleation, growth and dissociation of single Rad51-DNA nucleoprotein filaments. *Nucleic Acids Research*, 35(21), 7171-7187. <https://doi.org/10.1093/nar/gkm752>
- Miné-Hattab, J., Recamier, V., Izeddin, I., Rothstein, R., & Darzacq, X. (2017). Multi-scale tracking reveals scale-dependent chromatin dynamics after DNA damage. *Molecular Biology of the Cell*, 28(23), 3323-3332. <https://doi.org/10.1091/mbc.e17-05-0317>
- Mirdita, M., Schütze, K., Moriwaki, Y., Heo, L., Ovchinnikov, S., & Steinegger, M. (2022). ColabFold : Making protein folding accessible to all. *Nature Methods*, 19(6), Article 6. <https://doi.org/10.1038/s41592-022-01488-1>
- Miura, T., Shibata, T., & Kusano, K. (2013). Putative antirecombinase Srs2 DNA helicase promotes noncrossover homologous recombination avoiding loss of heterozygosity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(40), 16067-16072. <https://doi.org/10.1073/pnas.1303111110>
- Möckel, C., Lammens, K., Schele, A., & Hopfner, K.-P. (2012). ATP driven structural changes of the bacterial Mre11:Rad50 catalytic head complex. *Nucleic Acids Research*, 40(2), 914-927. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr749>
- Modesti, M., Ristic, D., Heijden, T. van der, Dekker, C., Mameren, J. van, Peterman, E. J. G., Wuite, G. J. L., Kanaar, R., & Wyman, C. (2007). Fluorescent Human RAD51 Reveals Multiple Nucleation Sites and Filament Segments Tightly Associated along a Single DNA Molecule. *Structure*, 15(5), 599-609. <https://doi.org/10.1016/j.str.2007.04.003>
- Mohan, M., Akula, D., Dhillon, A., Goyal, A., & Anindya, R. (2019). Human RAD51 paralogue RAD51C fosters repair of alkylated DNA by interacting with the ALKBH3 demethylase. *Nucleic Acids Research*, 47(22), 11729-11745. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz938>
- Moldovan, G.-L., & D'Andrea, A. D. (2009). How the Fanconi Anemia Pathway Guards the Genome. *Annual Review of Genetics*, 43(1), 223-249. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-102108-134222>
- Moldovan, G.-L., Dejsuphong, D., Petalcorin, M. I. R., Hofmann, K., Takeda, S., Boulton, S. J., & D'Andrea, A. D. (2012). Inhibition of Homologous Recombination by the PCNA-Interacting Protein PARI. *Molecular Cell*, 45(1), 75-86. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2011.11.010>
- Moldovan, G.-L., Pfander, B., & Jentsch, S. (2007). PCNA, the maestro of the replication fork. *Cell*, 129(4), 665-679. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.05.003>

- Morrison, C., Shinohara, A., Sonoda, E., Yamaguchi-Iwai, Y., Takata, M., Weichselbaum, R. R., & Takeda, S. (1999). The Essential Functions of Human Rad51 Are Independent of ATP Hydrolysis. *Molecular and Cellular Biology*, *19*(10), 6891-6897. <https://doi.org/10.1128/MCB.19.10.6891>
- Morrow, D. M., Connelly, C., & Hieter, P. (1997). "Break Copy" Duplication : A Model for Chromosome Fragment Formation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, *147*(2), 371-382. <https://doi.org/10.1093/genetics/147.2.371>
- Mortensen, U. H., Bendixen, C., Sunjevaric, I., & Rothstein, R. (1996). DNA strand annealing is promoted by the yeast Rad52 protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *93*(20), 10729-10734. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.20.10729>
- Mosig, G. (1987). The Essential Role of Recombination in Phage T4 Growth. *Annual Review of Genetics*, *21*(1), 347-371. <https://doi.org/10.1146/annurev.ge.21.120187.002023>
- Mozlin, A. M., Fung, C. W., & Symington, L. S. (2008). Role of the *Saccharomyces cerevisiae* Rad51 Paralogs in Sister Chromatid Recombination. *Genetics*, *178*(1), 113-126. <https://doi.org/10.1534/genetics.107.082677>
- Mueller, J. E., Clyman, J., Huang, Y. J., Parker, M. M., & Belfort, M. (1996). Intron mobility in phage T4 occurs in the context of recombination-dependent DNA replication by way of multiple pathways. *Genes & Development*, *10*(3), 351-364. <https://doi.org/10.1101/gad.10.3.351>
- Muhammad, A. A., Basto, C., Peterlini, T., Guirouilh-Barbat, J., Thomas, M., Veaute, X., Busso, D., Lopez, B., Mazon, G., Cam, E. L., Masson, J.-Y., & Dupaigne, P. (2024). Human RAD52 stimulates the RAD51-mediated homology search. *Life Science Alliance*, *7*(3). <https://doi.org/10.26508/lsa.202201751>
- Mukherjee, S., Wright, W. D., Ehmsen, K. T., & Heyer, W.-D. (2014). The Mus81-Mms4 structure-selective endonuclease requires nicked DNA junctions to undergo conformational changes and bend its DNA substrates for cleavage. *Nucleic Acids Research*, *42*(10), 6511-6522. <https://doi.org/10.1093/nar/gku265>
- Mullen, J. R., Kaliraman, V., Ibrahim, S. S., & Brill, S. J. (2001). Requirement for Three Novel Protein Complexes in the Absence of the Sgs1 DNA Helicase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, *157*(1), 103-118. <https://doi.org/10.1093/genetics/157.1.103>
- Mullen, J. R., Nallaseth, F. S., Lan, Y. Q., Slagle, C. E., & Brill, S. J. (2005). Yeast Rmi1/Nce4 Controls Genome Stability as a Subunit of the Sgs1-Top3 Complex. *Molecular and Cellular Biology*, *25*(11), 4476-4487. <https://doi.org/10.1128/MCB.25.11.4476-4487.2005>
- Nakada, D., Matsumoto, K., & Sugimoto, K. (2003). ATM-related Tel1 associates with double-strand breaks through an Xrs2-dependent mechanism. *Genes & Development*, *17*(16), 1957-1962. <https://doi.org/10.1101/gad.1099003>
- Nalepa, G., & Clapp, D. W. (2018). Fanconi anaemia and cancer : An intricate relationship. *Nature Reviews Cancer*, *18*(3), Article 3. <https://doi.org/10.1038/nrc.2017.116>
- Namsaraev, E. A., & Berg, P. (1998). Binding of Rad51p to DNA : INTERACTION OF Rad51p WITH SINGLE- AND DOUBLE-STRANDED DNA*. *Journal of Biological Chemistry*, *273*(11), 6177-6182. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.11.6177>
- Nasmyth, K. A. (1982). Molecular Genetics of Yeast Mating Type. *Annual Review of Genetics*, *16*(1), 439-500. <https://doi.org/10.1146/annurev.ge.16.120182.002255>
- Nassif, N., Penney, J., Pal, S., Engels, W. R., & Gloor, G. B. (1994). Efficient Copying of Nonhomologous Sequences from Ectopic Sites via P-Element-Induced Gap Repair. *Molecular and Cellular Biology*, *14*(3), 1613-1625. <https://doi.org/10.1128/mcb.14.3.1613-1625.1994>
- Neelsen, K. J., & Lopes, M. (2015). Replication fork reversal in eukaryotes : From dead end to dynamic response. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *16*(4), Article 4. <https://doi.org/10.1038/nrm3935>
- Nelson, H. H., Sweetser, D. B., & Nickoloff, J. A. (1996). Effects of Terminal Nonhomology and Homeology on Double-Strand-Break-Induced Gene Conversion Tract Directionality. *Molecular and Cellular Biology*, *16*(6), 2951-2957. <https://doi.org/10.1128/MCB.16.6.2951>

- Nelson, J. R., Lawrence, C. W., & Hinkle, D. C. (1996a). Deoxycytidyl transferase activity of yeast REV1 protein. *Nature*, 382(6593), Article 6593. <https://doi.org/10.1038/382729a0>
- Nelson, J. R., Lawrence, C. W., & Hinkle, D. C. (1996b). Thymine-Thymine Dimer Bypass by Yeast DNA Polymerase ζ . *Science*, 272(5268), 1646-1649. <https://doi.org/10.1126/science.272.5268.1646>
- New, J. H., Sugiyama, T., Zaitseva, E., & Kowalczykowski, S. C. (1998). Rad52 protein stimulates DNA strand exchange by Rad51 and replication protein A. *Nature*, 391(6665), Article 6665. <https://doi.org/10.1038/34950>
- Nicolette, M. L., Lee, K., Guo, Z., Rani, M., Chow, J. M., Lee, S. E., & Paull, T. T. (2010). Mre11–Rad50–Xrs2 and Sae2 promote 5' strand resection of DNA double-strand breaks. *Nature Structural & Molecular Biology*, 17(12), Article 12. <https://doi.org/10.1038/nsmb.1957>
- Niimi, A., Brown, S., Sabbioneda, S., Kannouche, P. L., Scott, A., Yasui, A., Green, C. M., & Lehmann, A. R. (2008). Regulation of proliferating cell nuclear antigen ubiquitination in mammalian cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(42), 16125-16130. <https://doi.org/10.1073/pnas.0802727105>
- Nimonkar, A. V., Amitani, I., Baskin, R. J., & Kowalczykowski, S. C. (2007). Single Molecule Imaging of Tid1/Rdh54, a Rad54 Homolog That Translocates on Duplex DNA and Can Disrupt Joint Molecules *. *Journal of Biological Chemistry*, 282(42), 30776-30784. <https://doi.org/10.1074/jbc.M704767200>
- Nimonkar, A. V., Dombrowski, C. C., Siino, J. S., Stasiak, A. Z., Stasiak, A., & Kowalczykowski, S. C. (2012). Saccharomyces cerevisiae Dmc1 and Rad51 Proteins Preferentially Function with Tid1 and Rad54 Proteins, Respectively, to Promote DNA Strand Invasion during Genetic Recombination *. *Journal of Biological Chemistry*, 287(34), 28727-28737. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.373290>
- Nimonkar, A. V., Genschel, J., Kinoshita, E., Polaczek, P., Campbell, J. L., Wyman, C., Modrich, P., & Kowalczykowski, S. C. (2011). BLM–DNA2–RPA–MRN and EXO1–BLM–RPA–MRN constitute two DNA end resection machineries for human DNA break repair. *Genes & Development*, 25(4), 350-362. <https://doi.org/10.1101/gad.2003811>
- Nimonkar, A. V., Sica, R. A., & Kowalczykowski, S. C. (2009). Rad52 promotes second-end DNA capture in double-stranded break repair to form complement-stabilized joint molecules. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(9), 3077-3082. <https://doi.org/10.1073/pnas.0813247106>
- Niu, H., Chung, W.-H., Zhu, Z., Kwon, Y., Zhao, W., Chi, P., Prakash, R., Seong, C., Liu, D., Lu, L., Ira, G., & Sung, P. (2010). Mechanism of the ATP-dependent DNA end-resection machinery from Saccharomyces cerevisiae. *Nature*, 467(7311), Article 7311. <https://doi.org/10.1038/nature09318>
- Noordermeer, S. M., & van Attikum, H. (2019). PARP Inhibitor Resistance : A Tug-of-War in BRCA-Mutated Cells. *Trends in Cell Biology*, 29(10), 820-834. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2019.07.008>
- O'Connor, M. J. (2015). Targeting the DNA Damage Response in Cancer. *Molecular Cell*, 60(4), 547-560. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.10.040>
- Ogawa, T., Yu, X., Shinohara, A., & Egelman, E. H. (1993). Similarity of the Yeast RAD51 Filament to the Bacterial RecA Filament. *Science*, 259(5103), 1896-1899. <https://doi.org/10.1126/science.8456314>
- Oh, J., Al-Zain, A., Cannavo, E., Cejka, P., & Symington, L. S. (2016). Xrs2 Dependent and Independent Functions of the Mre11-Rad50 Complex. *Molecular Cell*, 64(2), 405-415. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.09.011>
- Oh, S. D., Lao, J. P., Hwang, P. Y.-H., Taylor, A. F., Smith, G. R., & Hunter, N. (2007). BLM Ortholog, Sgs1, Prevents Aberrant Crossing-over by Suppressing Formation of Multichromatid Joint Molecules. *Cell*, 130(2), 259-272. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.05.035>
- Onoda, F., Seki, M., Miyajima, A., & Enomoto, T. (2000). Elevation of sister chromatid exchange in Saccharomyces cerevisiae sgs1 disruptants and the relevance of the disruptants as a system

- to evaluate mutations in Bloom's syndrome gene. *Mutation Research/DNA Repair*, 459(3), 203-209. [https://doi.org/10.1016/S0921-8777\(99\)00071-3](https://doi.org/10.1016/S0921-8777(99)00071-3)
- Orhan, E., Velazquez, C., Tabet, I., Sardet, C., & Theillet, C. (2021). Regulation of RAD51 at the Transcriptional and Functional Levels : What Prospects for Cancer Therapy? *Cancers*, 13(12), Article 12. <https://doi.org/10.3390/cancers13122930>
- Orr-Weaver, T. L., Szostak, J. W., & Rothstein, R. J. (1981). Yeast transformation : A model system for the study of recombination. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 78(10), 6354-6358. <https://doi.org/10.1073/pnas.78.10.6354>
- Osia, B., Twarowski, J., Jackson, T., Lobachev, K., Liu, L., & Malkova, A. (2022). Migrating bubble synthesis promotes mutagenesis through lesions in its template. *Nucleic Acids Research*, 50(12), 6870-6889. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac520>
- Palladino, F., & Klein, H. L. (1992). Analysis of mitotic and meiotic defects in *Saccharomyces cerevisiae* SRS2 DNA helicase mutants. *Genetics*, 132(1), 23-37. <https://doi.org/10.1093/genetics/132.1.23>
- Pannunzio, N. R., Manthey, G. M., Liddell, L. C., Fu, B. X. H., Roberts, C. M., & Bailis, A. M. (2012). Rad59 regulates association of Rad52 with DNA double-strand breaks. *MicrobiologyOpen*, 1(3), 285-297. <https://doi.org/10.1002/mbo3.31>
- Papouli, E., Chen, S., Davies, A. A., Huttner, D., Krejci, L., Sung, P., & Ulrich, H. D. (2005). Crosstalk between SUMO and Ubiquitin on PCNA Is Mediated by Recruitment of the Helicase Srs2p. *Molecular Cell*, 19(1), 123-133. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2005.06.001>
- Pâques, F., & Haber, J. E. (1999). Multiple pathways of recombination induced by double-strand breaks in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR*, 63(2), 349-404.
- Pâques, F., Leung, W.-Y., & Haber, J. E. (1998). Expansions and Contractions in a Tandem Repeat Induced by Double-Strand Break Repair. *Molecular and Cellular Biology*, 18(4), 2045-2054. <https://doi.org/10.1128/MCB.18.4.2045>
- Pardo, B., & Aguilera, A. (2012). Complex Chromosomal Rearrangements Mediated by Break-Induced Replication Involve Structure-Selective Endonucleases. *PLOS Genetics*, 8(9), e1002979. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002979>
- Park, J.-Y., Singh, T. R., Nassar, N., Zhang, F., Freund, M., Hanenberg, H., Meetei, A. R., & Andreassen, P. R. (2014). Breast cancer-associated missense mutants of the PALB2 WD40 domain, which directly binds RAD51C, RAD51 and BRCA2, disrupt DNA repair. *Oncogene*, 33(40), Article 40. <https://doi.org/10.1038/onc.2013.421>
- Park, M. S., Ludwig, D. L., Stigger, E., & Lee, S.-H. (1996). Physical Interaction between Human RAD52 and RPA Is Required for Homologous Recombination in Mammalian Cells *. *Journal of Biological Chemistry*, 271(31), 18996-19000. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.31.18996>
- Passy, S. I., Yu, X., Li, Z., Radding, C. M., Masson, J.-Y., West, S. C., & Egelman, E. H. (1999). Human Dmc1 protein binds DNA as an octameric ring. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(19), 10684-10688. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.19.10684>
- Paull, T. T., & Gellert, M. (1998). The 3' to 5' Exonuclease Activity of Mre11 Facilitates Repair of DNA Double-Strand Breaks. *Molecular Cell*, 1(7), 969-979. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(00\)80097-0](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(00)80097-0)
- Pellegrini, L., Yu, D. S., Lo, T., Anand, S., Lee, M., Blundell, T. L., & Venkitaraman, A. R. (2002). Insights into DNA recombination from the structure of a RAD51-BRCA2 complex. *Nature*, 420(6913), Article 6913. <https://doi.org/10.1038/nature01230>
- Pennington, K. P., Walsh, T., Harrell, M. I., Lee, M. K., Pennil, C. C., Rendi, M. H., Thornton, A., Norquist, B. M., Casadei, S., Nord, A. S., Agnew, K. J., Pritchard, C. C., Scroggins, S., Garcia, R. L., King, M.-C., & Swisher, E. M. (2014). Germline and Somatic Mutations in Homologous Recombination Genes Predict Platinum Response and Survival in Ovarian, Fallopian Tube, and Peritoneal Carcinomas. *Clinical Cancer Research*, 20(3), 764-775. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-13-2287>

- Petermann, E., Orta, M. L., Issaeva, N., Schultz, N., & Helleday, T. (2010). Hydroxyurea-Stalled Replication Forks Become Progressively Inactivated and Require Two Different RAD51-Mediated Pathways for Restart and Repair. *Molecular Cell*, *37*(4), 492-502. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.01.021>
- Pettersen, E. F., Goddard, T. D., Huang, C. C., Meng, E. C., Couch, G. S., Croll, T. I., Morris, J. H., & Ferrin, T. E. (2021). UCSF ChimeraX : Structure visualization for researchers, educators, and developers. *Protein Science*, *30*(1), 70-82. <https://doi.org/10.1002/pro.3943>
- Petukhova, G., Komen, S. V., Vergano, S., Klein, H., & Sung, P. (1999). Yeast Rad54 Promotes Rad51-dependent Homologous DNA Pairing via ATP Hydrolysis-driven Change in DNA Double Helix Conformation *. *Journal of Biological Chemistry*, *274*(41), 29453-29462. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.41.29453>
- Petukhova, G., Stratton, S., & Sung, P. (1998). Catalysis of homologous DNA pairing by yeast Rad51 and Rad54 proteins. *Nature*, *393*(6680), Article 6680. <https://doi.org/10.1038/30037>
- Petukhova, G., Sung, P., & Klein, H. (2000). Promotion of Rad51-dependent D-loop formation by yeast recombination factor Rdh54/Tid1. *Genes & Development*, *14*(17), 2206-2215. <https://doi.org/10.1101/gad.826100>
- Pfander, B., Moldovan, G.-L., Sacher, M., Hoegge, C., & Jentsch, S. (2005). SUMO-modified PCNA recruits Srs2 to prevent recombination during S phase. *Nature*, *436*(7049), Article 7049. <https://doi.org/10.1038/nature03665>
- Piazza, A., Shah, S. S., Wright, W. D., Gore, S. K., Koszul, R., & Heyer, W.-D. (2019). Dynamic Processing of Displacement Loops during Recombinational DNA Repair. *Molecular Cell*, *73*(6), 1255-1266.e4. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2019.01.005>
- Pittman, D. L., Cobb, J., Schimenti, K. J., Wilson, L. A., Cooper, D. M., Brignull, E., Handel, M. A., & Schimenti, J. C. (1998). Meiotic Prophase Arrest with Failure of Chromosome Synapsis in Mice Deficient for Dmc1, a Germline-Specific RecA Homolog. *Molecular Cell*, *1*(5), 697-705. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(00\)80069-6](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(00)80069-6)
- Pittman, D. L., Weinberg, L. R., & Schimenti, J. C. (1998). Identification, Characterization, and Genetic Mapping of Rad51d, a New Mouse and Human RAD51/RecA-Related Gene. *Genomics*, *49*(1), 103-111. <https://doi.org/10.1006/geno.1998.5226>
- Plank, J. L., Wu, J., & Hsieh, T. (2006). Topoisomerase III α and Bloom's helicase can resolve a mobile double Holliday junction substrate through convergent branch migration. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *103*(30), 11118-11123. <https://doi.org/10.1073/pnas.0604873103>
- Plate, I., Albertsen, L., Lisby, M., Hallwyl, S. C. L., Feng, Q., Seong, C., Rothstein, R., Sung, P., & Mortensen, U. H. (2008). Rad52 multimerization is important for its nuclear localization in *Saccharomyces cerevisiae*. *DNA Repair*, *7*(1), 57-66. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2007.07.016>
- Plate, I., Hallwyl, S. C. L., Shi, I., Krejci, L., Müller, C., Albertsen, L., Sung, P., & Mortensen, U. H. (2008). Interaction with RPA Is Necessary for Rad52 Repair Center Formation and for Its Mediator Activity. *The Journal of Biological Chemistry*, *283*(43), 29077-29085. <https://doi.org/10.1074/jbc.M804881200>
- Porter, S. E., White, M. A., & Petes, T. D. (1993). Genetic evidence that the meiotic recombination hotspot at the HIS4 locus of *Saccharomyces cerevisiae* does not represent a site for a symmetrically processed double-strand break. *Genetics*, *134*(1), 5-19. <https://doi.org/10.1093/genetics/134.1.5>
- Prakash, R., Krejci, L., Komen, S. V., Schürer, K. A., Kramer, W., & Sung, P. (2005). *Saccharomyces cerevisiae* MPH1 Gene, Required for Homologous Recombination-mediated Mutation Avoidance, Encodes a 3' to 5' DNA Helicase *. *Journal of Biological Chemistry*, *280*(9), 7854-7860. <https://doi.org/10.1074/jbc.M413898200>
- Prakash, R., Rawal, Y., Sullivan, M. R., Grundy, M. K., Bret, H., Mihalevic, M. J., Rein, H. L., Baird, J. M., Darrah, K., Zhang, F., Wang, R., Traina, T. A., Radke, M. R., Kaufmann, S. H., Swisher, E. M., Guérois, R., Modesti, M., Sung, P., Jasin, M., & Bernstein, K. A. (2022). Homologous

- recombination-deficient mutation cluster in tumor suppressor RAD51C identified by comprehensive analysis of cancer variants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *119*(38), e2202727119. <https://doi.org/10.1073/pnas.2202727119>
- Prakash, R., Sandoval, T., Morati, F., Zagelbaum, J. A., Lim, P.-X., White, T., Taylor, B., Wang, R., Desclos, E. C. B., Sullivan, M. R., Rein, H. L., Bernstein, K. A., Krawczyk, P. M., Gautier, J., Modesti, M., Vanoli, F., & Jasin, M. (2021). Distinct pathways of homologous recombination controlled by the SWS1–SWSAP1–SPIDR complex. *Nature Communications*, *12*(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-24205-6>
- Prakash, R., Satory, D., Dray, E., Papusha, A., Scheller, J., Kramer, W., Krejci, L., Klein, H., Haber, J. E., Sung, P., & Ira, G. (2009). Yeast Mph1 helicase dissociates Rad51-made D-loops : Implications for crossover control in mitotic recombination. *Genes & Development*, *23*(1), 67-79. <https://doi.org/10.1101/gad.1737809>
- Prakash, R., Zhang, Y., Feng, W., & Jasin, M. (2015). Homologous Recombination and Human Health : The Roles of BRCA1, BRCA2, and Associated Proteins. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *7*(4), a016600. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a016600>
- Prasad, T. K., Robertson, R. B., Visnapuu, M.-L., Chi, P., Sung, P., & Greene, E. C. (2007). A DNA-translocating Snf2 Molecular Motor : *Saccharomyces cerevisiae* Rdh54 Displays Processive Translocation and Extrudes DNA Loops. *Journal of Molecular Biology*, *369*(4), 940-953. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2007.04.005>
- Prasad, T. K., Yeykal, C. C., & Greene, E. C. (2006). Visualizing the assembly of human Rad51 filaments on double-stranded DNA. *Journal of Molecular Biology*, *363*(3), 713-728. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2006.08.046>
- Qi, Z., Redding, S., Lee, J. Y., Gibb, B., Kwon, Y., Niu, H., Gaines, W. A., Sung, P., & Greene, E. C. (2015). DNA sequence alignment by microhomology sampling during homologous recombination. *Cell*, *160*(5), 856-869. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.01.029>
- Qiu, Y., Antony, E., Doganay, S., Ran Koh, H., Lohman, T. M., & Myong, S. (2013). Srs2 prevents Rad51 filament formation by repetitive motion on DNA. *Nature Communications*, *4*(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/ncomms3281>
- Quah, S.-K., von Borstel, R. C., & Hastings, P. J. (1980). THE ORIGIN OF SPONTANEOUS MUTATION IN *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*. *Genetics*, *96*(4), 819-839. <https://doi.org/10.1093/genetics/96.4.819>
- Quinet, A., Lemaçon, D., & Vindigni, A. (2017). Replication Fork Reversal : Players and Guardians. *Molecular Cell*, *68*(5), 830-833. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.11.022>
- Rabitsch, K. P., Tóth, A., Gálová, M., Schleiffer, A., Schaffner, G., Aigner, E., Rupp, C., Penkner, A. M., Moreno-Borchart, A. C., Primig, M., Esposito, R. E., Klein, F., Knop, M., & Nasmyth, K. (2001). A screen for genes required for meiosis and spore formation based on whole-genome expression. *Current Biology*, *11*(13), 1001-1009. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(01\)00274-3](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(01)00274-3)
- Ranatunga, W., Jackson, D., Lloyd, J. A., Forget, A. L., Knight, K. L., & Borgstahl, G. E. O. (2001). Human RAD52 Exhibits Two Modes of Self-association *. *Journal of Biological Chemistry*, *276*(19), 15876-15880. <https://doi.org/10.1074/jbc.M011747200>
- Raschle, M., Van Komen, S., Chi, P., Ellenberger, T., & Sung, P. (2004). Multiple Interactions with the Rad51 Recombinase Govern the Homologous Recombination Function of Rad54*. *Journal of Biological Chemistry*, *279*(50), 51973-51980. <https://doi.org/10.1074/jbc.M410101200>
- Rass, U., Compton, S. A., Matos, J., Singleton, M. R., Ip, S. C. Y., Blanco, M. G., Griffith, J. D., & West, S. C. (2010). Mechanism of Holliday junction resolution by the human GEN1 protein. *Genes & Development*, *24*(14), 1559-1569. <https://doi.org/10.1101/gad.585310>
- Ratray, A. J., Shafer, B. K., McGill, C. B., & Strathern, J. N. (2002). The Roles of REV3 and RAD57 in Double-Strand-Break-Repair-Induced Mutagenesis of *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, *162*(3), 1063-1077. <https://doi.org/10.1093/genetics/162.3.1063>
- Rawal, Y., Jia, L., Meir, A., Zhou, S., Kaur, H., Ruben, E. A., Kwon, Y., Bernstein, K. A., Jasin, M., Taylor, A. B., Burma, S., Hromas, R., Mazin, A. V., Zhao, W., Zhou, D., Wasmuth, E. V., Greene, E. C.,

- Sung, P., & Olsen, S. K. (2023). Structural insights into BCDX2 complex function in homologous recombination. *Nature*, *619*(7970), Article 7970. <https://doi.org/10.1038/s41586-023-06219-w>
- Reddy, G., Golub, E. I., & Radding, C. M. (1997). Human Rad52 protein promotes single-strand DNA annealing followed by branch migration. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, *377*(1), 53-59. [https://doi.org/10.1016/S0027-5107\(97\)00057-2](https://doi.org/10.1016/S0027-5107(97)00057-2)
- Reginato, G., Cannavo, E., & Cejka, P. (2017). Physiological protein blocks direct the Mre11–Rad50–Xrs2 and Sae2 nuclease complex to initiate DNA end resection. *Genes & Development*, *31*(23-24), 2325-2330. <https://doi.org/10.1101/gad.308254.117>
- Reitz, D., Chan, Y.-L., & Bishop, D. K. (2021). How strand exchange protein function benefits from ATP hydrolysis. *Current Opinion in Genetics & Development*, *71*, 120-128. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2021.06.016>
- Renkawitz, J., Lademann, C. A., & Jentsch, S. (2014). Mechanisms and principles of homology search during recombination. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *15*(6), Article 6. <https://doi.org/10.1038/nrm3805>
- Resnick, M. A., Kasimos, J. N., Game, J. C., Braun, R. J., & Roth, R. M. (1981). Changes in DNA During Meiosis in a Repair-Deficient Mutant (rad 52) of Yeast. *Science*, *212*(4494), 543-545. <https://doi.org/10.1126/science.7010606>
- Rijkers, T., Van Den Ouweland, J., Morolli, B., Rolink, A. G., Baarends, W. M., Van Sloun, P. P. H., Lohman, P. H. M., & Pastink, A. (1998). Targeted Inactivation of Mouse RAD52 Reduces Homologous Recombination but Not Resistance to Ionizing Radiation. *Molecular and Cellular Biology*, *18*(11), 6423-6429. <https://doi.org/10.1128/MCB.18.11.6423>
- Ristic, D., Wyman, C., Paulusma, C., & Kanaar, R. (2001). The architecture of the human Rad54–DNA complex provides evidence for protein translocation along DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *98*(15), 8454-8460. <https://doi.org/10.1073/pnas.151056798>
- Robert, T., Dervins, D., Fabre, F., & Gangloff, S. (2006). Mrc1 and Srs2 are major actors in the regulation of spontaneous crossover. *The EMBO Journal*, *25*(12), 2837-2846. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601158>
- Robertson, R. B., Moses, D. N., Kwon, Y., Chan, P., Zhao, W., Chi, P., Klein, H., Sung, P., & Greene, E. C. (2009). Visualizing the Disassembly of *S. cerevisiae* Rad51 Nucleoprotein Filaments. *Journal of Molecular Biology*, *388*(4), 703-720. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2009.03.049>
- Rong, L., & Klein, H. L. (1993). Purification and characterization of the SRS2 DNA helicase of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*, *268*(2), 1252-1259. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)54067-9](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)54067-9)
- Rosenbaum, J. C., Bonilla, B., Hengel, S. R., Mertz, T. M., Herken, B. W., Kazemier, H. G., Pressimone, C. A., Ratterman, T. C., MacNary, E., De Magis, A., Kwon, Y., Godin, S. K., Van Houten, B., Normolle, D. P., Sung, P., Das, S. R., Paeschke, K., Roberts, S. A., VanDemark, A. P., & Bernstein, K. A. (2019). The Rad51 paralogs facilitate a novel DNA strand specific damage tolerance pathway. *Nature Communications*, *10*(1), 3515. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-11374-8>
- Rotheneder, M., Stakyte, K., van de Logt, E., Bartho, J. D., Lammens, K., Fan, Y., Alt, A., Kessler, B., Jung, C., Roos, W. P., Steigenberger, B., & Hopfner, K.-P. (2023). Cryo-EM structure of the Mre11–Rad50–Nbs1 complex reveals the molecular mechanism of scaffolding functions. *Molecular Cell*, *83*(2), 167-185.e9. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2022.12.003>
- Roumelioti, F.-M., Sotiriou, S. K., Katsini, V., Chiourea, M., Halazonetis, T. D., & Gagos, S. (2016). Alternative lengthening of human telomeres is a conservative DNA replication process with features of break-induced replication. *EMBO reports*, *17*(12), 1731-1737. <https://doi.org/10.15252/embr.201643169>
- Roy, U., Kwon, Y., Marie, L., Symington, L., Sung, P., Lisby, M., & Greene, E. C. (2021). The Rad51 paralog complex Rad55–Rad57 acts as a molecular chaperone during homologous recombination. *Molecular Cell*, *81*(5), 1043-1057.e8. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2020.12.019>

- Rudin, N., Sugarman, E., & Haber, J. E. (1989). Genetic and physical analysis of double-strand break repair and recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, *122*(3), 519-534. <https://doi.org/10.1093/genetics/122.3.519>
- Sacher, M., Pfander, B., Hoegge, C., & Jentsch, S. (2006). Control of Rad52 recombination activity by double-strand break-induced SUMO modification. *Nature Cell Biology*, *8*(11), Article 11. <https://doi.org/10.1038/ncb1488>
- Saini, N., Ramakrishnan, S., Elango, R., Ayyar, S., Zhang, Y., Deem, A., Ira, G., Haber, J. E., Lobachev, K. S., & Malkova, A. (2013). Migrating bubble during break-induced replication drives conservative DNA synthesis. *Nature*, *502*(7471), Article 7471. <https://doi.org/10.1038/nature12584>
- Sakofsky, C. J., Ayyar, S., Deem, A. K., Chung, W.-H., Ira, G., & Malkova, A. (2015). Translesion Polymerases Drive Microhomology-Mediated Break-Induced Replication Leading to Complex Chromosomal Rearrangements. *Molecular Cell*, *60*(6), 860-872. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.10.041>
- Sakofsky, C. J., Roberts, S. A., Malc, E., Mieczkowski, P. A., Resnick, M. A., Gordenin, D. A., & Malkova, A. (2014). Break-Induced Replication Is a Source of Mutation Clusters Underlying Kataegis. *Cell Reports*, *7*(5), 1640-1648. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.04.053>
- Sale, J. E. (2013). Translesion DNA synthesis and mutagenesis in eukaryotes. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *5*(3), a012708. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a012708>
- San Filippo, J., Sung, P., & Klein, H. (2008). Mechanism of Eukaryotic Homologous Recombination. *Annual Review of Biochemistry*, *77*(1), 229-257. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.77.061306.125255>
- Sánchez, H., Paul, M. W., Grosbart, M., van Rossum-Fikkert, S. E., Lebbink, J. H. G., Kanaar, R., Houtsmuller, A. B., & Wyman, C. (2017). Architectural plasticity of human BRCA2–RAD51 complexes in DNA break repair. *Nucleic Acids Research*, *45*(8), 4507-4518. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx084>
- Saotome, M., Saito, K., Yasuda, T., Ohtomo, H., Sugiyama, S., Nishimura, Y., Kurumizaka, H., & Kagawa, W. (2018). Structural Basis of Homology-Directed DNA Repair Mediated by RAD52. *iScience*, *3*, 50-62. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2018.04.005>
- Saponaro, M., Callahan, D., Zheng, X., Krejci, L., Haber, J. E., Klein, H. L., & Liberi, G. (2010). Cdk1 Targets Srs2 to Complete Synthesis-Dependent Strand Annealing and to Promote Recombinational Repair. *PLOS Genetics*, *6*(2), e1000858. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000858>
- Sasanuma, H., Tawaramoto, M. S., Lao, J. P., Hosaka, H., Sanda, E., Suzuki, M., Yamashita, E., Hunter, N., Shinohara, M., Nakagawa, A., & Shinohara, A. (2013). A new protein complex promoting the assembly of Rad51 filaments. *Nature Communications*, *4*, 1676. <https://doi.org/10.1038/ncomms2678>
- Schay, G., Borka, B., Keryna, L., Bulyáki, É., Kardos, J., Fekete, M., & Fidy, J. (2016). Without Binding ATP, Human Rad51 Does Not Form Helical Filaments on ssDNA. *The Journal of Physical Chemistry B*, *120*(9), 2165-2178. <https://doi.org/10.1021/acs.jpbc.5b12220>
- Scheller, J., Schürer, A., Rudolph, C., Hettwer, S., & Kramer, W. (2000). MPH1, A Yeast Gene Encoding a DEAH Protein, Plays a Role in Protection of the Genome From Spontaneous and Chemically Induced Damage. *Genetics*, *155*(3), 1069-1081. <https://doi.org/10.1093/genetics/155.3.1069>
- Schiestl, R. H., Prakash, S., & Prakash, L. (1990). The SRS2 suppressor of rad6 mutations of *Saccharomyces cerevisiae* acts by channeling DNA lesions into the RAD52 DNA repair pathway. *Genetics*, *124*(4), 817-831. <https://doi.org/10.1093/genetics/124.4.817>
- Schild, D., Lio, Y. C., Collins, D. W., Tsomondo, T., & Chen, D. J. (2000). Evidence for simultaneous protein interactions between human Rad51 paralogs. *The Journal of Biological Chemistry*, *275*(22), 16443-16449. <https://doi.org/10.1074/jbc.M001473200>
- Schlacher, K., Christ, N., Siaud, N., Egashira, A., Wu, H., & Jasin, M. (2011). Double-Strand Break Repair-Independent Role for BRCA2 in Blocking Stalled Replication Fork Degradation by MRE11. *Cell*, *145*(4), 529-542. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.03.041>

- Schmuckli-Maurer, J., Rolfsmeier, M., Nguyen, H., & Heyer, W. (2003). Genome instability in rad54 mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Research*, *31*(3), 1013-1023. <https://doi.org/10.1093/nar/gkg190>
- Schubert, L., Ho, T., Hoffmann, S., Haahr, P., Guérillon, C., & Mailand, N. (2017). RADX interacts with single-stranded DNA to promote replication fork stability. *EMBO reports*, *18*(11), 1991-2003. <https://doi.org/10.15252/embr.201744877>
- Schürer, K. A., Rudolph, C., Ulrich, H. D., & Kramer, W. (2004). Yeast MPH1 Gene Functions in an Error-Free DNA Damage Bypass Pathway That Requires Genes From Homologous Recombination, but Not From Postreplicative Repair. *Genetics*, *166*(4), 1673-1686. <https://doi.org/10.1093/genetics/166.4.1673>
- Schwacha, A., & Kleckner, N. (1994). Identification of joint molecules that form frequently between homologs but rarely between sister chromatids during yeast meiosis. *Cell*, *76*(1), 51-63. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(94\)90172-4](https://doi.org/10.1016/0092-8674(94)90172-4)
- Schwacha, A., & Kleckner, N. (1995). Identification of double holliday junctions as intermediates in meiotic recombination. *Cell*, *83*(5), 783-791. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(95\)90191-4](https://doi.org/10.1016/0092-8674(95)90191-4)
- Schwacha, A., & Kleckner, N. (1997). Interhomolog Bias during Meiotic Recombination : Meiotic Functions Promote a Highly Differentiated Interhomolog-Only Pathway. *Cell*, *90*(6), 1123-1135. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80378-5](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80378-5)
- Scott, D. E., Francis-Newton, N. J., Marsh, M. E., Coyne, A. G., Fischer, G., Moschetti, T., Bayly, A. R., Sharpe, T. D., Haas, K. T., Barber, L., Valenzano, C. R., Srinivasan, R., Huggins, D. J., Lee, M., Emery, A., Hardwick, B., Ehebauer, M., Dagostin, C., Esposito, A., ... Abell, C. (2021). A small-molecule inhibitor of the BRCA2-RAD51 interaction modulates RAD51 assembly and potentiates DNA damage-induced cell death. *Cell Chemical Biology*, *28*(6), 835-847.e5. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2021.02.006>
- Scott, D. E., Marsh, M., Blundell, T. L., Abell, C., & Hyvönen, M. (2016). Structure-activity relationship of the peptide binding-motif mediating the BRCA2:RAD51 protein-protein interaction. *FEBS Letters*, *590*(8), 1094-1102. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.12139>
- Sehorn, M. G., Sigurdsson, S., Bussen, W., Unger, V. M., & Sung, P. (2004). Human meiotic recombinase Dmc1 promotes ATP-dependent homologous DNA strand exchange. *Nature*, *429*(6990), Article 6990. <https://doi.org/10.1038/nature02563>
- Seong, C., Colavito, S., Kwon, Y., Sung, P., & Krejci, L. (2009). Regulation of Rad51 Recombinase Presynaptic Filament Assembly via Interactions with the Rad52 Mediator and the Srs2 Anti-recombinase. *The Journal of Biological Chemistry*, *284*(36), 24363-24371. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.032953>
- Seong, C., Sehorn, M. G., Plate, I., Shi, I., Song, B., Chi, P., Mortensen, U., Sung, P., & Krejci, L. (2008). Molecular Anatomy of the Recombination Mediator Function of *Saccharomyces cerevisiae* Rad52 *. *Journal of Biological Chemistry*, *283*(18), 12166-12174. <https://doi.org/10.1074/jbc.M800763200>
- Serra, H., Ines, O. D., Degroote, F., Gallego, M. E., & White, C. I. (2013). Roles of XRCC2, RAD51B and RAD51D in RAD51-Independent SSA Recombination. *PLOS Genetics*, *9*(11), e1003971. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003971>
- Shah, P. P., Zheng, X., Epshtein, A., Carey, J. N., Bishop, D. K., & Klein, H. L. (2010). Swi2/Snf2-Related Translocases Prevent Accumulation of Toxic Rad51 Complexes during Mitotic Growth. *Molecular Cell*, *39*(6), 862-872. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.08.028>
- Shamseldin, H. E., Elfaki, M., & Alkuraya, F. S. (2012). Exome sequencing reveals a novel Fanconi group defined by XRCC2 mutation. *Journal of Medical Genetics*, *49*(3), 184-186. <https://doi.org/10.1136/jmedgenet-2011-100585>
- She, Z., Gao, Z.-Q., Liu, Y., Wang, W.-J., Liu, G.-F., Shtykova, E. V., Xu, J.-H., & Dong, Y.-H. (2012). Structural and SAXS analysis of the budding yeast SHU-complex proteins. *FEBS Letters*, *586*(16), 2306-2312. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2012.06.024>

- Shen, Z., Cloud, K. G., Chen, D. J., & Park, M. S. (1996). Specific Interactions between the Human RAD51 and RAD52 Proteins (*). *Journal of Biological Chemistry*, 271(1), 148-152. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.1.148>
- Sheridan, S. D., Yu, X., Roth, R., Heuser, J. E., Sehorn, M. G., Sung, P., Egelman, E. H., & Bishop, D. K. (2008). A comparative analysis of Dmc1 and Rad51 nucleoprotein filaments. *Nucleic Acids Research*, 36(12), 4057-4066. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn352>
- Shi, I., Hallwyl, S. C. L., Seong, C., Mortensen, U., Rothstein, R., & Sung, P. (2009). Role of the Rad52 Amino-terminal DNA Binding Activity in DNA Strand Capture in Homologous Recombination *. *Journal of Biological Chemistry*, 284(48), 33275-33284. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.057752>
- Shim, E. Y., Chung, W.-H., Nicolette, M. L., Zhang, Y., Davis, M., Zhu, Z., Paull, T. T., Ira, G., & Lee, S. E. (2010). Saccharomyces cerevisiae Mre11/Rad50/Xrs2 and Ku proteins regulate association of Exo1 and Dna2 with DNA breaks. *The EMBO Journal*, 29(19), 3370-3380. <https://doi.org/10.1038/emboj.2010.219>
- Shin, D. S., Pellegrini, L., Daniels, D. S., Yelent, B., Craig, L., Bates, D., Yu, D. S., Shivji, M. K., Hitomi, C., Arvai, A. S., Volkman, N., Tsuruta, H., Blundell, T. L., Venkitaraman, A. R., & Tainer, J. A. (2003). Full-length archaeal Rad51 structure and mutants : Mechanisms for RAD51 assembly and control by BRCA2. *The EMBO Journal*, 22(17), 4566-4576. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdg429>
- Shinohara, A., Gasior, S., Ogawa, T., Kleckner, N., & Bishop, D. K. (1997). Saccharomyces cerevisiae recA homologues RAD51 and DMC1 have both distinct and overlapping roles in meiotic recombination. *Genes to Cells*, 2(10), 615-629. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2443.1997.1480347.x>
- Shinohara, A., Ogawa, H., Matsuda, Y., Ushio, N., Ieko, K., & Ogawa, T. (1993). Cloning of human, mouse and fission yeast recombination genes homologous to RAD51 and recA. *Nature Genetics*, 4(3), 239-243. <https://doi.org/10.1038/ng0793-239>
- Shinohara, A., Ogawa, H., & Ogawa, T. (1992). Rad51 protein involved in repair and recombination in S. cerevisiae is a RecA-like protein. *Cell*, 69(3), 457-470. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(92\)90447-K](https://doi.org/10.1016/0092-8674(92)90447-K)
- Shinohara, A., Shinohara, M., Ohta, T., Matsuda, S., & Ogawa, T. (1998). Rad52 forms ring structures and co-operates with RPA in single-strand DNA annealing. *Genes to Cells*, 3(3), 145-156. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2443.1998.00176.x>
- Shinohara, M., Shita-Yamaguchi, E., Buerstedde, J.-M., Shinagawa, H., Ogawa, H., & Shinohara, A. (1997). Characterization of the Roles of the Saccharomyces cerevisiae RAD54 Gene and a Homologue of RAD54, RDH54/TID1, in Mitosis and Meiosis. *Genetics*, 147(4), 1545-1556. <https://doi.org/10.1093/genetics/147.4.1545>
- Shor, E., Weinstein, J., & Rothstein, R. (2005). A genetic screen for top3 suppressors in Saccharomyces cerevisiae identifies SHU1, SHU2, PSY3 and CSM2 : Four genes involved in error-free DNA repair. *Genetics*, 169(3), 1275-1289. <https://doi.org/10.1534/genetics.104.036764>
- Short, J. M., Liu, Y., Chen, S., Soni, N., Madhusudhan, M. S., Shivji, M. K. K., & Venkitaraman, A. R. (2016). High-resolution structure of the presynaptic RAD51 filament on single-stranded DNA by electron cryo-microscopy. *Nucleic Acids Research*, 44(19), 9017-9030. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw783>
- Signon, L., Malkova, A., Naylor, M. L., Klein, H., & Haber, J. E. (2001). Genetic Requirements for RAD51- and RAD54-Independent Break-Induced Replication Repair of a Chromosomal Double-Strand Break. *Molecular and Cellular Biology*, 21(6), 2048-2056. <https://doi.org/10.1128/MCB.21.6.2048-2056.2001>
- Sigurdsson, S., Komen, S. V., Bussen, W., Schild, D., Albala, J. S., & Sung, P. (2001). Mediator function of the human Rad51B–Rad51C complex in Rad51/RPA-catalyzed DNA strand exchange. *Genes & Development*, 15(24), 3308-3318. <https://doi.org/10.1101/gad.935501>
- Silva, S. N., Tomar, M., Paulo, C., Gomes, B. C., Azevedo, A. P., Teixeira, V., Pina, J. E., Rueff, J., & Gaspar, J. F. (2010). Breast cancer risk and common single nucleotide polymorphisms in

- homologous recombination DNA repair pathway genes XRCC2, XRCC3, NBS1 and RAD51. *Cancer Epidemiology*, 34(1), 85-92. <https://doi.org/10.1016/j.canep.2009.11.002>
- Simandlova, J., Zagelbaum, J., Payne, M. J., Chu, W. K., Shevelev, I., Hanada, K., Chatterjee, S., Reid, D. A., Liu, Y., Janscak, P., Rothenberg, E., & Hickson, I. D. (2013). FBH1 Helicase Disrupts RAD51 Filaments in Vitro and Modulates Homologous Recombination in Mammalian Cells *. *Journal of Biological Chemistry*, 288(47), 34168-34180. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.484493>
- Simon, M., Giot, L., & Faye, G. (1991). The 3' to 5' exonuclease activity located in the DNA polymerase delta subunit of *Saccharomyces cerevisiae* is required for accurate replication. *The EMBO Journal*, 10(8), 2165-2170. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1991.tb07751.x>
- Singh, G., Ines, O. D., Gallego, M. E., & White, C. I. (2017). Analysis of the impact of the absence of RAD51 strand exchange activity in *Arabidopsis* meiosis. *PLOS ONE*, 12(8), e0183006. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0183006>
- Smith, C. E., Lam, A. F., & Symington, L. S. (2009). Aberrant Double-Strand Break Repair Resulting in Half Crossovers in Mutants Defective for Rad51 or the DNA Polymerase δ Complex. *Molecular and Cellular Biology*, 29(6), 1432-1441. <https://doi.org/10.1128/MCB.01469-08>
- Smith, C. E., Llorente, B., & Symington, L. S. (2007). Template switching during break-induced replication. *Nature*, 447(7140), Article 7140. <https://doi.org/10.1038/nature05723>
- Smith, J., & Rothstein, R. (1999). An Allele of RFA1 Suppresses RAD52-Dependent Double-Strand Break Repair in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 151(2), 447-458. <https://doi.org/10.1093/genetics/151.2.447>
- Sneeden, J. L., Grossi, S. M., Tappin, I., Hurwitz, J., & Heyer, W.-D. (2013). Reconstitution of recombination-associated DNA synthesis with human proteins. *Nucleic Acids Research*, 41(9), 4913-4925. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt192>
- So, A., Le Guen, T., Lopez, B. S., & Guirouilh-Barbat, J. (2017). Genomic rearrangements induced by unscheduled DNA double strand breaks in somatic mammalian cells. *The FEBS Journal*, 284(15), 2324-2344. <https://doi.org/10.1111/febs.14053>
- Solinger, J. A., & Heyer, W.-D. (2001). Rad54 protein stimulates the postsynaptic phase of Rad51 protein-mediated DNA strand exchange. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(15), 8447-8453. <https://doi.org/10.1073/pnas.121009898>
- Solinger, J. A., Kiiianitsa, K., & Heyer, W.-D. (2002). Rad54, a Swi2/Snf2-like Recombinational Repair Protein, Disassembles Rad51:dsDNA Filaments. *Molecular Cell*, 10(5), 1175-1188. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(02\)00743-8](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(02)00743-8)
- Solinger, J. A., Lutz, G., Sugiyama, T., Kowalczykowski, S. C., & Heyer, W.-D. (2001). Rad54 protein stimulates heteroduplex DNA formation in the synaptic phase of DNA strand exchange via specific interactions with the presynaptic Rad51 nucleoprotein filament¹¹Edited by M. Belfort. *Journal of Molecular Biology*, 307(5), 1207-1221. <https://doi.org/10.1006/jmbi.2001.4555>
- Sommers, J. A., Rawtani, N., Gupta, R., Bugreev, D. V., Mazin, A. V., Cantor, S. B., & Brosh, R. M. (2009). FANCD1 Uses Its Motor ATPase to Destabilize Protein-DNA Complexes, Unwind Triplexes, and Inhibit RAD51 Strand Exchange *. *Journal of Biological Chemistry*, 284(12), 7505-7517. <https://doi.org/10.1074/jbc.M809019200>
- 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 Research*, 43(20), 9835-9855. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv880>
- Song, B., & Sung, P. (2000). Functional Interactions among Yeast Rad51 Recombinase, Rad52 Mediator, and Replication Protein A in DNA Strand Exchange *. *Journal of Biological Chemistry*, 275(21), 15895-15904. <https://doi.org/10.1074/jbc.M910244199>
- Song, H., Dicks, E., Ramus, S. J., Tyrer, J. P., Intermaggio, M. P., Hayward, J., Edlund, C. K., Conti, D., Harrington, P., Fraser, L., Philpott, S., Anderson, C., Rosenthal, A., Gentry-Maharaj, A., Bowtell, D. D., Alsop, K., Cicek, M. S., Cunningham, J. M., Fridley, B. L., ... Pharoah, P. D. P. (2015). Contribution of Germline Mutations in the RAD51B, RAD51C, and RAD51D Genes to Ovarian

- Cancer in the Population. *Journal of Clinical Oncology*, 33(26), 2901-2907.
<https://doi.org/10.1200/JCO.2015.61.2408>
- Sonoda, E., Sasaki, M. S., Buerstedde, J.-M., Bezzubova, O., Shinohara, A., Ogawa, H., Takata, M., Yamaguchi-Iwai, Y., & Takeda, S. (1998). Rad51-deficient vertebrate cells accumulate chromosomal breaks prior to cell death. *The EMBO Journal*, 17(2), 598-608.
<https://doi.org/10.1093/emboj/17.2.598>
- Soreanu, I., Hendler, A., Dahan, D., Dovrat, D., & Aharoni, A. (2018). Marker-free genetic manipulations in yeast using CRISPR/CAS9 system. *Current Genetics*, 64(5), 1129-1139.
<https://doi.org/10.1007/s00294-018-0831-y>
- Soustelle, C., Vedel, M., Kolodner, R., & Nicolas, A. (2002). Replication Protein A Is Required for Meiotic Recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 161(2), 535-547.
<https://doi.org/10.1093/genetics/161.2.535>
- Spier, I., Kerick, M., Drichel, D., Horpaopan, S., Altmüller, J., Laner, A., Holzäpfel, S., Peters, S., Adam, R., Zhao, B., Becker, T., Lifton, R. P., Holinski-Feder, E., Perner, S., Thiele, H., Nöthen, M. M., Hoffmann, P., Timmermann, B., Schweiger, M. R., & Aretz, S. (2016). Exome sequencing identifies potential novel candidate genes in patients with unexplained colorectal adenomatous polyposis. *Familial Cancer*, 15(2), 281-288. <https://doi.org/10.1007/s10689-016-9870-z>
- Spies, J., Waizenegger, A., Barton, O., Sürder, M., Wright, W. D., Heyer, W.-D., & Löbrich, M. (2016). Nek1 Regulates Rad54 to Orchestrate Homologous Recombination and Replication Fork Stability. *Molecular Cell*, 62(6), 903-917. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.04.032>
- Špírek, M., Mlčoušková, J., Beláň, O., Gyimesi, M., Harami, G. M., Molnár, E., Novacek, J., Kovács, M., & Krejci, L. (2018). Human RAD51 rapidly forms intrinsically dynamic nucleoprotein filaments modulated by nucleotide binding state. *Nucleic Acids Research*, 46(8), 3967-3980.
<https://doi.org/10.1093/nar/gky111>
- Stasiak, A. Z., Larquet, E., Stasiak, A., Müller, S., Engel, A., Van Dyck, E., West, S. C., & Egelman, E. H. (2000). The human Rad52 protein exists as a heptameric ring. *Current Biology*, 10(6), 337-340. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(00\)00385-7](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(00)00385-7)
- Stauffer, M. E., & Chazin, W. J. (2004). Physical Interaction between Replication Protein A and Rad51 Promotes Exchange on Single-stranded DNA *. *Journal of Biological Chemistry*, 279(24), 25638-25645. <https://doi.org/10.1074/jbc.M400029200>
- Steinegger, M., & Söding, J. (2017). MMseqs2 enables sensitive protein sequence searching for the analysis of massive data sets. *Nature Biotechnology*, 35(11), Article 11.
<https://doi.org/10.1038/nbt.3988>
- Stelter, P., & Ulrich, H. D. (2003). Control of spontaneous and damage-induced mutagenesis by SUMO and ubiquitin conjugation. *Nature*, 425(6954), Article 6954.
<https://doi.org/10.1038/nature01965>
- Story, R. M., Bishop, D. K., Kleckner, N., & Steitz, T. A. (1993). Structural Relationship of Bacterial RecA Proteins to Recombination Proteins from Bacteriophage T4 and Yeast. *Science*, 259(5103), 1892-1896. <https://doi.org/10.1126/science.8456313>
- Stover, E. H., Konstantinopoulos, P. A., Matulonis, U. A., & Swisher, E. M. (2016). Biomarkers of Response and Resistance to DNA Repair Targeted Therapies. *Clinical Cancer Research*, 22(23), 5651-5660. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-16-0247>
- Strahl-Bolsinger, S., Hecht, A., Luo, K., & Grunstein, M. (1997). SIR2 and SIR4 interactions differ in core and extended telomeric heterochromatin in yeast. *Genes & Development*, 11(1), 83-93.
<https://doi.org/10.1101/gad.11.1.83>
- Strathern, J. N., Klar, A. J. S., Hicks, J. B., Abraham, J. A., Ivy, J. M., Nasmyth, K. A., & McGill, C. (1982). Homothallic switching of yeast mating type cassettes is initiated by a double-stranded cut in the MAT locus. *Cell*, 31(1), 183-192. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(82\)90418-4](https://doi.org/10.1016/0092-8674(82)90418-4)
- Su, G.-C., Chung, C.-I., Liao, C.-Y., Lin, S.-W., Tsai, C.-T., Huang, T., Li, H.-W., & Chi, P. (2014). Enhancement of ADP release from the RAD51 presynaptic filament by the SWI5-SFR1 complex. *Nucleic Acids Research*, 42(1), 349-358. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt879>

- Sugawara, N., Ira, G., & Haber, J. E. (2000). DNA Length Dependence of the Single-Strand Annealing Pathway and the Role of *Saccharomyces cerevisiae* RAD59 in Double-Strand Break Repair. *Molecular and Cellular Biology*, 20(14), 5300-5309. <https://doi.org/10.1128/MCB.20.14.5300-5309.2000>
- Sugawara, N., Pâques, F., Colaiácovo, M., & Haber, J. E. (1997). Role of *Saccharomyces cerevisiae* Msh2 and Msh3 repair proteins in double-strand break-induced recombination. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94(17), 9214-9219. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.17.9214>
- Sugawara, N., Wang, X., & Haber, J. E. (2003). In Vivo Roles of Rad52, Rad54, and Rad55 Proteins in Rad51-Mediated Recombination. *Molecular Cell*, 12(1), 209-219. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(03\)00269-7](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(03)00269-7)
- Sugiyama, T., & Kantake, N. (2009). Dynamic Regulatory Interactions of Rad51, Rad52, and Replication Protein-A in Recombination Intermediates. *Journal of Molecular Biology*, 390(1), 45-55. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2009.05.009>
- Sugiyama, T., Kantake, N., Wu, Y., & Kowalczykowski, S. C. (2006). Rad52-mediated DNA annealing after Rad51-mediated DNA strand exchange promotes second ssDNA capture. *The EMBO Journal*, 25(23), 5539-5548. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601412>
- Sugiyama, T., & Kowalczykowski, S. C. (2002). Rad52 Protein Associates with Replication Protein A (RPA)-Single-stranded DNA to Accelerate Rad51-mediated Displacement of RPA and Presynaptic Complex Formation. *Journal of Biological Chemistry*, 277(35), 31663-31672. <https://doi.org/10.1074/jbc.M203494200>
- Sugiyama, T., New, J. H., & Kowalczykowski, S. C. (1998). DNA annealing by Rad52 Protein is stimulated by specific interaction with the complex of replication protein A and single-stranded DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(11), 6049-6054. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.11.6049>
- Sugiyama, T., Zaitseva, E. M., & Kowalczykowski, S. C. (1997). A Single-stranded DNA-binding Protein Is Needed for Efficient Presynaptic Complex Formation by the *Saccharomyces cerevisiae* Rad51 Protein *. *Journal of Biological Chemistry*, 272(12), 7940-7945. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.12.7940>
- Sullivan, M. R., & Bernstein, K. A. (2018). RAD-ical New Insights into RAD51 Regulation. *Genes*, 9(12), Article 12. <https://doi.org/10.3390/genes9120629>
- Sun, H., Treco, D., & Szostak, J. W. (1991). Extensive 3'-overhanging, single-stranded DNA associated with the meiosis-specific double-strand breaks at the ARG4 recombination initiation site. *Cell*, 64(6), 1155-1161. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(91\)90270-9](https://doi.org/10.1016/0092-8674(91)90270-9)
- Sung, P. (1994). Catalysis of ATP-Dependent Homologous DNA Pairing and Strand Exchange by Yeast RAD51 Protein. *Science*, 265(5176), 1241-1243. <https://doi.org/10.1126/science.8066464>
- Sung, P. (1997a). Function of yeast Rad52 protein as a mediator between replication protein A and the Rad51 recombinase. *The Journal of Biological Chemistry*, 272(45), 28194-28197. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.45.28194>
- Sung, P. (1997b). Yeast Rad55 and Rad57 proteins form a heterodimer that functions with replication protein A to promote DNA strand exchange by Rad51 recombinase. *Genes & Development*, 11(9), 1111-1121.
- Sung, P., & Roberson, D. L. (1995). DNA strand exchange mediated by a RAD51-ssDNA nucleoprotein filament with polarity opposite to that of RecA. *Cell*, 82(3), 453-461. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(95\)90434-4](https://doi.org/10.1016/0092-8674(95)90434-4)
- Sung, P., & Stratton, S. A. (1996). Yeast Rad51 Recombinase Mediates Polar DNA Strand Exchange in the Absence of ATP Hydrolysis *. *Journal of Biological Chemistry*, 271(45), 27983-27986. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.45.27983>
- Surtees, J. A., & Alani, E. (2006). Mismatch Repair Factor MSH2-MSH3 Binds and Alters the Conformation of Branched DNA Structures Predicted to form During Genetic Recombination. *Journal of Molecular Biology*, 360(3), 523-536. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2006.05.032>

- Swagemakers, S. M. A., Essers, J., Wit, J. de, Hoeijmakers, J. H. J., & Kanaar, R. (1998). The Human Rad54 Recombinational DNA Repair Protein Is a Double-stranded DNA-dependent ATPase *. *Journal of Biological Chemistry*, 273(43), 28292-28297. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.43.28292>
- Symington, L. S. (2002). Role of RAD52 epistasis group genes in homologous recombination and double-strand break repair. *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR*, 66(4), 630-670, table of contents.
- Symington, L. S., Rothstein, R., & Lisby, M. (2014). Mechanisms and Regulation of Mitotic Recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 198(3), 795-835. <https://doi.org/10.1534/genetics.114.166140>
- Szankasi, P., & Smith, G. R. (1992). A DNA exonuclease induced during meiosis of *Schizosaccharomyces pombe*. *Journal of Biological Chemistry*, 267(5), 3014-3023. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)50688-3](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)50688-3)
- Szostak, J. W., Orr-Weaver, T. L., Rothstein, R. J., & Stahl, F. W. (1983). The double-strand-break repair model for recombination. *Cell*, 33(1), 25-35. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(83\)90331-8](https://doi.org/10.1016/0092-8674(83)90331-8)
- Takata, M., Sasaki, M. S., Tachiiri, S., Fukushima, T., Sonoda, E., Schild, D., Thompson, L. H., & Takeda, S. (2001). Chromosome Instability and Defective Recombinational Repair in Knockout Mutants of the Five Rad51 Paralogs. *Molecular and Cellular Biology*, 21(8), 2858-2866. <https://doi.org/10.1128/MCB.21.8.2858-2866.2001>
- Tambini, C. E., George, A. M., Rommens, J. M., Tsui, L.-C., Scherer, S. W., & Thacker, J. (1997). TheXRCC2DNA Repair Gene : Identification of a Positional Candidate. *Genomics*, 41(1), 84-92. <https://doi.org/10.1006/geno.1997.4636>
- Tan, T. L. R., Essers, J., Citterio, E., Swagemakers, S. M. A., de Wit, J., Benson, F. E., Hoeijmakers, J. H. J., & Kanaar, R. (1999). Mouse Rad54 affects DNA conformation and DNA-damage-induced Rad51 foci formation. *Current Biology*, 9(6), 325-328. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(99\)80142-0](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(99)80142-0)
- Tao, Y., Li, X., Liu, Y., Ruan, J., Qi, S., Niu, L., & Teng, M. (2012). Structural Analysis of Shu Proteins Reveals a DNA Binding Role Essential for Resisting Damage. *The Journal of Biological Chemistry*, 287(24), 20231-20239. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.334698>
- Tavares, E. M., Wright, W. D., Heyer, W.-D., Le Cam, E., & Dupaigne, P. (2019). In vitro role of Rad54 in Rad51-ssDNA filament-dependent homology search and synaptic complexes formation. *Nature Communications*, 10(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-12082-z>
- Tay, Y. D., & Wu, L. (2010). Overlapping Roles for Yen1 and Mus81 in Cellular Holliday Junction Processing *. *Journal of Biological Chemistry*, 285(15), 11427-11432. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.108399>
- Taylor, M. R. G., Špírek, M., Chaurasiya, K. R., Ward, J. D., Carzaniga, R., Yu, X., Egelman, E. H., Collinson, L. M., Rueda, D., Krejci, L., & Boulton, S. J. (2015). Rad51 Paralogs Remodel Pre-synaptic Rad51 Filaments to Stimulate Homologous Recombination. *Cell*, 162(2), 271-286. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.06.015>
- Tebbs, R. S., Zhao, Y., Tucker, J. D., Scheerer, J. B., Siciliano, M. J., Hwang, M., Liu, N., Legerski, R. J., & Thompson, L. H. (1995). Correction of chromosomal instability and sensitivity to diverse mutagens by a cloned cDNA of the XRCC3 DNA repair gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(14), 6354-6358. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.14.6354>
- Tellier-Lebegue, C., Dizet, E., Ma, E., Veaute, X., Coïc, E., Charbonnier, J.-B., & Maloisel, L. (2017). The translesion DNA polymerases Pol ζ and Rev1 are activated independently of PCNA ubiquitination upon UV radiation in mutants of DNA polymerase δ. *PLoS Genetics*, 13(12). <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1007119>
- Thacker, J. (1999). A surfeit of RAD51-like genes? *Trends in Genetics: TIG*, 15(5), 166-168. [https://doi.org/10.1016/s0168-9525\(99\)01733-3](https://doi.org/10.1016/s0168-9525(99)01733-3)
- The UniProt Consortium. (2021). UniProt : The universal protein knowledgebase in 2021. *Nucleic Acids Research*, 49(D1), D480-D489. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa1100>

- Thomas, M., Dubacq, C., Rabut, E., Lopez, B. S., & Guirouilh-Barbat, J. (2023). Noncanonical Roles of RAD51. *Cells*, 12(8), 1169. <https://doi.org/10.3390/cells12081169>
- Thorslund, T., McIlwraith, M. J., Compton, S. A., Lekontsev, S., Petronczki, M., Griffith, J. D., & West, S. C. (2010). The breast cancer tumor suppressor BRCA2 promotes the specific targeting of RAD51 to single-stranded DNA. *Nature Structural & Molecular Biology*, 17(10), Article 10. <https://doi.org/10.1038/nsmb.1905>
- Tiwari, V., & Wilson, D. M. (2019). DNA Damage and Associated DNA Repair Defects in Disease and Premature Aging. *The American Journal of Human Genetics*, 105(2), 237-257. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2019.06.005>
- Tran, P. T., Erdeniz, N., Symington, L. S., & Liskay, R. M. (2004). EXO1-A multi-tasking eukaryotic nuclease. *DNA Repair*, 3(12), 1549-1559. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2004.05.015>
- Trujillo, K. M., & Sung, P. (2001). DNA Structure-specific Nuclease Activities in the *Saccharomyces cerevisiae* Rad50-Mre11 Complex *. *Journal of Biological Chemistry*, 276(38), 35458-35464. <https://doi.org/10.1074/jbc.M105482200>
- Trujillo, K. M., Yuan, S.-S. F., Lee, E. Y.-H. P., & Sung, P. (1998). Nuclease Activities in a Complex of Human Recombination and DNA Repair Factors Rad50, Mre11, and p95*. *Journal of Biological Chemistry*, 273(34), 21447-21450. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.34.21447>
- Tsai, S.-P., Su, G.-C., Lin, S.-W., Chung, C.-I., Xue, X., Dunlop, M. H., Akamatsu, Y., Jasin, M., Sung, P., & Chi, P. (2012). Rad51 presynaptic filament stabilization function of the mouse Swi5-Sfr1 heterodimeric complex. *Nucleic Acids Research*, 40(14), 6558-6569. <https://doi.org/10.1093/nar/gks305>
- Tsubouchi, H., & Roeder, G. S. (2004). The Budding Yeast Mei5 and Sae3 Proteins Act Together With Dmc1 During Meiotic Recombination. *Genetics*, 168(3), 1219-1230. <https://doi.org/10.1534/genetics.103.025700>
- Tsukamoto, Y., Mitsuoka, C., Terasawa, M., Ogawa, H., & Ogawa, T. (2005). Xrs2p Regulates Mre11p Translocation to the Nucleus and Plays a Role in Telomere Elongation and Meiotic Recombination. *Molecular Biology of the Cell*, 16(2), 597-608. <https://doi.org/10.1091/mbc.e04-09-0782>
- Tsutsui, Y., Khasanov, F. K., Shinagawa, H., Iwasaki, H., & Bashkirov, V. I. (2001). Multiple interactions among the components of the recombinational DNA repair system in *Schizosaccharomyces pombe*. *Genetics*, 159(1), 91-105. <https://doi.org/10.1093/genetics/159.1.91>
- Tsutsui, Y., Morishita, T., Iwasaki, H., Toh, H., & Shinagawa, H. (2000). A Recombination Repair Gene of *Schizosaccharomyces pombe*, rhp57, Is a Functional Homolog of the *Saccharomyces cerevisiae* RAD57 Gene and Is Phylogenetically Related to the Human XRCC3 Gene. *Genetics*, 154(4), 1451-1461. <https://doi.org/10.1093/genetics/154.4.1451>
- Tsuzuki, T., Fujii, Y., Sakumi, K., Tominaga, Y., Nakao, K., Sekiguchi, M., Matsushiro, A., Yoshimura, Y., & Morita, T. (1996). Targeted disruption of the Rad51 gene leads to lethality in embryonic mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(13), 6236-6240.
- Umezu, K., Sugawara, N., Chen, C., Haber, J. E., & Kolodner, R. D. (1998). Genetic Analysis of Yeast RPA1 Reveals Its Multiple Functions in DNA Metabolism. *Genetics*, 148(3), 989-1005. <https://doi.org/10.1093/genetics/148.3.989>
- Usui, T., Ohta, T., Oshiumi, H., Tomizawa, J., Ogawa, H., & Ogawa, T. (1998). Complex Formation and Functional Versatility of Mre11 of Budding Yeast in Recombination. *Cell*, 95(5), 705-716. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81640-2](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81640-2)
- Vaisman, A., & Woodgate, R. (2017). Translesion DNA polymerases in eukaryotes : What makes them tick? *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 52(3), 274-303. <https://doi.org/10.1080/10409238.2017.1291576>
- van den Bosch, M., Zonneveld, J. B. M., Vreeken, K., de Vries, F. A. T., Lohman, P. H. M., & Pastink, A. (2002). Differential expression and requirements for *Schizosaccharomyces pombe* RAD52 homologs in DNA repair and recombination. *Nucleic Acids Research*, 30(6), 1316-1324. <https://doi.org/10.1093/nar/30.6.1316>

- van der Heijden, T., Seidel, R., Modesti, M., Kanaar, R., Wyman, C., & Dekker, C. (2007). Real-time assembly and disassembly of human RAD51 filaments on individual DNA molecules. *Nucleic Acids Research*, *35*(17), 5646-5657. <https://doi.org/10.1093/nar/gkm629>
- Van Komen, S., Petukhova, G., Sigurdsson, S., Stratton, S., & Sung, P. (2000). Superhelicity-Driven Homologous DNA Pairing by Yeast Recombination Factors Rad51 and Rad54. *Molecular Cell*, *6*(3), 563-572. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(00\)00055-1](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(00)00055-1)
- van Mameren, J., Modesti, M., Kanaar, R., Wyman, C., Peterman, E. J. G., & Wuite, G. J. L. (2009). Counting RAD51 proteins disassembling from nucleoprotein filaments under tension. *Nature*, *457*(7230), Article 7230. <https://doi.org/10.1038/nature07581>
- Vanoli, F., Fumasoni, M., Szakal, B., Maloisel, L., & Branzei, D. (2010). Replication and Recombination Factors Contributing to Recombination-Dependent Bypass of DNA Lesions by Template Switch. *PLoS Genetics*, *6*(11), e1001205. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1001205>
- Vasan, S., Deem, A., Ramakrishnan, S., Argueso, J. L., & Malkova, A. (2014). Cascades of Genetic Instability Resulting from Compromised Break-Induced Replication. *PLoS Genetics*, *10*(2), e1004119. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004119>
- Vasianovich, Y., Altmannova, V., Kotenko, O., Newton, M. D., Krejci, L., & Makovets, S. (2017). Unloading of homologous recombination factors is required for restoring double-stranded DNA at damage repair loci. *The EMBO Journal*, *36*(2), 213-231. <https://doi.org/10.15252/embj.201694628>
- Vaz, F., Hanenberg, H., Schuster, B., Barker, K., Wiek, C., Erven, V., Neveling, K., Endt, D., Kesterton, I., Autore, F., Fraternali, F., Freund, M., Hartmann, L., Grimwade, D., Roberts, R. G., Schaal, H., Mohammed, S., Rahman, N., Schindler, D., & Mathew, C. G. (2010). Mutation of the RAD51C gene in a Fanconi anemia-like disorder. *Nature Genetics*, *42*(5), Article 5. <https://doi.org/10.1038/ng.570>
- Vaze, M. B., Pelliccioli, A., Lee, S. E., Ira, G., Liberi, G., Arbel-Eden, A., Foiani, M., & Haber, J. E. (2002). Recovery from checkpoint-mediated arrest after repair of a double-strand break requires Srs2 helicase. *Molecular Cell*, *10*(2), 373-385. [https://doi.org/10.1016/s1097-2765\(02\)00593-2](https://doi.org/10.1016/s1097-2765(02)00593-2)
- Veaute, X., Delmas, S., Selva, M., Jeusset, J., Le Cam, E., Matic, I., Fabre, F., & Petit, M.-A. (2005). UvrD helicase, unlike Rep helicase, dismantles RecA nucleoprotein filaments in Escherichia coli. *The EMBO Journal*, *24*(1), 180-189. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600485>
- Veaute, X., Jeusset, J., Soustelle, C., Kowalczykowski, S. C., Le Cam, E., & Fabre, F. (2003). The Srs2 helicase prevents recombination by disrupting Rad51 nucleoprotein filaments. *Nature*, *423*(6937), 309-312. <https://doi.org/10.1038/nature01585>
- Vernekar, D. V., Reginato, G., Adam, C., Ranjha, L., Dingli, F., Marsolier, M.-C., Loew, D., Guérois, R., Llorente, B., Cejka, P., & Borde, V. (2021). The Pif1 helicase is actively inhibited during meiotic recombination which restrains gene conversion tract length. *Nucleic Acids Research*, *49*(8), 4522-4533. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab232>
- von Nicolai, C., Ehlén, Å., Martin, C., Zhang, X., & Carreira, A. (2016). A second DNA binding site in human BRCA2 promotes homologous recombination. *Nature Communications*, *7*(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/ncomms12813>
- Wang, H., Shi, L. Z., Wong, C. C. L., Han, X., Hwang, P. Y.-H., Truong, L. N., Zhu, Q., Shao, Z., Chen, D. J., Berns, M. W., Iii, J. R. Y., Chen, L., & Wu, X. (2013). The Interaction of CtIP and Nbs1 Connects CDK and ATM to Regulate HR-Mediated Double-Strand Break Repair. *PLoS Genetics*, *9*(2), e1003277. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003277>
- Wang, W., Daley, J. M., Kwon, Y., Krasner, D. S., & Sung, P. (2017). Plasticity of the Mre11-Rad50-Xrs2-Sae2 nuclease ensemble in the processing of DNA-bound obstacles. *Genes & Development*, *31*(23-24), 2331-2336. <https://doi.org/10.1101/gad.307900.117>
- Wang, X., & Haber, J. E. (2004). Role of Saccharomyces Single-Stranded DNA-Binding Protein RPA in the Strand Invasion Step of Double-Strand Break Repair. *PLoS Biology*, *2*(1), e21. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0020021>

- Wang, Z., Jia, R., Wang, L., Yang, Q., Hu, X., Fu, Q., Zhang, X., Li, W., & Ren, Y. (2022). The Emerging Roles of Rad51 in Cancer and Its Potential as a Therapeutic Target. *Frontiers in Oncology*, 12. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fonc.2022.935593>
- Wassing, I. E., & Esashi, F. (2021). RAD51 : Beyond the break. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 113, 38-46. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2020.08.010>
- Watt, P. M., Hickson, I. D., Borts, R. H., & Louis, E. J. (1996). SGS1, a Homologue of the Bloom's and Werner's Syndrome Genes, Is Required for Maintenance of Genome Stability in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 144(3), 935-945. <https://doi.org/10.1093/genetics/144.3.935>
- Watt, P. M., Louis, E. J., Borts, R. H., & Hickson, I. D. (1995). Sgs1 : A eukaryotic homolog of E. coli RecQ that interacts with topoisomerase II in vivo and is required for faithful chromosome segregation. *Cell*, 81(2), 253-260. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(95\)90335-6](https://doi.org/10.1016/0092-8674(95)90335-6)
- White, C. i., & Haber, J. e. (1990). Intermediates of recombination during mating type switching in *Saccharomyces cerevisiae*. *The EMBO Journal*, 9(3), 663-673. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1990.tb08158.x>
- Williams, R. S., Dodson, G. E., Limbo, O., Yamada, Y., Williams, J. S., Guenther, G., Classen, S., Glover, J. N. M., Iwasaki, H., Russell, P., & Tainer, J. A. (2009). Nbs1 Flexibly Tethers Ctp1 and Mre11-Rad50 to Coordinate DNA Double-Strand Break Processing and Repair. *Cell*, 139(1), 87-99. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.07.033>
- Wilson, M. A., Kwon, Y., Xu, Y., Chung, W.-H., Chi, P., Niu, H., Mayle, R., Chen, X., Malkova, A., Sung, P., & Ira, G. (2013). Pif1 helicase and Pol δ promote recombination-coupled DNA synthesis via bubble migration. *Nature*, 502(7471), Article 7471. <https://doi.org/10.1038/nature12585>
- W.-L. Toh, G., Sugawara, N., Dong, J., Toth, R., Lee, S. E., Haber, J. E., & Rouse, J. (2010). Mec1/Tel1-dependent phosphorylation of Slx4 stimulates Rad1–Rad10-dependent cleavage of non-homologous DNA tails. *DNA Repair*, 9(6), 718-726. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2010.02.013>
- Wold, M. S. (1997). REPLICATION PROTEIN A : A Heterotrimeric, Single-Stranded DNA-Binding Protein Required for Eukaryotic DNA Metabolism. *Annual Review of Biochemistry*, 66(1), 61-92. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.66.1.61>
- Wold, M. S., & Kelly, T. (1988). Purification and characterization of replication protein A, a cellular protein required for in vitro replication of simian virus 40 DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 85(8), 2523-2527. <https://doi.org/10.1073/pnas.85.8.2523>
- Wolner, B., & Peterson, C. L. (2005). ATP-dependent and ATP-independent Roles for the Rad54 Chromatin Remodeling Enzyme during Recombinational Repair of a DNA Double Strand Break *. *Journal of Biological Chemistry*, 280(11), 10855-10860. <https://doi.org/10.1074/jbc.M414388200>
- Wolner, B., van Komen, S., Sung, P., & Peterson, C. L. (2003). Recruitment of the Recombinational Repair Machinery to a DNA Double-Strand Break in Yeast. *Molecular Cell*, 12(1), 221-232. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(03\)00242-9](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(03)00242-9)
- Wong, A. K. C., Pero, R., Ormonde, P. A., Tavtigian, S. V., & Bartel, P. L. (1997). RAD51 Interacts with the Evolutionarily Conserved BRC Motifs in the Human Breast Cancer Susceptibility Gene *brca2* *. *Journal of Biological Chemistry*, 272(51), 31941-31944. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.51.31941>
- Wong, R. P., García-Rodríguez, N., Zilio, N., Hanulová, M., & Ulrich, H. D. (2020). Processing of DNA Polymerase-Blocking Lesions during Genome Replication Is Spatially and Temporally Segregated from Replication Forks. *Molecular Cell*, 77(1), 3-16.e4. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2019.09.015>
- Wong, R. P., Petriukov, K., & Ulrich, H. D. (2021). Daughter-strand gaps in DNA replication – substrates of lesion processing and initiators of distress signalling. *DNA Repair*, 105, 103163. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2021.103163>

- Woo, T.-T., Chuang, C.-N., Higashide, M., Shinohara, A., & Wang, T.-F. (2020). Dual roles of yeast Rad51 N-terminal domain in repairing DNA double-strand breaks. *Nucleic Acids Research*, *48*(15), 8474-8489. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa587>
- Woo, T.-T., Chuang, C.-N., & Wang, T.-F. (2021). Budding yeast Rad51 : A paradigm for how phosphorylation and intrinsic structural disorder regulate homologous recombination and protein homeostasis. *Current Genetics*, *67*(3), 389-396. <https://doi.org/10.1007/s00294-020-01151-2>
- Wooster, R., Bignell, G., Lancaster, J., Swift, S., Seal, S., Mangion, J., Collins, N., Gregory, S., Gumbs, C., Micklem, G., Barfoot, R., Hamoudi, R., Patel, S., Rices, C., Biggs, P., Hashim, Y., Smith, A., Connor, F., Arason, A., ... Stratton, M. R. (1995). Identification of the breast cancer susceptibility gene BRCA2. *Nature*, *378*(6559), Article 6559. <https://doi.org/10.1038/378789a0>
- Wright, W. D., & Heyer, W.-D. (2014). Rad54 Functions as a Heteroduplex DNA Pump Modulated by Its DNA Substrates and Rad51 during D Loop Formation. *Molecular Cell*, *53*(3), 420-432. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2013.12.027>
- Wright, W. D., Shah, S. S., & Heyer, W.-D. (2018). Homologous recombination and the repair of DNA double-strand breaks. *Journal of Biological Chemistry*, *293*(27), 10524-10535. <https://doi.org/10.1074/jbc.TM118.000372>
- Wu, H. I., Brown, J. A., Dorie, M. J., Lazzeroni, L., & Brown, J. M. (2004). Genome-Wide Identification of Genes Conferring Resistance to the Anticancer Agents Cisplatin, Oxaliplatin, and Mitomycin C. *Cancer Research*, *64*(11), 3940-3948. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-03-3113>
- Wu, L., & Hickson, I. D. (2003). The Bloom's syndrome helicase suppresses crossing over during homologous recombination. *Nature*, *426*(6968), Article 6968. <https://doi.org/10.1038/nature02253>
- Wu, X. (2019). Replication Stress Response Links RAD52 to Protecting Common Fragile Sites. *Cancers*, *11*(10), Article 10. <https://doi.org/10.3390/cancers11101467>
- Wu, Y., Kantake, N., Sugiyama, T., & Kowalczykowski, S. C. (2008). Rad51 Protein Controls Rad52-mediated DNA Annealing. *Journal of Biological Chemistry*, *283*(21), 14883-14892. <https://doi.org/10.1074/jbc.M801097200>
- Wu, Y., Sugiyama, T., & Kowalczykowski, S. C. (2006). DNA Annealing Mediated by Rad52 and Rad59 Proteins *. *Journal of Biological Chemistry*, *281*(22), 15441-15449. <https://doi.org/10.1074/jbc.M601827200>
- Wyatt, H. D. M., Sarbajna, S., Matos, J., & West, S. C. (2013). Coordinated Actions of SLX1-SLX4 and MUS81-EME1 for Holliday Junction Resolution in Human Cells. *Molecular Cell*, *52*(2), 234-247. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2013.08.035>
- Xu, H., Boone, C., & Klein, H. L. (2004). Mrc1 Is Required for Sister Chromatid Cohesion To Aid in Recombination Repair of Spontaneous Damage. *Molecular and Cellular Biology*, *24*(16), 7082-7090. <https://doi.org/10.1128/MCB.24.16.7082-7090.2004>
- Xu, J., Zhao, L., Xu, Y., Zhao, W., Sung, P., & Wang, H.-W. (2017). Cryo-EM structures of human RAD51 recombinase filaments during catalysis of DNA-strand exchange. *Nature Structural & Molecular Biology*, *24*(1), 40-46. <https://doi.org/10.1038/nsmb.3336>
- Xu, X., Ball, L., Chen, W., Tian, X., Lambrecht, A., Hanna, M., & Xiao, W. (2013). The Yeast Shu Complex Utilizes Homologous Recombination Machinery for Error-free Lesion Bypass via Physical Interaction with a Rad51 Parologue. *PLoS ONE*, *8*(12). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0081371>
- Xue, C., Molnarova, L., Steinfeld, J. B., Zhao, W., Ma, C., Spirek, M., Kaniecki, K., Kwon, Y., Beláň, O., Krejci, K., Boulton, S. J., Sung, P., Greene, E. C., & Krejci, L. (2021). Single-molecule visualization of human RECQ5 interactions with single-stranded DNA recombination intermediates. *Nucleic Acids Research*, *49*(1), 285-305. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa1184>
- Xue, C., Wang, W., Crickard, J. B., Moevus, C. J., Kwon, Y., Sung, P., & Greene, E. C. (2019). Regulatory control of Sgs1 and Dna2 during eukaryotic DNA end resection. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *116*(13), 6091-6100. <https://doi.org/10.1073/pnas.1819276116>

- Yamaguchi-Iwai, Y., Sonoda, E., Buerstedde, J.-M., Bezzubova, O., Morrison, C., Takata, M., Shinohara, A., & Takeda, S. (1998). Homologous Recombination, but Not DNA Repair, Is Reduced in Vertebrate Cells Deficient in RAD52. *Molecular and Cellular Biology*, *18*(11), 6430-6435. <https://doi.org/10.1128/MCB.18.11.6430>
- Yan, H., Toczylowski, T., McCane, J., Chen, C., & Liao, S. (2011). Replication protein A promotes 5'→3' end processing during homology-dependent DNA double-strand break repair. *Journal of Cell Biology*, *192*(2), 251-261. <https://doi.org/10.1083/jcb.201005110>
- Yan, Z., Xue, C., Kumar, S., Crickard, J. B., Yu, Y., Wang, W., Pham, N., Li, Y., Niu, H., Sung, P., Greene, E. C., & Ira, G. (2019). Rad52 Restrains Resection at DNA Double-Strand Break Ends in Yeast. *Molecular cell*, *76*(5), 699-711.e6. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2019.08.017>
- Yang, H., Jeffrey, P. D., Miller, J., Kinnucan, E., Sun, Y., Thomä, N. H., Zheng, N., Chen, P.-L., Lee, W.-H., & Pavletich, N. P. (2002). BRCA2 Function in DNA Binding and Recombination from a BRCA2-DSS1-ssDNA Structure. *Science*, *297*(5588), 1837-1848. <https://doi.org/10.1126/science.297.5588.1837>
- Yang, H., Zhou, C., Dhar, A., & Pavletich, N. P. (2020). Mechanism of strand exchange from RecA–DNA synaptic and D-loop structures. *Nature*, *586*(7831), Article 7831. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2820-9>
- Yates, L. A., Aramayo, R. J., Pokhrel, N., Caldwell, C. C., Kaplan, J. A., Perera, R. L., Spies, M., Antony, E., & Zhang, X. (2018). A structural and dynamic model for the assembly of Replication Protein A on single-stranded DNA. *Nature Communications*, *9*(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-07883-7>
- Yokoyama, H., Sarai, N., Kagawa, W., Enomoto, R., Shibata, T., Kurumizaka, H., & Yokoyama, S. (2004). Preferential binding to branched DNA strands and strand-annealing activity of the human Rad51B, Rad51C, Rad51D and Xrcc2 protein complex. *Nucleic Acids Research*, *32*(8), 2556-2565. <https://doi.org/10.1093/nar/gkh578>
- Yoshida, K., Kondoh, G., Matsuda, Y., Habu, T., Nishimune, Y., & Morita, T. (1998). The Mouse RecA-like Gene Dmc1 Is Required for Homologous Chromosome Synapsis during Meiosis. *Molecular Cell*, *1*(5), 707-718. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(00\)80070-2](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(00)80070-2)
- You, Z., Chahwan, C., Bailis, J., Hunter, T., & Russell, P. (2005). ATM Activation and Its Recruitment to Damaged DNA Require Binding to the C Terminus of Nbs1. *Molecular and Cellular Biology*, *25*(13), 5363-5379. <https://doi.org/10.1128/MCB.25.13.5363-5379.2005>
- Yu, X., & Egelman, E. H. (2010). Helical Filaments of Human Dmc1 Protein on Single-Stranded DNA : A Cautionary Tale. *Journal of Molecular Biology*, *401*(3), 544-551. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2010.06.049>
- Yu, X., Jacobs, S. A., West, S. C., Ogawa, T., & Egelman, E. H. (2001). Domain structure and dynamics in the helical filaments formed by RecA and Rad51 on DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *98*(15), 8419-8424. <https://doi.org/10.1073/pnas.111005398>
- Yuan, J., & Chen, J. (2011). The Role of the Human SWI5-MEI5 Complex in Homologous Recombination Repair *. *Journal of Biological Chemistry*, *286*(11), 9888-9893. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.207290>
- Yuan, J., & Chen, J. (2013). FIGNL1-containing protein complex is required for efficient homologous recombination repair. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *110*(26), 10640-10645. <https://doi.org/10.1073/pnas.1220662110>
- Zaitseva, E. M., Zaitsev, E. N., & Kowalczykowski, S. C. (1999). The DNA Binding Properties of *Saccharomyces cerevisiae* Rad51 Protein*. *Journal of Biological Chemistry*, *274*(5), 2907-2915. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.5.2907>
- 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. *Journal of Cell Biology*, *208*(5), 563-579. <https://doi.org/10.1083/jcb.201406099>
- Zhang, H., & Lawrence, C. W. (2005). The error-free component of the RAD6/RAD18 DNA damage tolerance pathway of budding yeast employs sister-strand recombination. *Proceedings of the*

- National Academy of Sciences*, 102(44), 15954-15959.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0504586102>
- Zhang, H., Schaub, J. M., & Finkelstein, I. J. (2020). RADX condenses single-stranded DNA to antagonize RAD51 loading. *Nucleic Acids Research*, 48(14), 7834-7843.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkaa559>
- Zhang, S., Wang, L., Tao, Y., Bai, T., Lu, R., Zhang, T., Chen, J., & Ding, J. (2017). Structural basis for the functional role of the Shu complex in homologous recombination. *Nucleic Acids Research*, 45(22), 13068-13079. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx992>
- Zhang, Z., Fan, H.-Y., Goldman, J. A., & Kingston, R. E. (2007). Homology-driven chromatin remodeling by human RAD54. *Nature Structural & Molecular Biology*, 14(5), Article 5.
<https://doi.org/10.1038/nsmb1223>
- Zhao, F., Kim, W., Kloeber, J. A., & Lou, Z. (2020). DNA end resection and its role in DNA replication and DSB repair choice in mammalian cells. *Experimental & Molecular Medicine*, 52(10), Article 10. <https://doi.org/10.1038/s12276-020-00519-1>
- Zhao, L., & Washington, M. T. (2017). Translesion Synthesis : Insights into the Selection and Switching of DNA Polymerases. *Genes*, 8(1), Article 1. <https://doi.org/10.3390/genes8010024>
- Zhao, W., Vaithiyalingam, S., San Filippo, J., Maranon, D. G., Jimenez-Sainz, J., Fontenay, G. V., Kwon, Y., Leung, S. G., Lu, L., Jensen, R. B., Chazin, W. J., Wiese, C., & Sung, P. (2015). Promotion of BRCA2-Dependent Homologous Recombination by DSS1 via RPA Targeting and DNA Mimicry. *Molecular Cell*, 59(2), 176-187. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.05.032>
- Zheng, X.-F., Prakash, R., Saro, D., Longrich, S., Niu, H., & Sung, P. (2011). Processing of DNA structures via DNA unwinding and branch migration by the *S. cerevisiae* Mph1 protein. *DNA Repair*, 10(10), 1034-1043. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2011.08.002>
- Zhu, Z., Chung, W.-H., Shim, E. Y., Lee, S. E., & Ira, G. (2008). Sgs1 Helicase and Two Nucleases Dna2 and Exo1 Resect DNA Double-Strand Break Ends. *Cell*, 134(6), 981-994.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.08.037>
- Zou, L., & Elledge, S. J. (2003). Sensing DNA Damage Through ATRIP Recognition of RPA-ssDNA Complexes. *Science*, 300(5625), 1542-1548. <https://doi.org/10.1126/science.1083430>
- Zou, Y., Liu, Y., Wu, X., & Shell, S. M. (2006). Functions of human replication protein A (RPA) : From DNA replication to DNA damage and stress responses. *Journal of Cellular Physiology*, 208(2), 267-273. <https://doi.org/10.1002/jcp.20622>

Title : Regulation of Rad51 nucleofilament formation by Rad51 paralog complexes in *Saccharomyces cerevisiae*

Keywords : Homologous Recombination, Rad51 filament, Rad51 paralogs, DNA repair, Rad52, Srs2

Abstract : Homologous recombination (HR) is one of the major repair pathways for DNA damage such as double-strand breaks (DSBs). This pathway is also involved in restarting replication forks stalled by DNA lesion. A key step in this repair pathway involves the formation of nucleoprotein filaments formed by Rad51 recombinase on single-stranded DNA (ssDNA). These nucleofilaments are responsible for homology search and invasion of an intact DNA similar to the damaged DNA in order to use it as a template for repair synthesis. The formation of these nucleofilaments is tightly regulated. In the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*, the formation of Rad51 filaments is ensured by positive regulators such as the Rad52 mediator protein and the two complexes composed of Rad51 paralog proteins, the Rad55-Rad57 complex and the SHU complex. They also play a role in protecting this nucleofilament from the negative regulator Srs2 by counterbalancing its disassembly effects. To gain a better understanding of the regulatory mechanism of the Rad51 nucleofilament, we need a more detailed understanding of the complex interactions between these multiple players.

During my thesis, we aimed at determining the structure of Rad51 paralog complexes in association with Rad51 filaments. To do this, we combined a structural bioinformatics approach, based on sequence alignments and the published structure of Rad51, with yeast two-hybrid (Y2H) experiments.

This strategy allowed us to build for the first time a model for the organisation of Rad51 paralog complexes, the Rad55-Rad57 and SHU complexes, in association with the Rad51 recombinase. This model was further validated by genetic analysis of mutations disrupting each interaction domain. In our model, Rad55-Rad57 adopts a similar structure than a dimer of Rad51 and it interacts only with the 5'-end of Rad51 filaments and only through the Rad57 subunit. Our genetic analyses suggest that the major role of the interaction between Rad55-Rad57 and Rad51 is to protect Rad51 filaments against the Srs2 translocase. On the other side of Rad55-Rad57, Rad55 interacts with the Csm2 subunit of the SHU complex through its N-terminal end. Interestingly, our genetic analyses revealed that SHU and the N-terminal end of Rad55 are dispensable for DSB repair. However, they are involved in the repair of UV-induced single-strand breaks. We propose that the SHU complex stabilizes the binding of Rad55-Rad57 on ssDNA gaps, thereby promoting enhanced stability of Rad51 filaments. Thus, Rad51 filaments would be more resistant to the destabilising activity of the Srs2 translocase and would allow HR to compete with alternative gap filling pathways involving error-prone translesion DNA polymerases. Our data allow us to propose a model for the installation of the Rad51 filament by paralog complexes, Rad55-Rad57 and SHU, in collaboration with Rad52.

Titre : Régulation de la formation des nucléofilaments Rad51 par les complexes de paralogues de Rad51 chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*

Mots clés : Recombinaison Homologue, Filaments Rad51, Paralogues de Rad51, Réparation de l'ADN, Rad52, Srs2

Résumé : La recombinaison homologue (RH) est une des voies majeures de réparation des dommages de l'ADN telles que les cassures double-brin (CDB). Cette voie est également impliquée dans le redémarrage des fourches de réplication bloquées à une lésion. Une étape clé de cette voie de réparation consiste en la formation de filaments nucléoprotéiques formés de la recombinase Rad51 sur de l'ADN simple-brin (ADNsb). Ces nucléofilaments sont responsables de la recherche d'homologie et de l'invasion d'un ADN intact et semblable à l'ADN endommagé afin de l'utiliser comme matrice pour la synthèse réparatrice. La formation de ces nucléofilaments est finement régulée. Chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*, la formation des filaments Rad51 est assurée par les régulateurs positifs que sont la protéine médiatrice Rad52 et les deux complexes composés de protéines paralogues de Rad51, le complexe Rad55-Rad57 et le complexe SHU. Ils jouent également un rôle de protection de ce nucléofilament face au régulateur négatif Srs2 dont ils contrebalancent les effets de désassemblage. Pour mieux comprendre le mécanisme de régulation du nucléofilament Rad51, une connaissance plus approfondie des interactions complexes intervenant entre ces multiples acteurs est nécessaire.

Durant ma thèse, nous avons cherché à déterminer la structure des complexes de paralogues de Rad51 en association avec les filaments de Rad51. Pour cela, nous avons combiné une approche bio-informatique structurale, basée sur des alignements de séquences et la structure publiée de Rad51, avec des expériences de double-hybride de levure (Y2H).

Cette stratégie nous a permis de proposer pour la première fois un modèle pour l'organisation des complexes de paralogues de Rad51, les complexes Rad55-Rad57 et SHU, en association avec la recombinase Rad51. Ce modèle a été validé par des analyses génétiques de mutations perturbant chaque domaine d'interaction. Dans notre modèle, Rad55-Rad57 adopte une structure similaire à celle d'un dimère de Rad51 et n'interagit qu'avec l'extrémité 5' des filaments de Rad51 et uniquement par l'intermédiaire de la sous-unité Rad57. Nos analyses génétiques suggèrent que le rôle principal de l'interaction entre Rad55-Rad57 et Rad51 est de protéger les filaments Rad51 contre la translocase Srs2. De l'autre côté de Rad55-Rad57, Rad55 interagit avec la sous-unité Csm2 du complexe SHU par son extrémité N-terminale. Il est intéressant de noter que nos analyses génétiques ont révélé que SHU et l'extrémité N-terminale de Rad55 sont dispensables pour la réparation des CDB. Ils sont en revanche impliqués dans la réparation des brèches simple-brin induites par les UV. Nous proposons que le complexe SHU stabilise la liaison de Rad55-Rad57 sur les brèches simple-brin, favorisant ainsi une meilleure stabilité des filaments de Rad51. Ainsi, les filaments Rad51 seraient plus résistants à l'activité déstabilisatrice de l'hélicase anti-recombinase Srs2 et permettraient à la RH de rivaliser avec d'autres voies de tolérance aux dommages de l'ADN impliquant des ADN polymérases translésionnelles responsables de l'incorporation de mutations. Nos données permettent de proposer un modèle d'installation du filament Rad51 par les complexes de paralogues, Rad55-Rad57 et SHU, en collaboration avec Rad52.