

THÈSE POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR EN SCIENCES

Soutenue à Aix-Marseille Université
Le 16 Décembre 2021 par

Cédric GIACCHERINI

**Mécanismes de contrôle de l'endonucléase Mus81-
Eme1 et maintien de la stabilité du génome dans la
levure *Schizosaccharomyces pombe***

Discipline

Biologie Santé

Spécialité

Génétique

École doctorale

ED62 – Sciences de la vie et de la santé

Laboratoire

Centre de Recherche en Cancérologie de
Marseille

Composition du jury

Valérie BORDE

Institut Curie, Paris

Rapporteuse

Benoît ARCANGIOLI

Institut Pasteur, Paris

Rapporteur

Emmanuelle MARTINI

CEA, Fontenay-Aux-Roses

Examinatrice

Gerard MAZÓN

Gustave Roussy, Paris

Examinateur

Pierre-Henri GAILLARD

CRCM, Marseille

Directeur de thèse

Pierre-Marie DEHÉ

CRCM, Marseille

Co-directeur de thèse

Remerciements

Après avoir passé 2 mois en L3, 6 mois en M2 et 4 ans au sein de l'équipe de Pierre-Henri GAILLARD, c'est avec le cœur lourd que je termine l'écriture de cette thèse par les remerciements. Ils seront authentiques, et risque donc parfois de donner des maux de têtes aux puristes de la langue Française.

Je tiens d'abord à remercier les membres du jury pour avoir accepté de participer à l'évaluation de mon travail. Merci aux rapporteurs, Dr. Valérie BORDE et Dr. Benoit ARCANGIOLI d'avoir accepté de faire partie du jury. Merci aux Dr. Emmanuelle MARTINI et Dr. Gerard MAZÓN d'avoir accepté d'être examinateurs de ce travail. Je remercie les membres de mon comité de thèse, Sarah LAMBERT et Bertrand LLORENT. Je tiens également à remercier Dr. Emmanuelle BOUVERET chez qui j'ai passé 4 mois pendant mon stage de BTS et qui m'a donné avec Laetitia MY les premiers aperçus de ce qu'est la science. Enfin, merci au Dr. Denise ARAGNOL, qui a trouvé un laboratoire qui acceptait un étudiant pour un mois l'été seulement : le laboratoire de Pierre-Henri GAILLARD. C'est de là que tout a commencé.

Il est pour moi difficile de hiérarchiser les remerciements puisque toute l'équipe a su, à un moment donné, m'apporter son soutien ou m'aiguiller. Néanmoins, mes premiers mots vont évidemment à Pierre-Henri GAILLARD et Pierre-Marie DEHE, respectivement mon directeur et co-directeur de thèse. Si je peux actuellement écrire ces remerciements, c'est parce qu'ils m'ont laissé l'opportunité de faire cette thèse. Dans un premier temps, je tiens à remercier Pierre-Henri GAILLARD aka PH. Tu m'as permis dès mon M2 de participer à des congrès, comme le Pombe Club, et je pense que peu de personnes ont pu avoir cette opportunité aussi tôt. Merci d'avoir cru en moi à la fin de mon M2 et de me garder comme le premier étudiant en thèse du laboratoire. En tant que Marseillais, le seul fait de pouvoir dire à jamais le premier est d'ores et déjà une fierté. Au cours de cette thèse, tu as su m'inculquer ce qu'était la rigueur scientifique, de par ton exigence du haut niveau et également ton exigence envers moi. J'ai encore beaucoup à apprendre, c'est une certitude, mais grâce à toi, j'avance chaque jour vers une meilleure version de moi. Le « minot » de 2017 a bien grandi (quoique...) et j'ai su m'épanouir dans ce laboratoire, entre autres car tu m'as laissé tester mes hypothèses, même si parfois il fallait un peu me recadrer, ça a permis de laisser place à ma curiosité. Tu m'as aussi

converti à la biochimie, moi qui détestais ça. Vraiment, c'était les cours auxquelles je ne voulais pas assister. Et pourtant, tu as su me convaincre de sortir de ma zone de confort, et de me lancer dans la biochimie. Cette réunion dans le bureau, où je disais qu'avec la biochimie, on dit ce que l'on veut, m'a permis de m'y mettre et de voir que ce n'est pas du tout le cas. Cela m'a fait grandir, sortir de mon champ de compétences initiales et devenir meilleur. Merci beaucoup pour ça. Autour de moi, tout le monde dit « la thèse c'est compliquée ... », je crois qu'au sein de ton équipe, toutes les conditions étaient réunies pour que je puisse dire que ma thèse s'est très bien passée. Je ne peux malheureusement pas écrire une deuxième thèse basée sur des remerciements, mais mille merci de m'avoir accepté en stage en L3 à mes 21 ans. Merci de m'avoir accepté en M2 à mes 23 ans. Merci de m'avoir accepté en thèse à mes 24 ans. Et merci pour ces quatre excellentes années, où je fête mes 27 ans. 6 ans après t'avoir vu la «tcheam » a bien changé, mais pas toi, cela a vraiment été un honneur d'intégrer ton équipe.

Dans un second temps, je voulais remercier Pierre-Marie DEHE aka PM (Oui, vous verrez par la suite que ce laboratoire est composé de nombreux noms composés...). Mon compatriote de levure, nous formons avec PH le « pombe rules ». Trois levuristes face à une majorité de Hela, U2OS, RPE mais nous avons tenu bon. Notre relation est plus particulière ... Déjà parce que nous avons dormi à environ 20 cm l'un de l'autre à Londres (Tous les dossiers vont sortir ici, désolé d'avance, je me venge d'avance pour le jour de ma thèse ...). Tout de suite, ça renforce les liens. Nous partageons un humour similaire, qui frôle le grotesque, l'absurde, l'exagération et le quotidien avec toi au laboratoire a fortement contribué au bon déroulé de la thèse. Tu as su me guider dans les manip' et faire en sorte que tout avance pour le mieux. Tu as toujours su avoir le mot d'encouragement pour mieux repartir quand les manips marchaient moins bien. Les pauses repas et cafés ensemble vont fortement me manquer, c'était les moments de joies et de partages où mon cerveau pouvait se mettre en OFF (bien que dans les faits, ça arrive hors pause aussi...) et où la rigolade était assurée. Nos combats de GIF avec Kaamelott pouvait durer plusieurs minutes, et c'est des moments que j'espère ne pas perdre après mon départ. On adorait taquiner les autres, et surtout nous-même ! Et comme disait un grand sage, Euh ... attends ... QUUOOI ? (Les vrais savent). Je n'ai pas honte d'écrire que j'ai rencontré bien plus que des scientifiques, j'ai rencontré de vrais collègues. Merci encore pour tout, pour avoir fait que ces 4 ans soient 4 années de bonheur.

Je tiens à remercier maintenant toutes les autres personnes du laboratoire, en commençant par Arato TAKEDACHI. C'était toi mon co-encadrant en L3. Le petit marseillais à qui on a demandé si parler en anglais avec toi le Japonais d'Osaka serait compliqué. J'avais dit non, jusqu'à t'entendre. Je vais être honnête, mon niveau frôlait le néant et je ne comprenais rien du tout ! Mais je n'ai jamais autant appris que sur cette période, en anglais évidemment, mais scientifiquement, c'est avec toi que j'ai appris les bases techniques. J'ai encore gardé des manières de faire que tu m'avais enseigné, pleines de rigueurs et de détails mais qui font toutes la différence. Tu étais mon acolyte de Pastis. Je te considère comme au moins comme mon égal voir parfois, tu pouvais me surpasser sur les concentrations de Pastis que tu pouvais mettre dans un seul verre !! (102). Merci pour tous ces bons moments.

Merci à Jean-Hugues GUERVILLY et Sarah SCAGLIONE qui était là dès mon stage de L3. Merci à Jean-Hugues pour ses nombreux conseils scientifiques, toujours à l'écoute et à proposer quelques choses. Merci de m'avoir permis de faire du badminton avec Luisa, Sylvain et toi, c'est vraiment sympa et j'espère qu'on continuera ainsi même après mon départ. Tu as aussi été un fidèle compagnon de bar avec Arato. Nous savions que si nous étions tous les trois, on allait passer une excellente soirée. C'est ce genre de moments qui nous permettent de décompresser et de souder l'équipe. Reste comme tu es, j'ai été ravi de travailler à tes côtés avec des projets passionnants à écouter. Merci aussi à Sarah, qui me considère encore comme un stagiaire à 27 ans et après ma thèse. J'ai eu l'honneur de passer stagiaire en chef récemment, cette promotion m'a vraiment rendu fier. Merci pour tous tes conseils scientifiques, techniques, c'est grâce à toi aussi que la partie *in vitro* du projet a pu prendre forme. Nous partageons avec PM, PH et toi un article en commun, nous sommes donc liés à jamais ! (A ton plus grand bonheur j'en suis sûr). Je suis dans l'obligation d'en placer une sur France Inter. Sarah, tu es celle qui s'occupe de la radio, tout le monde le sait. Je t'adore Sarah, vraiment, mais pour le bonheur psychologique de l'équipe, cette radio ne doit plus jamais être mise dans le laboratoire, surtout à partir de 15h, avec l'émission affaire sensible. C'est une véritable catastrophe ... A part ça j'ai été ravi d'apprendre à tes côtés !

Un grand merci aussi à Chloé LE FOURNIS, Manon RICQUEBOURG et Stéphanie GON. Pour toutes les 3, nous nous sommes rencontrés il y a environ un an, voire un peu moins. A votre plus grand désarroi ... Les discussions scientifiques ainsi que les pauses café et repas sont des

moments agréables qui vont me manquer ! Bien que je vous taquine régulièrement avec PM, vous êtes des personnes qui ont toujours su rigoler avec nous (et aussi de nous). J'espère vous revoir après avoir passé cette thèse !

Un grand merci également aux personnes qui étaient au laboratoire et avec qui j'ai passé des moments formidables, Marion BLIN et Zdenka HASANOVA. Marion a pris le temps de relire cette thèse et je la remercie encore de s'être dévouée. Pendant sa période au laboratoire, elle a toujours su être à l'écoute et m'aiguiller même dans les moments les plus difficiles. Elle m'a donné une merveilleuse peluche à l'effigie du PSG, que je me ferais un plaisir de jeter, seulement si j'ai l'honneur d'obtenir le grade de Docteur. J'attends ce moment depuis 4 ans, je me languis que ce moment arrive. Merci pour ta compréhension à tous les niveaux, scientifiques et personnelles, je suis sûr que nous garderons encore contact. Zdenka, merci à toi pour ces moments de partages qui n'ont fait que renforcer mon bien-être dans l'équipe.

Un grand merci à la communauté 3R et aux étudiants en thèse, vous êtes tellement nombreux à avoir contribué à ce que tout se passe bien qu'il serait compliqué de tous vous citer... Particulièrement, un merci à Axelle, Florian, Marie, Mélina avec qui j'ai commencé ma thèse en même temps, et nous la finirons ensemble !

Ces remerciements sont déjà relativement longs, mais je vais finir par remercier mes proches. Tout d'abord, à ma conjointe Julie HARO, avec qui j'ai passé presque 10 ans de ma vie déjà. Elle a su m'épauler dans les moments compliqués et nous allons continuer à écrire l'histoire de notre vie, ensemble. Merci pour tout ce que tu as fait pour moi, jamais je ne l'oublierai.

Merci à mes deux meilleurs amis, Dylan SARTELET et Jordan VEZZA. Je les considère comme des membres de ma famille. Je vous connais depuis 20 ans déjà, et notre amitié ne s'est jamais arrêté, ce qui est plutôt rare. Merci pour votre soutien constant durant ces 4 ans !

Enfin, mes derniers mots vont à ma famille, plus particulièrement mon père Patrick GIACCHERINI, ma mère Nathalie SANCHEZ et ma sœur, Anaïs GIACCHERINI. Si j'en suis là, c'est grâce à vous et je suis très fier d'être votre fils/frère. Mille merci à vous et à votre soutien. Vous êtes parfaits, je ne vous changerai pour rien au monde. Un merci aussi à Cathy CAMPO, Mathieu TRAN, Stéphane SAUVANNET et Ugo TRAN. J'ai partagé de longs moments avec vous, merci d'être à mes côtés et d'avoir contribué à faire ce que je suis aujourd'hui.

*A ma famille,
A Julie,
A mes amis,
puissent-ils être aussi fiers de moi que je le suis de les avoir à mes côtés.*

*« Choisissez un travail que vous aimez et vous n'aurez pas à travailler un seul jour de votre
vie. »
Confucius.*

Abbreviations

5-FOA: 5-Fluorootic Acid

ADNsb : ADN simple-brin

alt-NHEJ : Alternative Non- Homologous End-Joining

APC/C : Anaphase promoting complex or cyclosome

ATM : Ataxia Telangiectasia Mutated

ATR : Ataxia Telangiectasia Mutated and Rad3-Related

BIR : Break-Induced Replication

BLM : Bloom Syndrome RecQ like helicase

BRCA1 : Breast Cancer 1

BRCA2 : Breast Cancer 2

BTR : BLM, Topo IIa, RMI1 and RMI2

c-NHEJ : classical or canonical Non- Homologous End-Joining

Cdc2 Cell Division Cycle 2

CDK : Cyclin-Dependent Kinase

CDS1 : Checking DNA synthesis 1

CFS : Common Fragile Site

CHK1 : Checkpoint Kinase 1

CHK2 : Checkpoint Kinase 2

CO : Crossover

CPT : Camptothécine

CtIP : CtBP-interacting protein, aka RBBP8

Ctp1 : CtIP-related Protein

Cut9 : Cell untimely torn 9

D-box : Destruction box

D-loop : Displacement loop

(d)HJ : (double) Holliday junction

DSB : Double-Strand Break

DSBR : Double-Strand Break Repair

EME1 : Essential meiotic endonuclease 1

ERCC1 : Excision repair cross-complementing group 1 protein

EXO1 : Exonuclease 1

H2A : Histone 2 A

HU : Hydroxyurea

HR : Homologous Recombination

Ku : Ku70/Ku80 complex

MCM : Mini-chromosome Maintenance Complex

MiDAS : Mitotic DNA Synthesis

MMEJ : Micro-homology-Mediated End-Joining

MMR : Mismatch Repair

MMS : Methyl Methanesulfonate

Mms4 : Methyl methane sulfonate 4

Mre11 : Meiotic recombination 11

Mus81 : MMS and UV-sensitive protein 81

NHEJ : Non-Homologous End- Joining

PLK1 : Polo-like kinase 1

Rad : Radiation sensitive

RPA : Replication Protein A

Rqh1 : RecQ helicase 1

Sae2 : Sporulation in the Absence of Spo11 2

SDSA : Synthesis Dependent Strand Annealing

Sgs1 : Slow Growth Suppressor 1

SIM : SUMO Interacting Motif

SLX : Synthetic lethal with unknown function

SSA : Single Strand Annealing STR Sgs1, Top3, Rmi1

SSE : Structure specific endonuclease

Tel1 : Telomere length regulation protein 1

UFB : Ultrafine Bridge

UV : Ultraviolet

XPF : Xeroderma pigmentosum group F-complementing protein

Xrs2 : X-ray sensitive 2

Table des matières

Préambule.....	1
CHAPITRE 1.....	4
Généralité sur <i>Schizosaccharomyces pombe</i>	4
I. <i>S. pombe</i>	6
1. Origine.....	6
2. Classification phylogénétique.....	7
3. Génomes comparés de <i>S. pombe</i> et <i>S. cerevisiae</i>	7
4. <i>S. pombe</i> et découvertes fondamentales	8
5. Cycle cellulaire.....	9
CHAPITRE 2.....	12
Contrôle du cycle cellulaire.....	12
I. Généralité sur le cycle cellulaire	14
II. Les points de contrôle	18
1. Checkpoint en G1	21
2. Checkpoint intra-S.....	21
2.1 Activation d'ATR ^{Mec1/Rad3} en réponse à un stress réplcatif chez <i>S. pombe</i>	22
2.2 Activation et fonctions de Cds1	25
3. Checkpoint G2/M	27
3.1 Activation de Rad3 et Tel1 en réponse à une cassure double brin chez <i>S. pombe</i>	27
3.2 Activation et fonctions de Crb2	28
3.3 Activation et fonctions de Chk1.....	30
CHAPITRE 3.....	32
Réparation des cassures double brin d'ADN.....	32
I. NHEJ.....	35
1. Le NHEJ canonique.....	36
2. Le NHEJ Alternatif	36
II. Recombinaison Homologue des cassures double brin à deux extrémités.....	37
1. Résection	39
1.1 Résection de courte distance	39
1.2 Résection de longue distance.....	42
2. Appariement simple brin ou SSA.....	43
3. Formation de la D-Loop.....	44
4. l'appariement de brin dépendant de la synthèse (SDSA)	46

5. Réparation de la cassure double brin d'ADN (DSBR)	47
5.1 Dissolution des doubles jonctions de Holliday	48
5.2 Résolution des doubles jonctions de Holliday.....	49
CHAPITRE 4.....	52
<i>L'endonucléase à spécificité de structure Mus81-Eme1</i>	52
<i>I Découverte de MUS81-EME1</i>	55
1. Structure des protéines de la famille XPF/MUS81	56
1.1 Activité biochimique de la famille XPF/MUS81	58
1.2 Structure et activité du complexe Mus81-Eme1	60
<i>II Rôle de Mus81-Eme1 en méiose.....</i>	62
<i>III Rôle de Mus81-Eme1 en réponse à un stress réplicatif</i>	64
1. Redémarrage des fourches après un stress réplicatif.....	64
2. La fourche bloquée.....	66
3. La réversion de fourche	66
4. La fourche effondrée et la réplication induite par les cassures.....	69
4.1 La réplication induite par les cassures ou BIR	69
4.2 Rôle de Mus81-Eme1 au cours du BIR	71
4.3 Gestion des lésions après un traitement camptothécine	71
5. Stress réplicatif et mitose	74
5.1 Les ponts anaphasiques	74
5.2 Synthèse d'ADN mitotique	75
<i>IV Régulation du complexe Mus81-Eme1</i>	76
1. Régulation du complexe Mus81-Mms4 chez <i>S. cerevisiae</i>	76
2. Régulation du complexe MUS81-EME1 et MUS81-EME2 dans les cellules humaines	79
3. Régulation du complexe Mus81-Eme1 chez <i>S. pombe</i>	81
<i>V. Balance entre hélicase et nucléase : Hélicases de la famille BLM vs Mus81-Eme1</i>	82
<i>Objectifs.....</i>	84
<i>Résultats</i>	89
<i>I. Mus81-Eme1 est contrôlée par la kinase Rad3^{ATR} et les propriétés de fixation à SUMO d'Eme1. ..</i>	91
1. Résumé	91
2. Publication Giaccherini et al.	93
<i>II. Les niveaux intracellulaires de Mus81-Eme1 sont régulés par le complexe E3 ubiquitine ligase APC/C</i>	96
<i>Conclusion et discussion.....</i>	110
<i>I. Conclusion</i>	112
<i>II. Discussion</i>	114
<i>Bibliographie</i>	126

Liste des figures

Figure 1 : Photo de <i>S. pombe</i>	6
Figure 2 : Comparaison des génomes de <i>S. pombe</i> et <i>S. cerevisiae</i>	8
Figure 3 : Nombre de publications avec <i>S. pombe</i>	9
Figure 4 : Développement sexuel de <i>S. pombe</i>	10
Figure 5 : Cycle cellulaire de <i>S. pombe</i>	11
Figure 6 : Les acteurs clés du cycle cellulaire	15
Figure 7 : Régulation du complexe cycline-CDK dans les cellules humaines et <i>S. pombe</i>	17
Figure 8. Vue générale des points de contrôles intra-S et G2/M dans les cellules humaines et chez <i>S. pombe</i>	20
Figure 9. Mécanisme d'activation du checkpoint intra-S chez <i>S. pombe</i>	24
Figure 10. Activation et rôle de Cds1 chez <i>S. pombe</i>	26
Figure 11. Activation du checkpoint G2/M après une cassure double brin d'ADN chez <i>S. pombe</i> ...	29
Figure 12. Rôle de Chk1 en réponse à une cassure double brin chez <i>S. pombe</i>	31
Figure 13. Réparation des DSB par le NHEJ (Non- homologous end joining) et la recombinaison homologue (HR, Homologous recombination)	34
Figure 14. Mécanismes de réparation des DSBs par jointure des extrémités. NHEJ canonique (à gauche) et NHEJ Alternatif (à droite).....	35
Figure 15. Voies de réparations des cassures double brin par recombinaison homologue.....	38
Figure 16. Résection de courte et de longue distance suite à une cassure double brin d'ADN	40
Figure 17. Mécanismes de l'appariement simple brin (SSA)	44
Figure 18. Mécanismes de l'appariement simple brin (SSA) et de l'appariement de brin dépendant de la synthèse (SDSA).....	47
Figure 19. Gestion des doubles jonctions de Holliday.....	48
Figure 20. Évolution des endonucléases à spécificité de structure appartenant à la famille XPF/MUS81	56
Figure 21. Structure simplifiée de Mus81-Eme1 de <i>S. pombe</i>	59
Figure 22. Substrats de l'endonucléase Mus81-Eme1.....	60
Figure 23. Structure en cristallographie de Mus81-Eme1 humain	62
Figure 24. Mécanismes proposés pour restaurer une fourche de réplication perturbée. Récupération des fourches de réplication stressées.....	65
Figure 25. Rôle de l'endonucléase Mus81-Eme1 dans le redémarrage des fourches arrêtées et réversées.....	68
Figure 26. Réparation des seDSB par la réplication induite par les cassures ou BIR.	70
Figure 27. Rôle de l'endonucléase Mus81-Eme1 dans le redémarrage des fourches arrêtées par la CPT	73
Figure 28. Régulation du complexe MUS81-EME1 et GEN1 chez les cellules humaines et les levures <i>S. cerevisiae</i> et <i>S. pombe</i>	78

Tableau 1. Orthologues des protéines humaines clés impliquées dans les points de contrôles chez <i>S. cerevisiae</i> et <i>S. pombe</i>	19
---	----

PREAMBULE

L'ADN étant constamment soumis à des altérations résultant de stress génotoxiques endogènes et exogènes, des systèmes sophistiqués de réparation de l'ADN ont été sélectionnés au cours de l'évolution. Les endonucléases à spécificité de structures (SSE) sont une classe particulière d'enzymes qui agissent sur des structures secondaires d'ADN générées lors de la réparation, la recombinaison et la réplication de l'ADN. Non résolues ces structures peuvent contribuer à une instabilité génomique responsable de pathologies dont le cancer. Les SSE remplissent donc des fonctions essentielles mais leur action doit être finement régulée afin d'éviter qu'une action non contrôlée n'induisse une instabilité chromosomique.

Chez la levure *Schizosaccharomyces pombe*, l'endonucléase hétérodimérique Mus81-Eme1 assure la résolution de structures secondaires d'ADN. Elle est essentielle en absence de l'hélicase Rqh1^{BLM}, orthologue de l'hélicase humaine BLM altérée dans le syndrome de Bloom, caractérisé par des anomalies développementales et par une prédisposition à tous les types de cancers. Le laboratoire a identifié un mécanisme de contrôle de Mus81-Eme1 via la phosphorylation par les kinases Cdc2^{CDK1} et Chk1^{CHK1} de la sous-unité Eme1 du complexe (Dehé et al., 2013). La phosphorylation d'Eme1 par Cdc2 lors de la phase G2 du cycle cellulaire constitue un prérequis pour une deuxième phosphorylation par la kinase Chk1^{CHK1} en cas d'induction de la voie de réponse aux dommages à l'ADN. Cette phosphorylation bimodale de la sous-unité Eme1 assure une hyper-activation du complexe Mus81-Eme1, restreinte à la fin de la phase G2 et la mitose. Ce contrôle est crucial pour garantir la stabilité du génome en absence de l'hélicase Rqh1^{BLM}. Mon travail de thèse s'est inscrit dans la continuité de ces travaux. Articulé autour de deux axes, il a permis la découverte de nouvelles voies de régulations essentielles pour les fonctions de Mus81-Eme1 en absence de Rqh1.

Mon travail de thèse s'inscrit dans la continuité de travaux publiés du laboratoire sur l'identification d'un mécanisme de contrôle de Mus81-Eme1. J'ai pu d'une part, déterminer le rôle d'une nouvelle phosphorylation de la sous-unité d'Eme1 dans le contrôle du complexe. D'autre part, j'ai mis en évidence un nouveau mécanisme de régulation impliquant le contrôle du niveau de protéines du complexe.

Avant de présenter les résultats obtenus durant ma thèse, la section introduction de ce manuscrit présente un descriptif 1) De l'organisme modèle *Schizosaccharomyces pombe* 2) Du

cycle cellulaire et des mécanismes des points de contrôles 3) des mécanismes de réparation des cassures double brin 4) du contrôle de l'endonucléase Mus81-Eme1. La première partie des résultats est présentée sous forme d'article scientifique dans lequel j'ai exploré de nouveaux mécanismes de régulations de Mus81-Eme1 par la kinase Rad3^{ATR} et SUMO. La seconde partie de cette section présentera des données non publiées concernant le rôle d'APC/C sur les niveaux intracellulaires du complexe Mus81-Eme1.

La fin du manuscrit comprend une annexe dans laquelle se trouve, entre autres, une revue publiée à *Current opinion in Genetics and Development*, intitulée « Control of structure-specific endonucleases during homologous recombination in eukaryotes ».

Par soucis de clarté et d'équivalence entre des termes français et anglais communément utilisés en laboratoire, j'ai pris le parti d'utiliser certains anglicismes qui seront définis au fil des différentes sections.

CHAPITRE 1

GENERALITE SUR

SCHIZOSACCHAROMYCES *POMBE*

I. *S. POMBE*

1. ORIGINE

La levure *Schizosaccharomyces pombe* (*S. pombe*) a été isolée pour la première fois en 1890 en Afrique Orientale. La description sous forme de croquis fut réalisée en 1893 par le biologiste Allemand Paul Lindner dans une revue d'association des laboratoires de brasserie. Son nom d'espèce, *pombe*, provient de la traduction du mot bière en Swahili. En effet, *S. pombe* servait à la production de la bière de millet. La dénomination *Schizosaccharomyces* dérive des racines grecques *Saccharo* (sucre) et *myces* (champignon) rappelant les caractéristiques du genre *Saccharomyces* : la fermentation et la capacité à former des spores. La racine grec *schizo* (fendre) renvoie à la morphologie caractéristique de cette levure. En croissance végétative, *S. pombe* se présente sous la forme d'un cylindre de 7 μm à 15 μm de long. La cellule mère croît par ses extrémités jusqu'à atteindre une taille de 15 μm et se scinde en deux cellules filles *via* la formation d'un septum, ce qui lui a également valu la dénomination de levure fissipare (**Figure 1**).

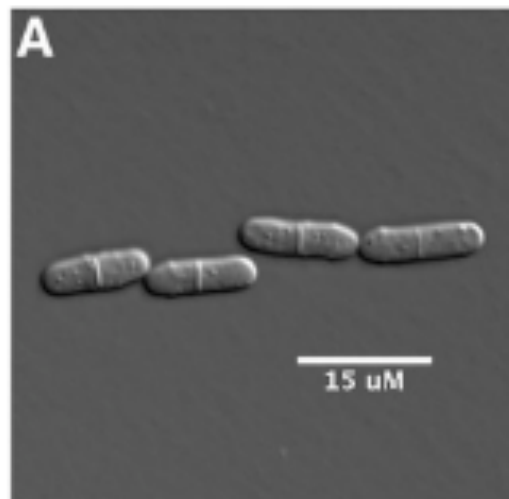


Figure 1 : Photo de *S. pombe*. Photo prise en microscopie à contraste de phase avec des cellules en croissance, présentant un septum. Photo adaptée de C. Hoffman et al. Genetics 2015.

Les souches actuellement utilisées au laboratoire ont été isolées par Urs Leupold, un étudiant Suisse en visite au Carlsberg Laboratory de Copenhague. Il fut initié à l'utilisation de la levure par Øjvind Winge, qui lui proposa l'étude de l'homothallisme chez *S. pombe* comme projet de thèse. Alors que la souche fournie par Winge était stérile, il reçut plus tard un isolat Suisse, issu d'une collection de souches à Delft aux Pays-Bas, dans lequel il identifia deux souches distinctes homothalliques (h90 et h40) et deux souches hétérothalliques (h⁺ et h⁻). Finalement, les souches nommées : 968^{h90}, 972^{h-} et 975^{h+} furent les pionnières de toutes les études génétiques de *S. pombe* et sont encore, celles utilisées partout dans le monde. L'avantage indéniable de *S. pombe* tient dans son caractère isogénique, ce qui augmente considérablement la reproductibilité des données.

2. CLASSIFICATION PHYLOGENETIQUE

Initialement, *S. pombe* fut classée dans le groupe des champignons ascomycètes, en raison de sa capacité à former des asques pendant la méiose. Par la suite, les ascomycètes ont régulièrement été reclassés dans différents clades en fonction de leurs caractères phénotypiques, notamment la forme de l'asque, le types de divisions cellulaires, la présence ou non d'hyphe ou encore la capacité de fermentation de certains sucres. De surcroit, l'évolution des techniques de séquençage a permis de reclasser les différentes espèces en fonction de paramètres moléculaires comme la divergence de certaines séquences d'ADN ou celle des ARN ribosomiaux. Le nouvel arbre phylogénétique qui en découle montre en particulier que *S. pombe* est en fait aussi éloignée de l'homme que l'est la levure bourgeonnante *Saccharomyces cerevisiae* (Kuramae et al., 2006; Sipiczki, 2000).

3. GENOMES COMPARES DE *S. POMBE* ET *S. CEREVISIAE*

Le génome de *S. pombe* a été entièrement séquencé en 2002 et contient environ 13,8 Mb, comparable aux 12,5 Mpb du génome de *S. cerevisiae* (Wood et al., 2002). Bien que de taille comparable, le génome de *S. pombe* est réparti sur trois larges chromosomes (5,7 Mb ; 4,6 Mb ; et 3,5 Mb) comparés aux 16 plus petits chromosomes de *S. cerevisiae* (Figure 2). En effet, le plus grand chromosome de *S. cerevisiae* mesure 1.5 Mb, soit près de la moitié du plus petit

chromosome de *S. pombe* (3.5 Mb). Actuellement, 5064 gènes sont identifiés et annotés comme des cadres ouverts de lecture chez *S. pombe* contre 5821 pour *S. cerevisiae*. Sur l'ensemble des gènes de *S. pombe*, 2372 gènes ont été caractérisés dont 187 ont une homologie avec des gènes impliqués dans les cancers, faisant de *S. pombe* un organisme modèle puissant, permettant de disséquer des processus moléculaires conservés, transposable à l'humain et à l'étiologie de pathologies telles que le cancer.

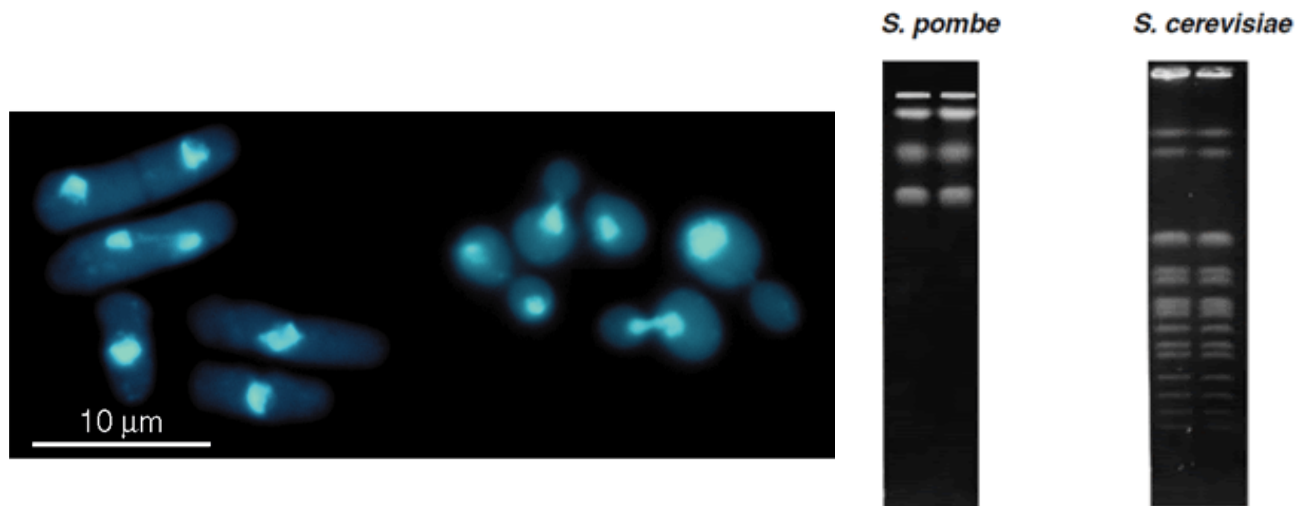


Figure 2 : Comparaison des génomes de *S. pombe* et *S. cerevisiae*. **Panel de gauche.** Coloration au DAPI de cellules vivantes de *S. pombe* (Gauche) et *S. cerevisiae* (Droite). A partir de S. Forsburg. Nat Rev Gen 2001 **Panel de droite.** Électrophorèse en champ pulsé de l'ADN génomique de *S. pombe* (Gauche) et *S. cerevisiae* (Droite). A partir de AES Electrophoresis Society.

4. *S. POMBE* ET DECOUVERTES FONDAMENTALES

Malgré le potentiel de *S. pombe* en tant qu'organisme modèle, son utilisation à travers le monde fut un processus long. Plus de deux décennies après l'isolation des premières souches de *S. pombe*, les laboratoires de Leupold et de Mitchison dominèrent principalement le champ de recherche sur cet organisme, jusqu'au jour où Richard Egel isola et caractérisa des mutants incapables d'effectuer la méiose. Cette découverte marqua l'entrée de *S. pombe* dans l'univers de l'analyse génétique (Egel, 1973). Cette entrée en matière fut le préambule d'une longue histoire dont fait partie, entre autres, l'identification des premiers mutants déficients pour la progression du cycle cellulaire par Paul Nurse. Grâce à des cribles génétiques, il a

identifié de mutants incapables de progresser dans le cycle cellulaire et présentant des phénotypes morphologiques marqués (élongation, raccourcissement). Une fois isolés, les premiers mutants thermo-sensibles, appelés *cdc* (cell division cycle) ont fait l'objet d'une série de publications par Nurse et ses collègues, qui ont amené à la caractérisation des mécanismes moléculaires régissant le cycle cellulaire chez *S. pombe*. L'ensemble de ces découvertes a permis de promouvoir *S. pombe* comme organisme modèle (**Figure 3**) et a valu à Paul Nurse de partager le prix Nobel de Médecine en 2001 avec Leyland Hartwell et Timothy Hunt, respectivement récompensés pour leurs travaux sur l'étude du cycle cellulaire chez *S. cerevisiae* et le Xénope.

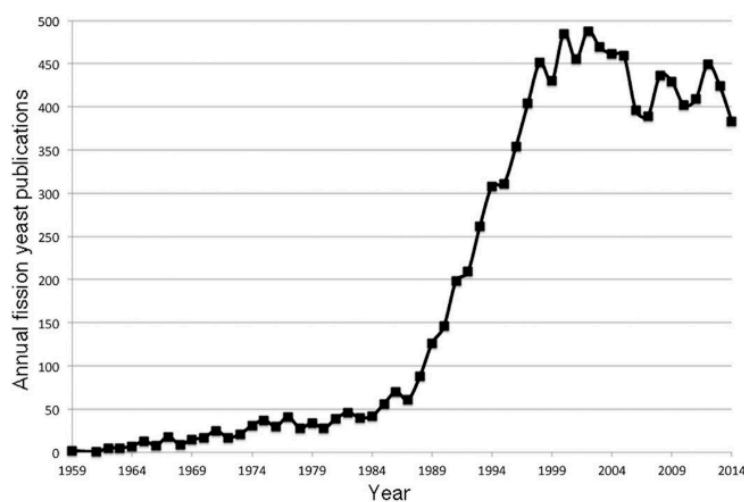


Figure 3 : Nombre de publications avec *S. pombe*. Le nombre de publication par années entre 1959 et 2014 avec *S. pombe* a connu un essor dès les années 80 et continue à l'heure actuelle. A partir de C. Hoffman et al. Genetics 2015

5. CYCLE CELLULAIRE

La levure *S. pombe* présente un génome haploïde dans des conditions de croissance favorable. En condition de carence nutritive, notamment en absence de source d'azote, *S. pombe* sort du cycle cellulaire et entre en phase stationnaire. Cet état n'est pas définitif : en cas de rencontre avec un partenaire sexuel opposé (h+ et h-), les cellules peuvent adhérer entre elles et digérer leurs membranes pour former un zygote diploïde qui va entrer en méiose. Après une phase de réplication de l'ADN et deux phases successives de division cellulaire,

quatre cellules haploïdes seront formées. Enfin, une membrane spécifique se forme autour de chaque noyau pour générer un asque contenant quatre spores au sein d'un ascospore (**Figure 4A**). La méiose contribue au brassage des allèles entre les génomes des cellules favorisant ainsi une diversité génétique permettant une adaptation aux nouvelles conditions environnementales afin de pouvoir survivre. A noter qu'une souche de type sexuel h^{90} est capable de générer un zygote par conjugaison avec une autre souche h^{90} (**Figure 4B**).

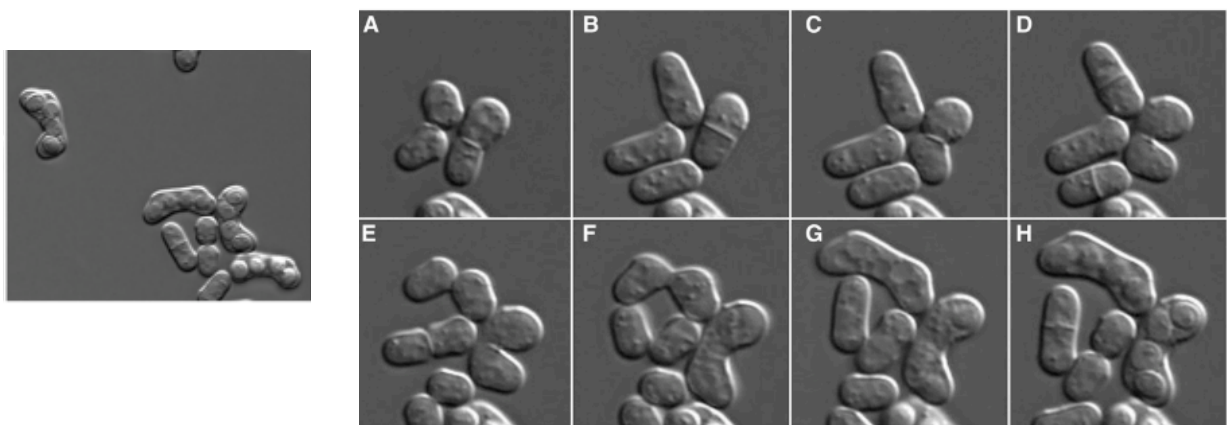


Figure 4 : Développement sexuel de *S. pombe* A. Asques formées par le croisement de deux cellules haploïdes. B. Des cellules de *S. pombe* h^{90} ont été placées sur des blocs d'agar à 30°C et photographiées à différents temps : A. 0 min B. 184 min C. 204 min D. 254 min E. 286 min. F. 334 min. G. 446 min H. 560min. A partir de C. Hoffman et al. Genetics 2015

Si les conditions nutritives redeviennent optimales, *S. pombe* peut rentrer à nouveau dans un cycle cellulaire mitotique ou végétatif. Ce cycle cellulaire chez *S. pombe* dure environ 3 heures, mais peut varier entre 2 heures et 5 heures selon les conditions de culture. Au contraire des cellules humaines, l'ADN de *S. pombe* se réplique très rapidement après la mitose. Ainsi, la phase G1, très courte, est presque concomitante avec la phase S et coïncide avec la présence du septum. En conséquence, les cellules filles naissantes sont d'ores et déjà en phase G2 et contiennent leurs chromosomes entièrement répliqués. Ainsi, la phase G2 représente 70% de la durée du cycle cellulaire contre 10% pour les phases G1/S/M (**Figure 5**). Avant d'entrer dans un nouveau cycle de division, les cellules doivent doubler leur taille. Pour se faire, la cellule croît via l'élongation de ses extrémités. Il existe donc un lien entre la taille des cellules et leur avancement dans le cycle cellulaire. La cellule ne peut passer la transition G2/M que si cette dernière atteint la taille adéquate de 15 μm . Il est à noter que la mitose chez *S. pombe*, n'induit pas de rupture de l'enveloppe nucléaire. A *contrario*, chez *S. cerevisiae* et chez les

mammifères, la division nucléaire s'opère après la rupture de l'enveloppe nucléaire. L'ensemble de ces processus permettent de mettre en lumière des mécanismes de contrôle couplant croissance et cycle cellulaire (Wood and Nurse, 2015).

En somme, l'organisme modèle *S. pombe* a permis des avancées importantes en recherche, en particulier dans la compréhension de la régulation du cycle cellulaire, mais également sur le métabolisme de l'ADN ainsi que sa réparation.

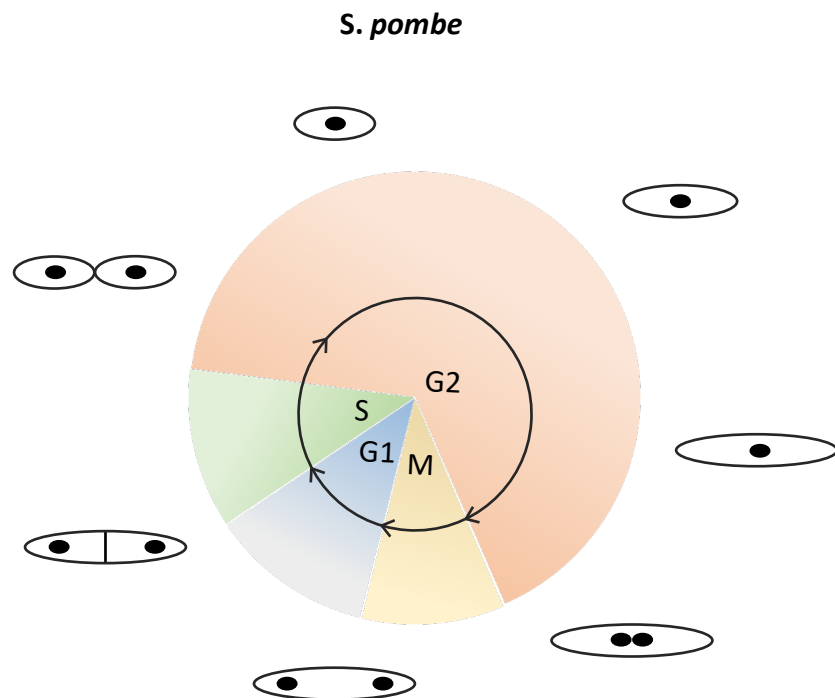


Figure 5 : Cycle cellulaire de *S. pombe*. Dans un milieu riche et en phase exponentielle de croissance, la phase G2 est particulièrement longue chez *S. pombe* et représente à elle seule 70 % du cycle cellulaire.

CHAPITRE 2

CONTROLE DU CYCLE CELLULAIRE

I. GENERALITE SUR LE CYCLE CELLULAIRE

Le cycle cellulaire regroupe l'ensemble des étapes permettant à une cellule mère de se diviser en deux cellules filles génétiquement identiques. Il se divise en plusieurs phases : d'abord, la cellule prépare la duplication de son génome (Gap 1 ou G1) puis initie la synthèse (Phase S) d'une copie du génome par un mécanisme appelé réplication. S'en suit une phase de préparation à la ségrégation des chromosomes et à la division cellulaire (Gap2 ou G2), deux processus qui aboutissent à la génération des deux cellules filles lors de la mitose (Phase M). L'ensemble des phases G1, S et G2 est aussi nommée l'interphase. La progression du cycle cellulaire est orchestrée par les protéines régulatrices CDK, (Cyclin Dependent Kinases) conservées de la levure à l'homme. En s'associant à des cyclines spécifiques de chaque phase du cycle cellulaire, les complexes CDK-Cycline permettent la progression unidirectionnelle du cycle cellulaire. Les changements d'activité de ces complexes dépendent de **1)** l'oscillation des niveaux de cyclines, à travers leur synthèse et leur dégradation au cours du cycle **2)** l'association combinatoire des CDKs avec les cyclines, définissant une spécificité de substrats, requis pour les différentes transitions des phases du cycle cellulaire (**Figure 6**). A titre d'exemple, chez l'homme, les complexes CDK4/6-Cycline D et CDK2-Cycline E/A coordonnent l'interphase alors que CDK1-Cycline B permet l'entrée et la progression en mitose. De manière remarquable, chez les mammifères, seule CDK1 est essentielle à la progression du cycle cellulaire. Chez *S. pombe*, le cycle cellulaire est contrôlé par une seule CDK : Cdc2, requise pour les transitions G1/S et G2/M. L'association de Cdc2 avec les cyclines Cig2 ou Cdc13 déclenche respectivement la réplication de l'ADN et la mitose. Deux autres cyclines, Cig1 et Puc1 ont un rôle mineur en G1. De manière remarquable, une protéine chimère Cdc13-Cdc2 peut se substituer à la présence des quatre complexes CDK-Cycline agissant pendant le cycle mitotique et des six complexes agissant pendant le cycle méiotique (Coudreuse and Nurse, 2010; Gutiérrez-Escribano and Nurse, 2015; Swaffer et al., 2016). En somme, un **premier** niveau de régulation de la progression du cycle cellulaire est médié par l'alternance d'interaction entre les CDK et les Cyclines. Il existe en plus un **second** niveau de régulation par la modification des CDK par des modifications post-traductionnelles.

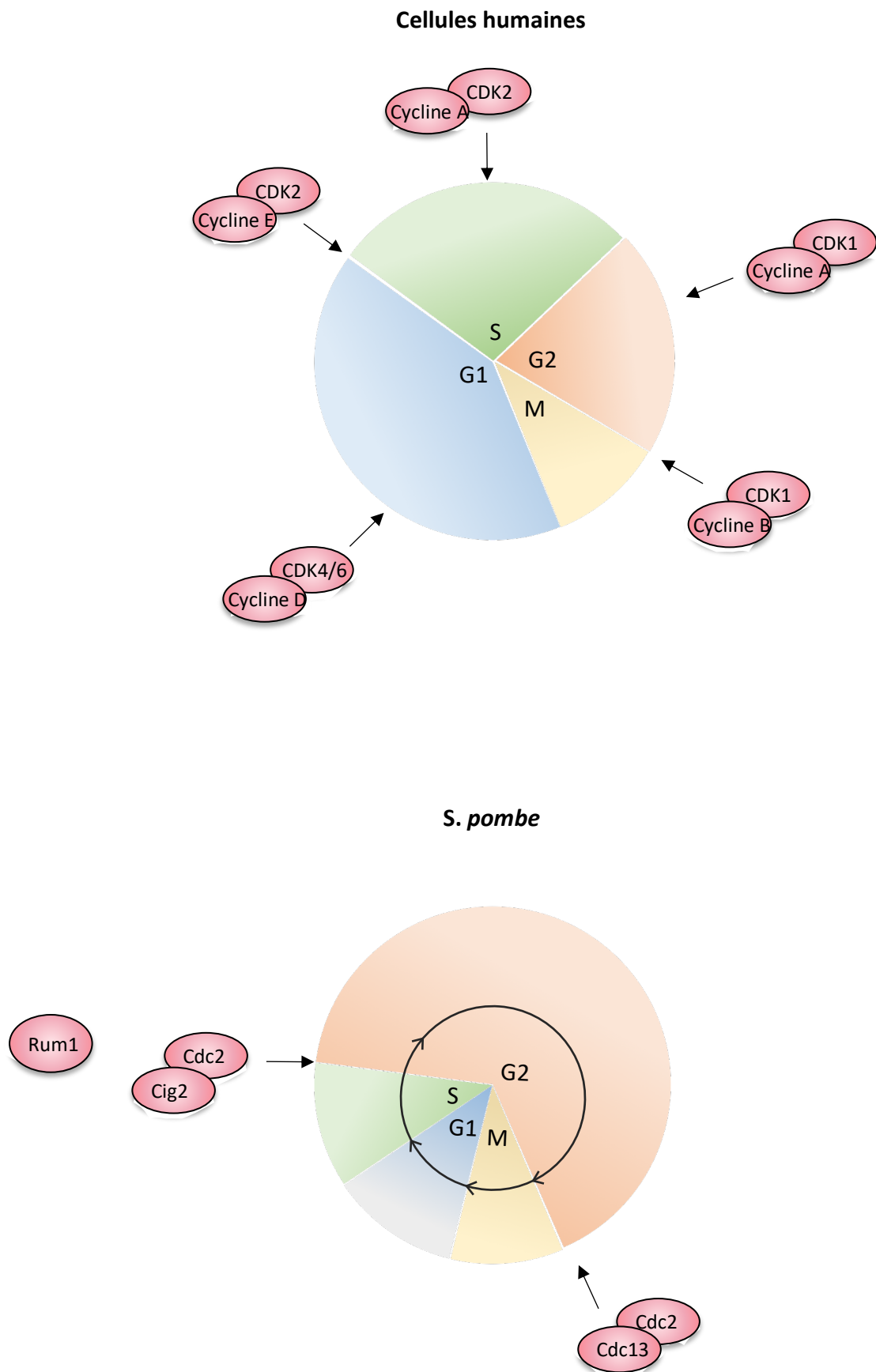


Figure 6 : Les acteurs clés du cycle cellulaire. La présence des différents complexes cycline-CDK promeuvent les différentes transitions du cycle cellulaire.

Les kinases CAK (CDK Activating Kinase) phosphorylent la sous-unité CDK du complexe CDK-Cycline pour l'activer et permettre la progression du cycle cellulaire. Ce mécanisme de régulation a tout d'abord été observé chez *S. pombe*, où la phosphorylation de la thréonine 167 était requise pour l'activité de Cdc2^{CDK1} (Lee et al., 1999; L.Gould et al., 1991). Il existe deux CAKs chez *S. pombe* : le complexe Mcs6/Mcs2/Pmh1 et Csk1 qui activent Cdc2 (Lee et al., 1999). Au contraire des CAKs, d'autres kinases peuvent également phosphoryler les CDK mais impacter négativement leur activité. Par exemple, chez *S. pombe* comme chez l'humain, la phosphorylation de CDK1^{Cdc2} sur les résidus Thréonine 14 et Tyrosine 15 par les kinases Wee1 et Mik1^{Myt1} est inhibitrice et empêche la transition G2/M (Liu et al., 1997; Lundgren et al., 1991; Mueller et al., 1995) (**Figure 7**). Ce mécanisme de contrôle négatif est réversible par l'action de phosphatase de la famille de CDC25, dont l'expression et l'activité sont contrôlées au cours du cycle cellulaire (Millar et al., 1991; Russell and Nurse, 1986).

Enfin, Il existe un **troisième** niveau de régulation médié par des inhibiteurs qui peuvent agir directement sur la sous-unité CDK. Ces inhibiteurs sont des protéines de la famille des CKIs (CDK Inhibitors). Il existe principalement deux familles de CKIs : la famille des Ink4 qui inhibe les monomères de CDK4 et CDK6 et la famille de CIP/KIP qui inhibe l'activité de CDK1 et CDK2 associé à leurs cyclines. Chez *S. pombe*, la protéine Rum1 se fixe au complexe Cdc2 et Cig2 pour empêcher la transition G1/S (Benito et al., 1998).

A travers ces différents mécanismes, l'activité des CDK est minutieusement contrôlée favorisant ainsi une progression unidirectionnelle du cycle cellulaire. La transition entre chacune des phases est sous le contrôle des mécanismes de surveillance ou « checkpoint ». Ces points de contrôles sont capables de bloquer la progression du cycle cellulaire en modulant l'activité des CDKs et permettre, entre autres, d'initier les mécanismes de réparation de la molécule d'ADN.

Cellules humaines



S. pombe

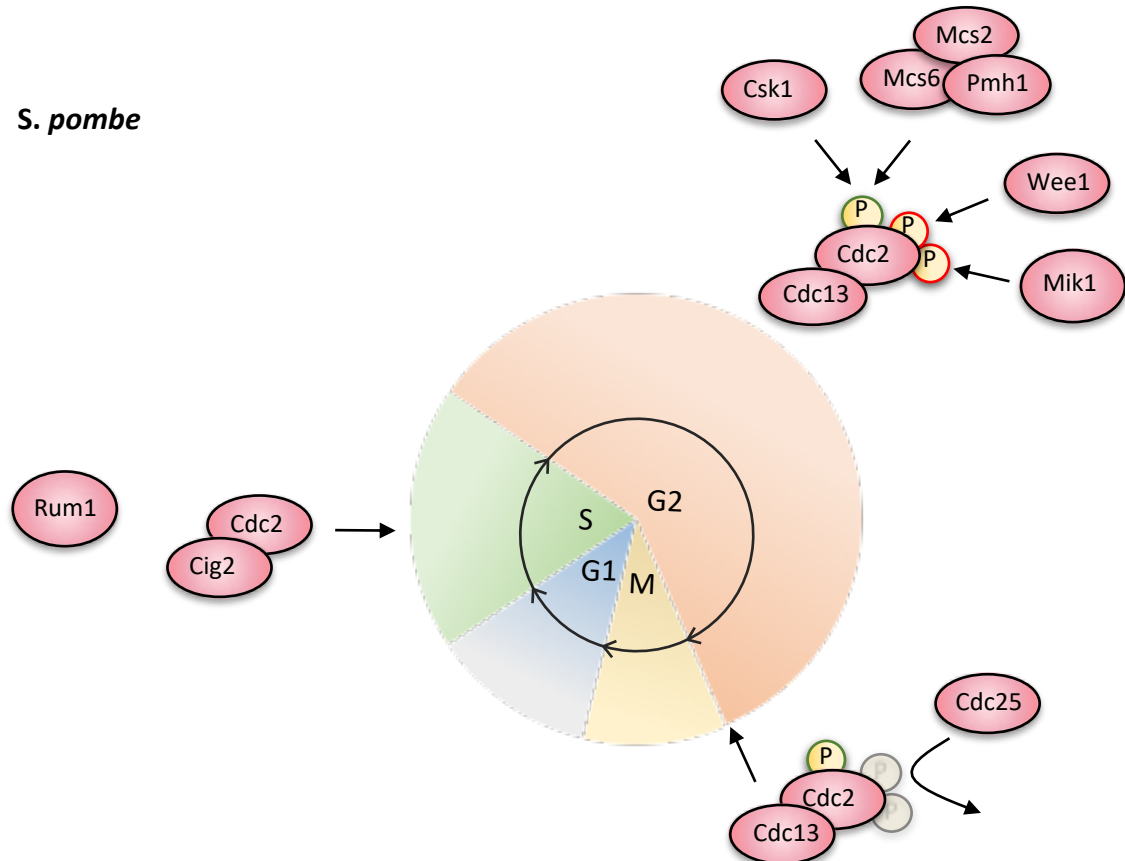


Figure 7 : Régulation du complexe cycline-CDK dans les cellules humaines et *S. pombe*. Pour les cellules humaines, n'est représenté que la régulation du complexe CDK1-Cycline B

II. LES POINTS DE CONTROLE

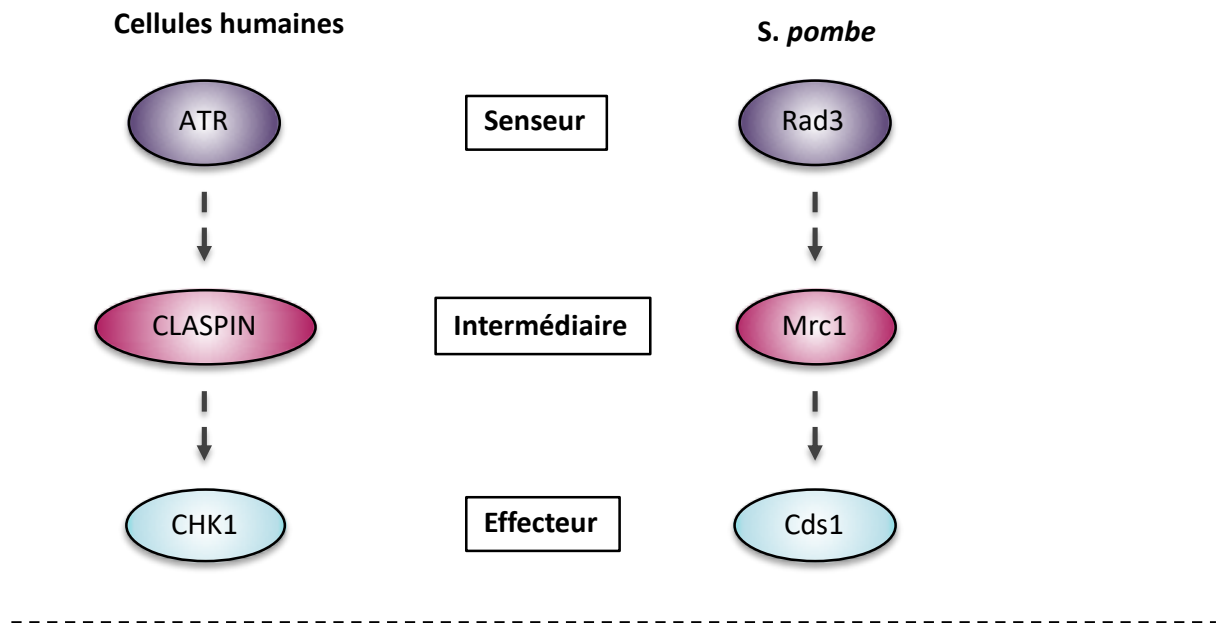
Un crible génétique réalisé par L. Hartwell visant à identifier des mutants capables d'entrer en mitose en présence de rayonnement ionisant a amené à l'identification de *rad9* comme un gène important pour l'arrêt du cycle cellulaire (Weinert and Hartwell, 1988). Ainsi, il fut identifié comme le premier gène impliqué dans l'arrêt du cycle cellulaire en réponse aux dommages à l'ADN et L. Hartwell proposa la notion de point de contrôle ou checkpoint. Depuis, de nombreux autres gènes *rad* (*radiation sensitive*) ont été découverts et caractérisés comme des acteurs du contrôle du cycle cellulaire.

Les mécanismes d'activation du checkpoint sont cruciaux pour le maintien de la stabilité du génome et ont été conservés au cours de l'évolution de la levure à l'homme (**Tableau 1**). Les points de contrôles des dommages à l'ADN consistent en plusieurs sous-branches : le checkpoint G1/S, le checkpoint intra-S, le checkpoint G2/M et le checkpoint de l'assemblage du fuseau mitotique en lien avec les transitions qu'ils contrôlent. Tous les checkpoints ont un patron similaire, consistant en la détection de l'obstacle (dommage à l'ADN, complexe ADN-protéine ...) par des protéines senseurs qui vont induire l'activation du checkpoint. Ces protéines vont transduire le signal par des médiateurs qui vont activer des effecteurs spécifiques pour aboutir à l'arrêt du cycle cellulaire et la réparation de l'ADN (**Figure 8**). Si l'ADN peut être réparé, le checkpoint est ensuite éteint et le cycle cellulaire peut reprendre. Les expériences réalisées chez levure *S. pombe* ont été pionnières dans la l'étude des mécanismes d'activation des checkpoints et seront présentés dans les sections suivantes.

Hs	Sc	Sp	Fonctions chez <i>S. pombe</i>
ATM	Tel1	Tel1	Tel1 est recrutée sur les CDBs de façon MRN dépendante. ATM phosphoryle H2AX et plusieurs autres protéines dont Chk1.
CHK2	Rad53	Cds1	Kinase effectrice activée par Rad3. Elle est impliquée dans le point de contrôle intra-S.
ATR	Mec1	Rad3	Rad3 forme un complexe avec Rad26. Le complexe est activé par l'ADN simple brin recouvert par RPA. Chez <i>S. pombe</i> , il est la kinase régulatrice clé dans l'activation des points de contrôles intra-S et G2/M.
ATRIP	Ddc2	Rad26	Rad26 est le partenaire de Rad3 dans la réponse aux dommages à l'ADN et au stress réplicatif.
ETAA1	-	-	-
CHK1	Chk2	Chk1	Kinase effectrice activée par Rad3. Impliquée dans l'activation des points de contrôle cellulaire G2/M.
MRN	MRX	MRN	MRE11-RAD50-NBS1/Xrs2. Senseur de cassures double brins, le complexe MRN agit en amont de Tel1 qu'il active. Il Interagit avec Tel1 via Nbs1.
53BP1	Rad9	Crb2	Médiateur de la réponse aux dommages à l'ADN. Impliquée dans l'activation de Chk1
TopBP1	Dpb11	Rad4	Forme un complexe avec 9-1-1 et Rad17 sur les fourches de réplication bloquées. Pourrait participer à l'activation de Rad3.
RPA	RPA	RPA	RPA empêche la formation de structure secondaire d'ADN et protège l'ADN simple brin d'attaque nucléasique. De plus, permet à Rad3-Rad26 d'être recruté sur l'ADN simple brin.
RAD9	Ddc1	Rad9	Le complexe 9-1-1 facilite le recrutement de Rad4. Il est recruté au niveau de la fourche de réplication.
RAD1	Rad17	Rad1	
HUS1	Mec3	Hus1	
RAD17	Rad24	Rad17	Rad17 facilite le recrutement du complexe 9-1-1.
CDK1	Cdc28	Cdc2	Kinase cycline-dépendante. Associée à la Cdc13, elle régule la progression du cycle cellulaire.
CDC25	Mih1	Cdc25	Phosphatase qui cible CDK pour promouvoir la progression du cycle cellulaire et l'entrée en mitose.
WEE1	Swe1	Wee1/Mik1	Phosphatase qui cible CDK pour promouvoir progression du cycle cellulaire et l'entrée en mitose.

Tableau 1. Orthologues des protéines humaines clés impliquées dans les points de contrôles chez *S. cerevisiae* et *S. pombe*. Hs : *Homo sapiens*, Sc : *Saccharomyces cerevisiae*, Sp : *Schizosaccharomyces pombe*

Intra-S checkpoint



DNA damage checkpoint G2/M

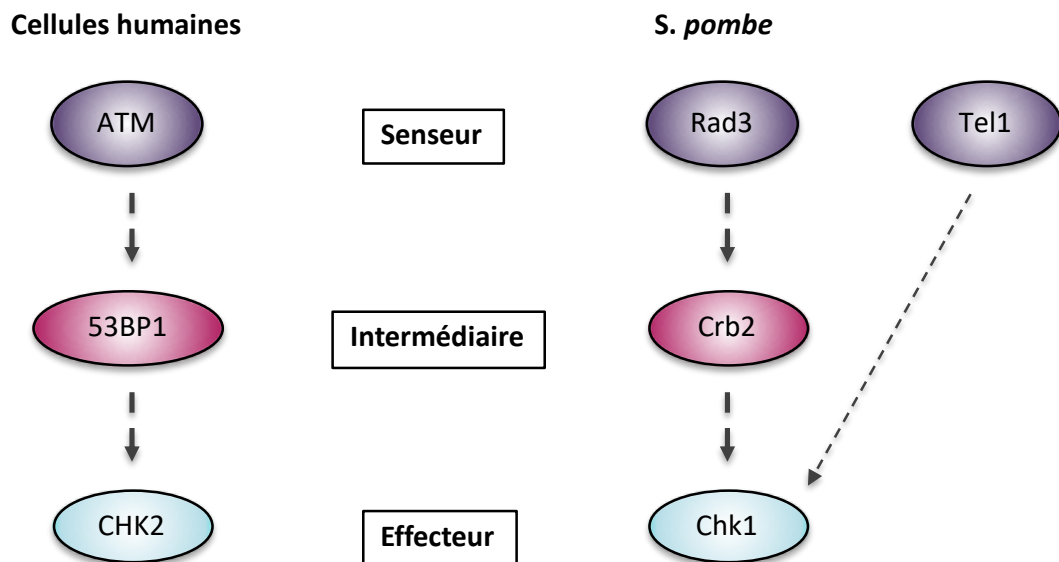


Figure 8. Vue générale des points de contrôles intra-S et G2/M dans les cellules humaines et chez *S. pombe*.

1. CHECKPOINT EN G1

Pendant la phase G1, la cellule intègre son environnement cellulaire et sa taille pour s'assurer que les conditions sont réunies pour entreprendre la duplication de son génome. De ce fait, un passage précoce en phase S peut s'avérer délétère car les cellules devront compléter un cycle cellulaire entier dans un environnement inadapté. De plus, la réplication de l'ADN se doit d'être la plus fidèle possible afin de garantir la transmission d'un génome inchangé aux générations suivantes. Il est donc essentiel que la cellule possède un checkpoint G1/S. Comme indiqué dans le chapitre 1, en conditions favorables de croissance la phase G1 de *S. pombe* est très courte, il est donc difficile d'étudier les mécanismes d'activation du checkpoint G1/S. Le groupe de Boye et collaborateurs ont malgré cela réussi à mettre en évidence une régulation de la transition G1/S après exposition des cellules à un rayonnement UV-C (Bøe et al., 2012; Nilssen et al., 2003; Synnes et al., 2002; Tvegård et al., 2007). Dans ce contexte, ce contrôle s'appuie sur deux voies interdépendantes incluant la kinase Gcn2 et la réparation des dommages suite aux rayonnements UV-C pour retarder l'entrée en phase S (Tvegård et al., 2007). Dans l'ensemble, ce point de contrôle permet de retarder la formation de facteurs impliqués dans l'initiation de la réplication après des rayonnements UV-C et d'éviter de rentrer en phase S avec de l'ADN endommagé, cause d'instabilité génomique. Les mécanismes exacts de ce contrôle restent cependant encore à déterminer.

2. CHECKPOINT INTRA-S

Le défi pour chaque cellule en prolifération est de maintenir la stabilité de son génome tout en garantissant une duplication à l'identique des chromosomes avant leur ségrégation en mitose.

Ainsi, la réplication fidèle de l'ADN est un processus fondamental dont toute perturbation, communément appelée stress réplcatif, constitue un risque pour la stabilité du génome. Ce stress réplcatif peut être d'origine endogène, lié dans ce cas au métabolisme cellulaire, ou exogène résultant de l'exposition de la cellule à des agents génotoxiques chimiques ou physiques. La stabilité du génome en cours de duplication repose sur un mécanisme de surveillance appelé point de contrôle de la phase S qui permet : **1)** l'arrêt de la progression

du cycle cellulaire **2**) de prévenir l'initiation de nouvelles origines de réplication **3**) de stabiliser et protéger la fourche de réplication **4**) le redémarrage de la fourche de réplication après que l'obstacle ait été géré.

La protéine centrale dans ce processus est la protéine Rad3^{ATR/Mec1} appartenant à la famille conservée des PI3K (Phosphatidyl Inositol Kinase) (Bentley et al., 1996; Kato and Ogawa, 1994). Son activation est essentielle pour la mise en place du checkpoint.

2.1 Activation d'ATR^{Mec1/Rad3} en réponse à un stress réplcatif chez *S. pombe*

Un blocage de la fourche de réplication peut entraîner un découplage entre les hélicases (complexe MCM) et les polymérases réplcatives, conduisant à une accumulation d'ADN simple brin. L'ADN simple brin est reconnues et protégées par la protéine RPA qui se lie spécifiquement à l'ADN simple brin. Chez les mammifères et *S. cerevisiae*, la formation de ce complexe nucléoprotéique entraîne le recrutement de la protéine ATRIP^{Ddc2} laquelle interagit directement avec la kinase ATR^{Mec1} (Cortez et al., 2001; Edwards et al., 1999; Paciotti et al., 2000) et permet son recrutement (Rouse and Jackson, 2002; Zou and Elledge, 2003). Chez *S. pombe*, cette accumulation d'ADN simple brin est également un signal pour l'activation de Rad3^{ATR}, bien que l'interaction entre Rad26^{ATRIP} et RPA n'ait pas été formellement montrée. Cependant, la conservation des mécanismes d'activation du checkpoint laisse présager d'une conservation de cette interaction chez *S. pombe*.

La zone de transition entre le simple brin et le double brin va contribuer aux recrutements de facteurs important pour l'activation du checkpoint. Cette transition est reconnue par la protéine Rad17^{RFC} (Zou et al., 2003). Cette dernière va recruter le complexe 9-1-1 (Rad9-Hus1-Rad1) en association avec Rad4^{TOPBP1} (Bermudez et al., 2003). La protéine Rad4^{TOPBP1} possède un domaine d'activation (AAD) qui va permettre de stimuler l'activité de Rad3^{ATR}, entraînant la transduction du signal aux médiateurs et effecteurs du checkpoint (**Figure 9**).

Bien que les moyens mis en place au cours de l'évolution pour activer ATR sont différents, son activation reste déterminante pour la mise en place du checkpoint.

Chez les mammifères, il existe deux protéines capables de stimuler l'activité d'ATR : TOPBP1 et la protéine ETAA1 qui interagit avec RPA et stimule l'activité d'ATR indépendamment de

TOPBP1. Des analyses de phosphoprotéomique suggèrent que TOPBP1 et ETAA1 activent des voies de signalisation différentes et procurent ainsi une spécificité de substrats. TOPBP1 est le principal activateur d'ATR en réponse aux stress réplcatifs ou aux dommages à l'ADN, alors que ETAA1 régule principalement la phosphorylation de protéines mitotiques par ATR (Bass and Cortez, 2019). De manière remarquable, la perte simultanée de TOPBP1 et ETAA1 entraîne une létalité synthétique et abolit totalement l'activation d'ATR (Bass et al., 2016; Haahr et al., 2016).

Chez *S. cerevisiae*, en plus de Dpb11^{TOPBP1} (Navadgi-Patil and Burgers, 2008), l'hélicase-nucléase Dna2 (Kumar and Burgers, 2013) et la protéine Ddc1^{Rad9} (Majka et al., 2006; Navadgi-Patil and Burgers, 2009) stimulent l'activité de Mec1^{ATR} en phase S. Récemment, il a été montré que Ddc2^{ATRIP} a également un rôle d'activateur de l'activité kinase de Mec1^{ATR} indépendamment des autres activateurs de Mec1^{ATR} suggérant que Mec1^{ATR} peut aussi être activée dès sa localisation à la lésion (Biswas et al., 2019).

Dans la levure fissipare *S. pombe*, les fonctions de la protéine Rad4^{TOPBP1/Dpb11} reste encore en débat. Rad4^{TOPBP1} possède également un domaine AAD (Lin et al., 2012) mais ce dernier ne semble avoir qu'un rôle mineur dans l'activation de Rad3. Ce domaine exercerait principalement un rôle de protéine plateforme pour l'activation d'effecteurs du checkpoint (Yue et al., 2014). Si l'activation de Rad3^{ATR/Mec1} est l'événement initiateur du checkpoint de phase S, ce sont les phosphorylations concomitantes de l'intermédiaire Mrc1 et de l'effecteur Cds1 qui finalisent la mise place du checkpoint.

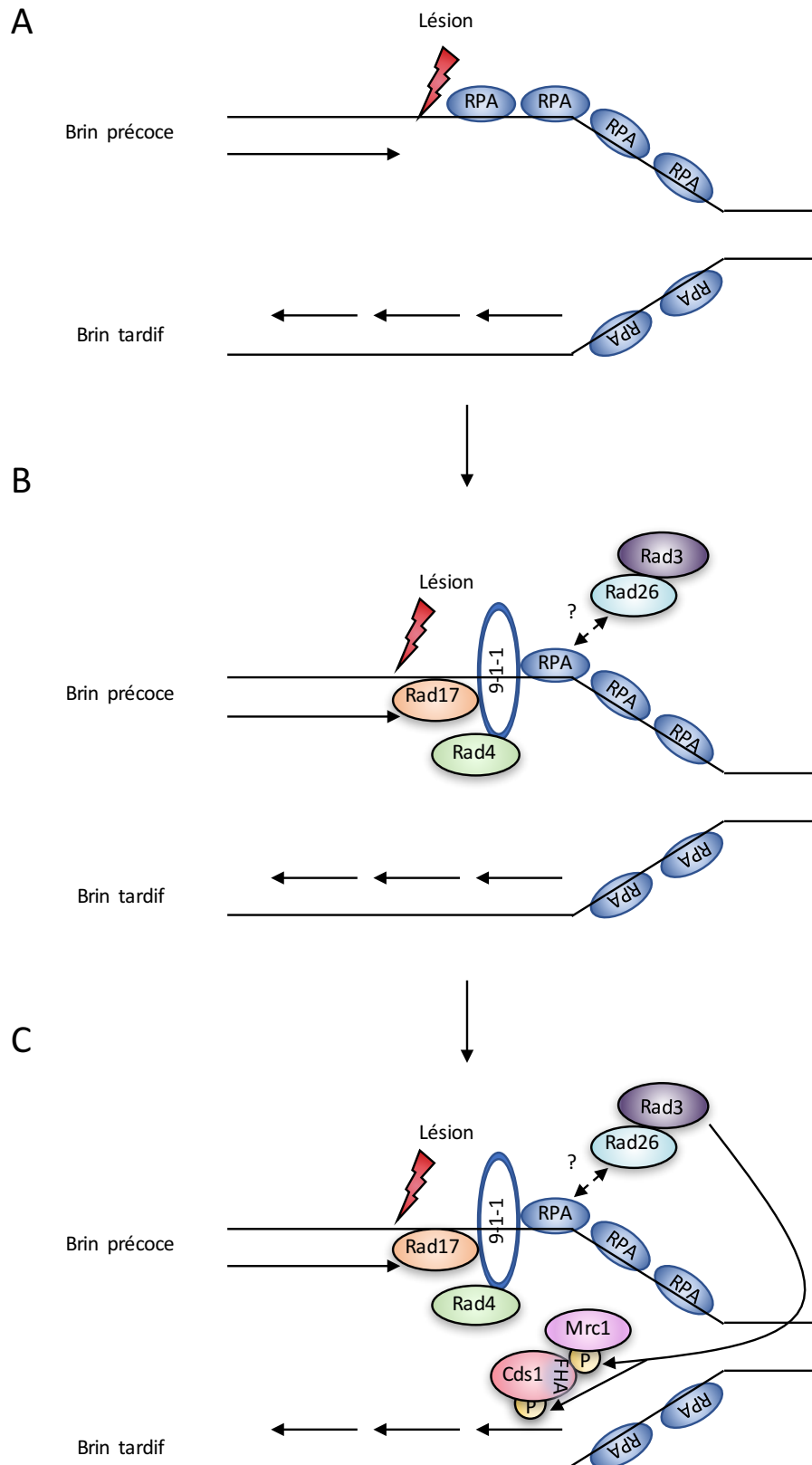


Figure 9. Mécanisme d'activation du checkpoint intra-S chez *S. pombe*. A. La lésion entraîne l'accumulation d'ADN simple brin et la fixation de RPA ce qui permet B. le recrutement séquentiel des facteurs du checkpoint dont Rad3-Rad26, amenant à C. L'activation complète du checkpoint.

2.2 Activation et fonctions de Cds1

Chez *S. pombe* l'activation de Rad3 permet de phosphoryler en cascade Mrc1, elle-même requis pour la phosphorylation de Cds1 par Rad3 qui permet l'activation de Cds1. Au moins *in vitro*, l'intermédiaire Mrc1 est recruté par le complexe de protection de la fourche Swi1-Swi3 (Tanaka et al., 2010)(Noguchi et al., 2003, 2004). Mrc1 est par la suite phosphorylé sur au moins six résidues S et T au niveau de motifs SQ et TQ par Rad3, ce qui permet le recrutement de monomères Cds1 inactifs. C'est *via* le domaine FHA (ForkHead-Associated), qui permet l'interaction avec des protéines phosphorylées que Cds1 interagit avec la protéine Mrc1 phosphorylée. La phosphorylation de Cds1 sur la T11 par Rad3 va induire l'homodimérisation de Cds1 laquelle entraîne son auto-phosphorylation et son activation (Xu et al., 2006) (Figure 10A).

La phosphorylation et l'activation de Cds1 vont engendrer de profonds changements dans la physiologie de la cellule.

- En présence de dommage à l'ADN, l'activation de Cds1 par le checkpoint intra-S va contribuer à l'inhibition de la phosphatase Cdc25 et à l'arrêt du cycle cellulaire (Furnari et al., 1999).
- Cds1 phosphoryle et inactive Nrm1, un répresseur transcriptionnel de certains gènes de réparation de l'ADN et de la transition G1/S. Cds1 contribue également à l'augmentation d'expression de Mik1 ce qui restreint le passage G2/M (Bruin et al., 2008; Dutta et al., 2008) (Figure 10B).
- Cds1 stabilise la fourche bloquée suite à un stress réplcatif en empêchant son remaniement et son effondrement (Boddy et al., 2000a; Hu et al., 2012; Kai et al., 2005) (Plus de détails dans le chapitre 4 partie III.2 fourche bloquée). Ces mécanismes sont à mettre en perspective avec les récents travaux de l'équipe de P. Zegerman indiquant que chez *S. cerevisiae*, le checkpoint intra-S permettrait à la fourche bloquée d'attendre l'arrivée d'une fourche convergente voisine pour réparer la lésion (Morafraila et al., 2019).

Le checkpoint intra-S contribue à ralentir la progression du cycle cellulaire afin de permettre la duplication complète et fidèle de la molécule d'ADN. Ce point de passage est un garant du maintien de la stabilité du génome. Une fois la phase S terminée, la cellule entre dans la phase G2 avec son ADN répliqué.

3. CHECKPOINT G2/M

Lors de la phase G2 du cycle cellulaire, la cellule se prépare à la ségrégation des chromosomes. Si des dommages se produisent en G2, ils peuvent ainsi entraver la ségrégation correcte des chromosomes. Une des lésions les plus toxiques pour la cellule est la cassure double brin d'ADN qui, si non réparé, peut amener à la perte d'un bras chromosomique pendant la ségrégation des chromosomes. Il est donc essentiel que la cellule détecte et répare cette lésion. Chez les mammifères, l'initiation du checkpoint est divisée en deux parties. Une première reposant sur ATR en cas de stress réplcatif (voir chapitre 2 partie II.2.1 Activation d'ATRMec1/Rad3 en réponse à un stress réplcatif chez *S. pombe*) et une deuxième qui s'appuie sur la protéine ATM en cas de cassure double brin (ou Double Strand Break, DSB). Chez *S. cerevisiae* et *S. pombe*, la protéine ATM^{Tel1} est conservée mais son rôle est minoritaire dans la réponse au cassure double brin, l'initiation du checkpoint s'effectuant essentiellement par l'activation de Rad3^{Mec1}.

3.1 Activation de Rad3 et Tel1 en réponse à une cassure double brin chez *S. pombe*

Tout comme le checkpoint intra-S, c'est un complexe ADN simple brin-RPA qui permet le recrutement de Rad3 à la cassure (**Figure 11**). L'ADN simple brin est généré par un processus actif qui dégrade spécifiquement le brin d'ADN possédant une extrémité 5' phosphate au niveau de la cassure. Ce processus appelé résection conduit à la formation d'un bras simple brin avec une extrémité 3'OH qui sera reconnu et lié par la protéine RPA.

La résection est catalysée par le complexe MRN (Mre11-Rad50-Nbs1) à l'extrémité de la cassure double brin (Plus de détails dans le chapitre 3 partie II.1 résection). Le complexe MRN est important pour le recrutement de certains acteurs du checkpoint à la lésion. D'une part, en générant de l'ADN simple brin il va permettre l'activation de Rad3 selon le même principe que celui décrit précédemment dans le cadre du stress réplcatif. D'autre part, il va recruter Tel1^{ATM} via une interaction directe entre le motif d'interaction protéine FxF/Y) de sa sous-unité Nbs1 et les domaines HEAT (un motif structurel provenant de quatre protéines portant ce motif : l'huntingtine (H), le facteur d'élongation eucaryotique 2 (E), la protéine phosphatase

2A (A) et la kinase Tor1 (T)) de Tel1^{ATM} (You et al., 2005). Il a été également proposé que les sous-unité Mre11 et Rad50 interagissent directement avec Tel1^{ATM} et stimulent par ce biais son activité kinase (Limbo et al., 2018). Bien que la kinase Tel1 n'ait qu'un rôle mineur dans la signalisation de la cassure double brin, elle devient importante en absence d'une autre protéine clé de la résection Ctp1 (Limbo et al., 2018) (Plus de détails dans le chapitre 3 partie II.1 résection). L'activation de Tel1^{ATM} et de Rad3^{ATR} va permettre de générer un environnement chromatinien propice au recrutement de la protéine Crb2 ; le médiateur du checkpoint G2/M.

3.2 Activation et fonctions de Crb2

Le recrutement de Crb2 est médié par des modifications épigénétiques de la chromatine et des interactions protéines-protéines. La diméthylation de la lysine 20 de l'histone H4 (H4K20), ubiquitaire dans le génome, est exposée hors du nucléosome lors de la déformation induite par la cassure (Greeson et al., 2008; Sanders et al., 2004). De plus, les kinases Tel1 et Rad3 phosphorylent l'histone H2A (γH2A) au voisinage de la cassure (Nakamura et al., 2004). La reconnaissance de H4K20me2 et de γH2A par les domaines, respectivement TUDOR et BRCT, de Crb2 participe à son recrutement. Enfin, le recrutement de Rad4^{TOPBP1} suite aux dommages à l'ADN (voir chapitre 2 partie II.2.1 Activation d'ATRMec1/Rad3 en réponse à un stress réplcatif chez *S. pombe*) va engendrer celui de Crb2 (Furuya et al., 2004; Qu et al., 2013). Les domaines BRCT (BRCA1 C-terminal, impliqué dans la reconnaissance de protéines phosphorylées) de Rad4 vont reconnaître la forme phosphorylée par Cdc2^{CDK1} de Crb2 (Furuya et al., 2004; Qu et al., 2013). Ainsi, c'est la conjonction des modifications épigénétiques de la chromatine et de la présence de Rad4 qui permet le recrutement de Crb2 (Du et al., 2006). Il a par ailleurs été montré qu'aux extrémités des chromosomes, la structure à l'échelle de l'ADN est comparable à celle retrouvée au niveau d'une cassure double brin mais n'active pas de checkpoint. Cette dichotomie s'explique par l'absence de H4K20me2 dans les régions télomériques (Carneiro et al., 2010), démontrant la nécessité de combinaison de ces signaux afin de permettre le recrutement et l'activation de l'effecteur majeur du checkpoint G2/M : Chk1 (Figure 11).

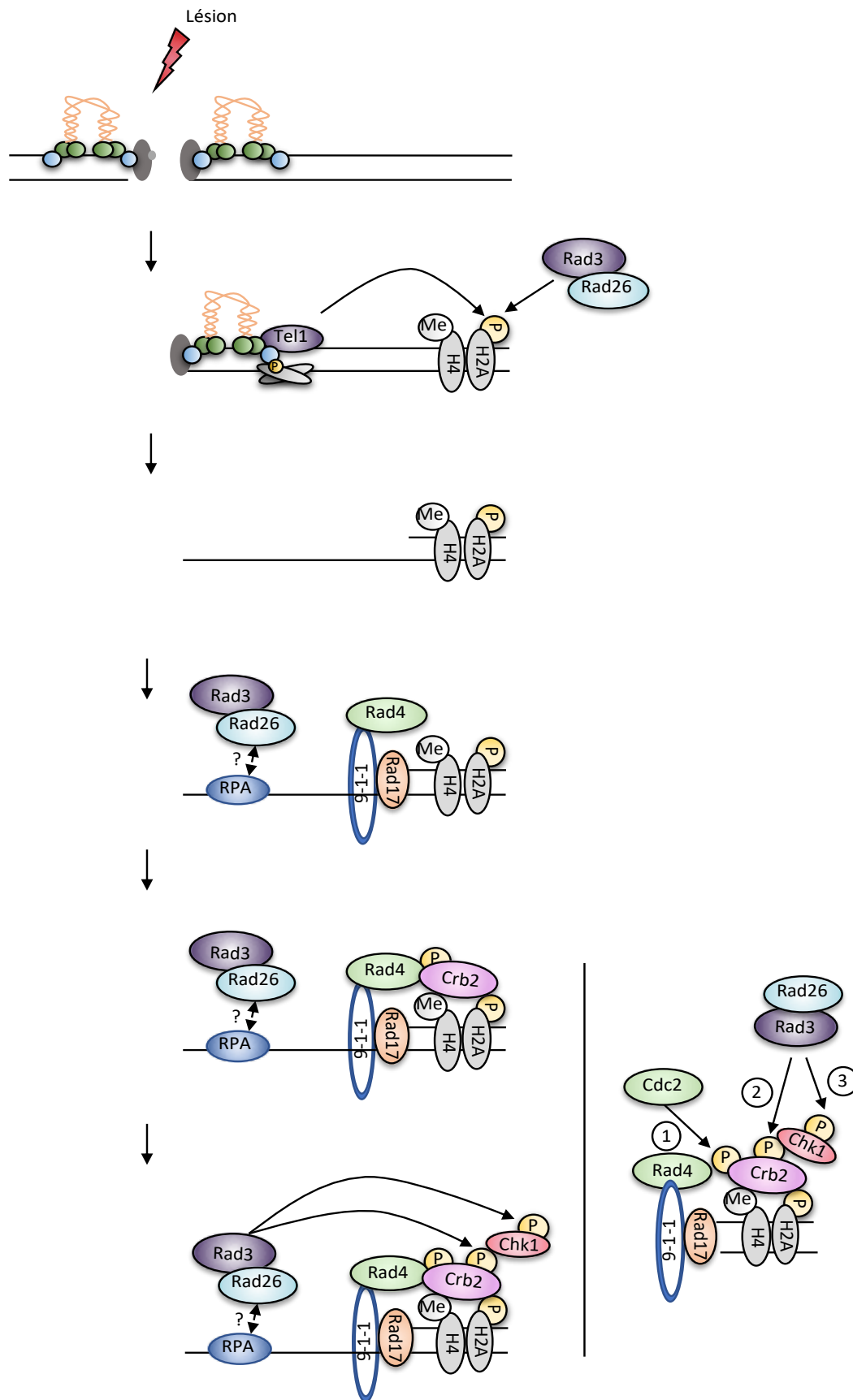


Figure 11. Activation du checkpoint G2/M après une cassure double brin d'ADN chez *S. pombe*. L'activation de Rad3 amène à l'activation de Chk1 par l'intermédiaire de Crb2 mettant en jeu une cascade de phosphorylations et d'interactions.

3.3 Activation et fonctions de Chk1

Chez *S. pombe* le médiateur Crb2 est phosphorylé par Rad3 sur de multiples résidus (S/TQ). La phosphorylation des résidus T73 et S80 est importante pour renforcer l'interaction avec l'effecteur Chk1, et permettre son recrutement à la lésion. Au contraire de Cds1, Chk1 ne possède pas de domaine FHA pour promouvoir son interaction avec des protéines phosphorylées. Les régions N-terminale et C-terminale de Chk1 sont requises pour son interaction phospho-dépendante avec Crb2, mais les détails moléculaires ne sont pas encore connus (Qu et al., 2012). De manière intéressante, le recrutement phospho-dépendant de Chk1 à la lésion promeut sa phosphorylation par Rad3 qui permet de lever une interaction intramoléculaire inhibitrice de Chk1 (Emptage et al., 2017; Palermo et al., 2008). Nous ne savons pas à l'heure actuelle si ce changement conformationnel suffit à lui seul ou s'il nécessite l'intervention de co-facteur pour le stabiliser. Une fois phosphorylée, Chk1 va diffuser hors de la cassure et remplir ses fonctions d'effecteur du checkpoint (**Figure 12**).

L'activation de Chk1 permet d'arrêter la progression du cycle cellulaire de deux manières.

- Chk1 va phosphoryler Cdc25 et créer ainsi un site de liaison pour la protéine 14-3-3, qui va séquestrer Cdc25 et empêcher son activation par Cdc2.
- Chk1 va stabiliser la kinase Wee1 qui va maintenir Cdc2 dans un état inactif (Furnari et al., 1999; Raleigh and O'Connell, 2000).
- Chk1 va avoir un effet sur le transcriptome en phosphorylant la sous-unité Cdc10 du complexe MBF et ainsi, réprimer l'expression de gènes impliqués dans la transition G1/S pour éviter de démarrer le programme de réplication avec de l'ADN endommagé (Ivanova et al., 2013).

Une fois le checkpoint activé, la progression du cycle cellulaire est suspendue. En parallèle, les mécanismes de réparation de la lésion vont être mis en place pour restaurer la séquence d'ADN initiale.

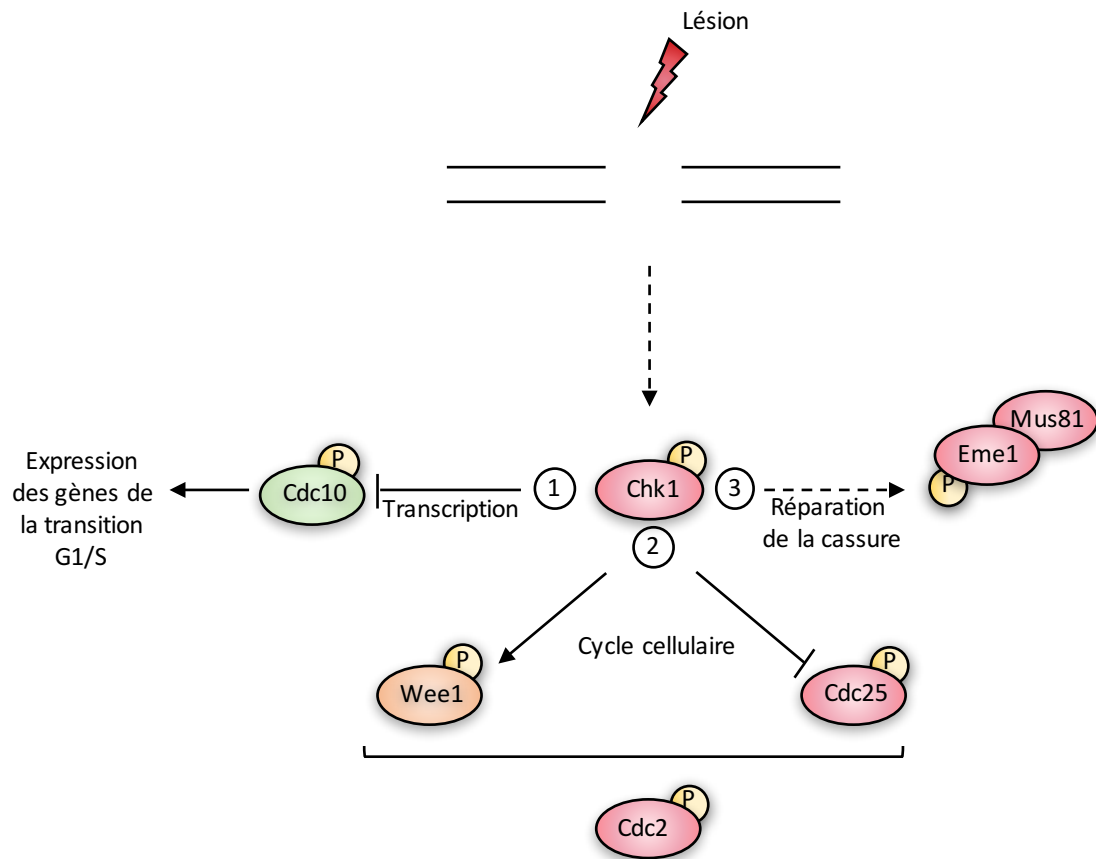


Figure 12. Rôle de Chk1 en réponse à une cassure double brin chez *S. pombe*. Représentation non exhaustive des rôles de Chk1 dans l'arrêt du cycle cellulaire et la réparation de l'ADN.

CHAPITRE 3

REPARATION DES CASSURES

DOUBLE BRIN D'ADN

Les cassures doubles brins de l'ADN (DSB) sont des lésions extrêmement toxiques pour la cellule puisque si non réparé, elles peuvent amener à la perte d'un bras chromosomique pendant la ségrégation des chromosomes. Il est donc essentiel que la cellule détecte et répare cette lésion. Ces DSB peuvent être générées de manière stochastique suite à l'action d'agents exogènes (irradiation ionisantes, agents chimiques comme la bléomycine, un radiomimétique) ou endogènes (par des produits du métabolisme cellulaire ou des accidents réplicatifs). A l'inverse, les cassures doubles brins peuvent également être induites enzymatiquement par des topoisomérases et endonucléases lors de processus physiologiques tels que la méiose ou la recombinaison VDJ (Bergerat et al., 1997; Keeney et al., 1997).

Par exemple, les cassures double brin méiotiques ont pour fonction de garantir le brassage génétique et d'assurer la diversité des individus. Dans cette section, nous allons discuter des différents mécanismes de réparations des cassures double brin ainsi que de leurs mécanismes de régulations.

Il existe deux voies principales (**Figure 13**) pour réparer ces cassures double brin : La ligature d'extrémités non-homologues (Non Homologous End Joining, NHEJ) (**Figure 14**) et la réparation par recombinaison homologue (Homologous Recombination, HR) (**Figure 15**).

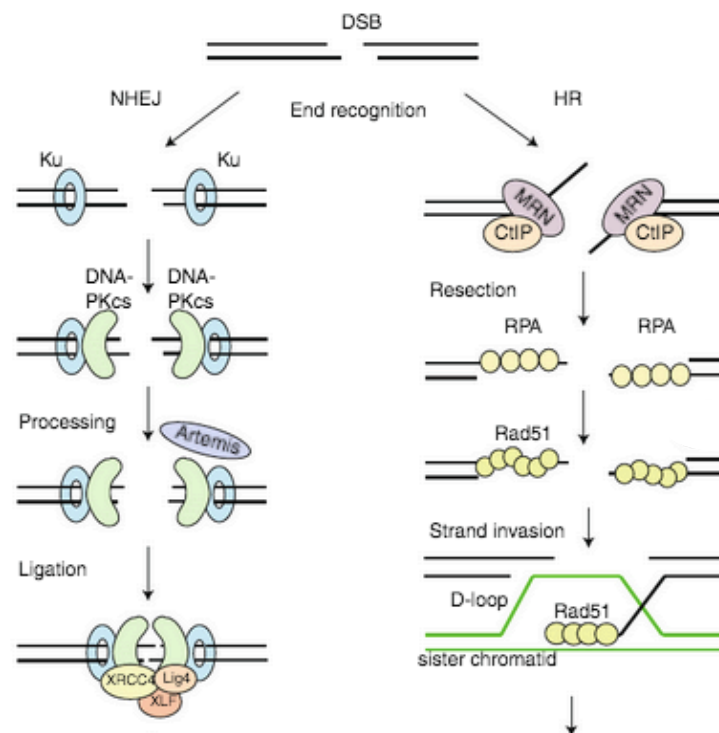


Figure 13. Réparation des DSB par le NHEJ (Non- homologous end joining) et la recombinaison homologue (HR, Homologous recombination). D'après Inger Brandsma and Dik C Gent, 2012.

I. NHEJ

Initialement mis en évidence dans les cellules de mammifères, le NHEJ est un mécanisme conservé chez tous les eucaryotes ainsi que chez certains procaryotes (Lieber, 2010; Ma et al., 2004). Souvent qualifié de recombinaison illégitime, le NHEJ raboute les deux extrémités de la cassure double brin. Ainsi, ce mécanisme ne requiert que peu, voire pas d'homologie de séquence entre les deux extrémités d'ADN. La fréquence de réparation par la voie du NHEJ est faible chez les procaryotes et les levures (Goedecke et al., 1994) alors qu'il semblerait que le NHEJ soit la voie privilégiée de réparation des cassures double brin chez les mammifères (Guirouilh-Barbat et al., 2004; Mao et al., 2008; Roth and Wilson, 1985). Bien que préférentiellement sollicité en G1 (en absence de chromatide sœur, voir chapitre recombinaison homologue), le NHEJ est actif durant tout le cycle cellulaire (Mao et al., 2008; Shibata et al., 2011). Des analyses génétiques ont permis de mettre en évidence des raffinements dans la réparation par NHEJ qui apparaît se subdiviser en deux voies : le NHEJ canonique (c-NHEJ) et le NHEJ alternatif (Alt-NHEJ) (Figure 14).

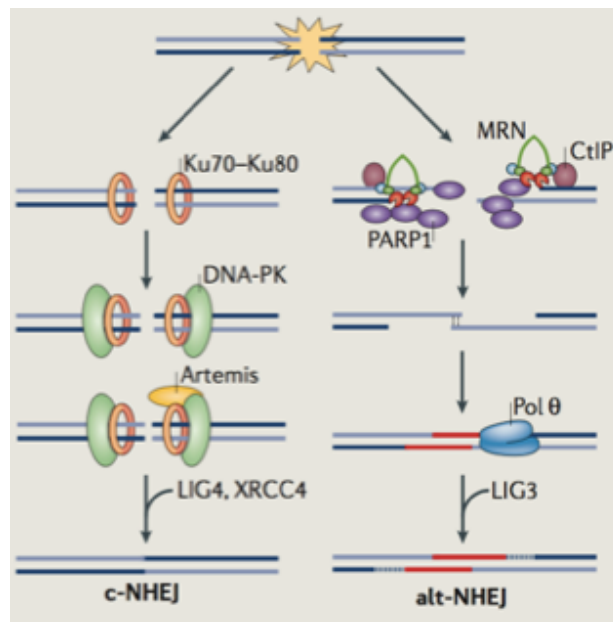


Figure 14. Mécanismes de réparation des DSBs par jointure des extrémités. NHEJ canonique (à gauche) et NHEJ Alternatif (à droite). D'après Lazzerini-Denchi and Sfeir, 2016.

1. LE NHEJ CANONIQUE

Le complexe archétypal du c-NHEJ est l'hétérodimère KU, composé chez les eucaryotes, des sous-unités Ku70 et Ku80. Le complexe Ku possède une forte affinité pour les extrémités d'ADN double-brin (franches ou avec une courte extrémité d'ADN simple brin sortante). Une fois recruté au niveau des extrémités de la cassure, le complexe Ku va promouvoir le rapprochement des deux extrémités via le recrutement de DNA-PK (Spagnolo et al., 2006). Le recrutement d'Artemis va permettre la maturation des extrémités de la cassure afin de promouvoir leur ligation par le complexe Cernunnos-XLF/XRCC4/LigaseIV. Le complexe MRN joue également un rôle structurel dans le c-NHEJ en maintenant à proximité les extrémités de la cassure double brin (Xie et al., 2009; Zhang and Paull, 2005). Ce rôle structurel de MRN chez les mammifères ne semble pas conservé chez *S. pombe* (Manolis et al., 2001; Porter-Goff and Rhind, 2009) à l'exception du traitement d'extrémités formant une tige-boucle (Li et al., 2017; Runge and Li, 2018).

2. LE NHEJ ALTERNATIF

L'existence du Alt-NHEJ, appelé aussi MMEJ (pour Microhomology-Mediated End-Joining), a pu être mise en évidence dans des contextes génétiques où le c-NHEJ était déficient (Boulton and Jackson, 1996; Guirouilh-Barbat et al., 2004). Toutefois, il n'est pas exclu que le Alt-NHEJ puisse coexister avec le c-NHEJ (Corneo et al., 2007; Lee-Theilen et al., 2011; Ma et al., 2003; Truong et al., 2013).

Cette voie alternative du NHEJ ne requiert pas non plus d'homologie de séquence mais elle se distingue du c-NHEJ par la résection systématique des extrémités de la cassure double brin ainsi que par l'absence de KU (Rass et al., 2009). La résection va permettre de révéler des régions de micro-homologies (5 à 25 paires de bases) qui pourront s'apparier. Le alt-NHEJ est également désigné sous l'appellation MMEJ (Micro homology-mediated non-homologous End Joining) (McVey and Lee, 2008).

De par son mécanisme, le alt-NHEJ n'est pas seulement mutagène mais également une source majeur de translocations, de duplication en tandem et de réarrangements chromosomiques (Guirouilh-Barbat et al., 2007; Weinstock et al., 2007; Yan et al., 2007). Ce sont l'initiation et

l'ampleur de la résection, déterminées par les complexes MRN/CtIP et la phase du cycle cellulaire qui vont être à l'origine du choix entre c-NHEJ ou alt-NHEJ (Grabarz et al., 2013; Rass et al., 2009; Xie et al., 2009; Zhang and Jasin, 2011). La présence d'homologie de séquence ainsi que la taille de l'ADN simple brin formé, qui dépend de la phase du cycle cellulaire comme expliqué ci-dessous dans la partie résection, va déterminer le choix entre le Alt-NHEJ et la recombinaison homologue (Grabarz et al., 2013; Rass et al., 2009; Xie et al., 2009; Zhang and Jasin, 2011).

II. RECOMBINAISON HOMOLOGUE DES CASSURES DOUBLE BRIN A DEUX EXTREMITES

La recombinaison homologue est souvent présentée, à l'inverse du NHEJ, comme une voie de réparation permettant de préserver l'information génétique et de limiter le risque de mutagenèse. En effet, son mécanisme repose sur la restauration de la molécule d'ADN en utilisant la chromatide sœur ou le chromosome homologue comme matrice. De nombreux complexes protéiques orchestrent le processus de réparation par recombinaison homologue. Des nucléases vont initier la résection de la cassure pour former un ADN simple brin. La reconnaissance de cet ADN simple brin par une recombinase va permettre la recherche d'homologie et générer une structure en D-loop. Cette structure métastable va être le substrat d'hélicase qui peuvent défaire la D-loop (SDSA) ou la faire migrer pour favoriser la synthèse d'un brin complémentaire. Cette synthèse peut s'étendre (BIR) ou se stopper lors de la capture du second brin amenant la formation d'une structure secondaire d'ADN appelée Jonction de Holliday. Des endonucléases à spécificité de structure et des hélicases pourront rétablir la structure initiale de la molécule d'ADN en agissant sur les Jonctions de Holliday (Figure 15).

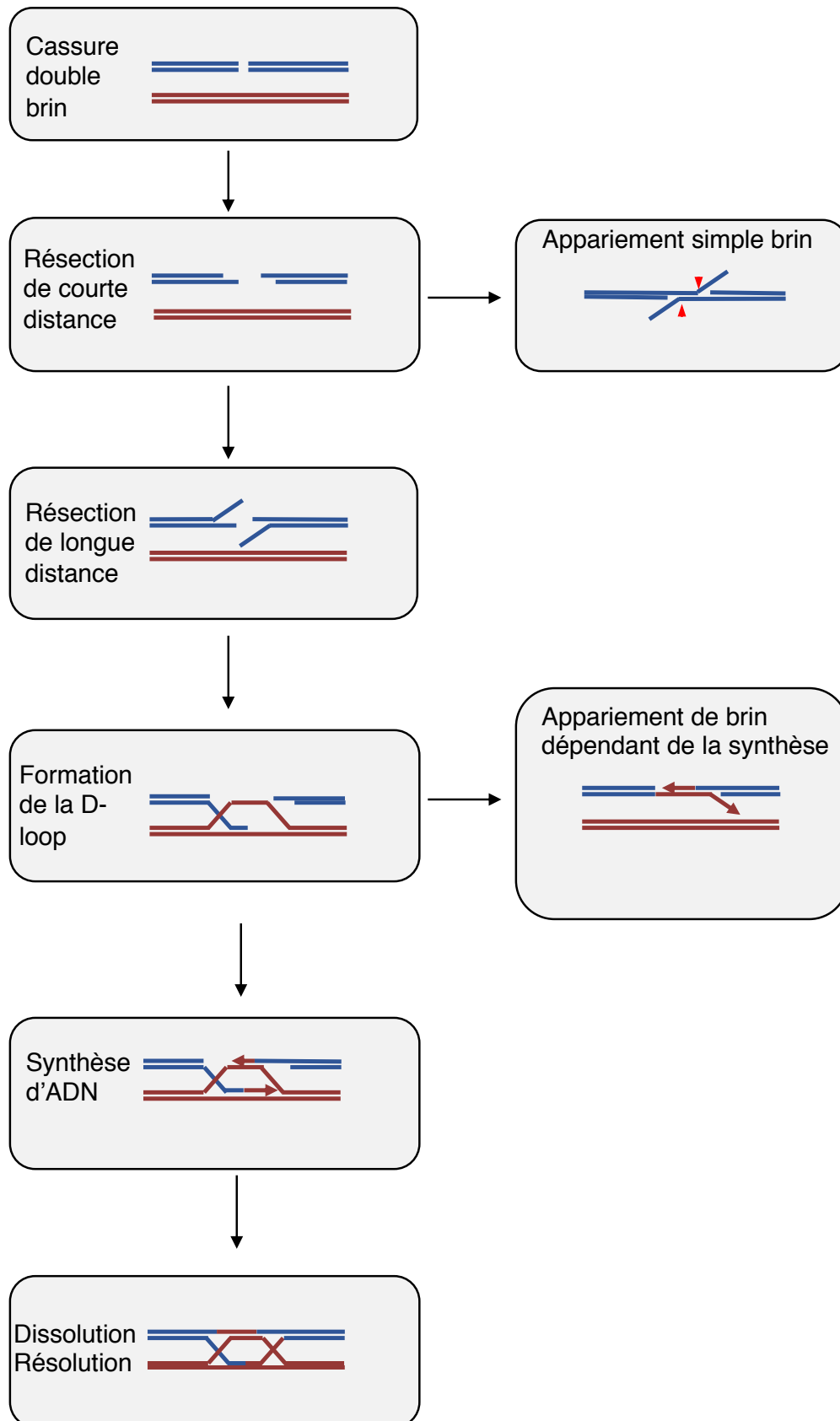


Figure 15. Voies de réparations des cassures double brin par recombinaison homologue.

1. RÉSECTION

La résection consiste en la dégradation du brin ayant une extrémité 5'P (brin 5') au niveau de la cassure double brin afin de générer un bras d'ADN simple brin sortant avec une extrémité 3'OH. La résection du brin 5', réalisée par l'action conjointe de nucléases et d'hélicases, est une étape essentielle pour l'initiation de la recombinaison homologue et conditionne le choix de la voie de réparation des cassures double brin.

Un modèle de résection en deux étapes a été proposé pour la réparation des cassures double brin par recombinaison homologue chez *S. cerevisiae* (**Figure 16**) (Mimitou and Symington, 2008). La première étape correspond à une résection limitée et implique l'action conjointe du complexe MRX (Mre11/Rad50/Xrs2) et de Sae2 (Ctp1 chez *S. pombe* et CtIP chez les mammifères) capables d'amorcer la dégradation sur environ 100 à 300 pb du brin 5' (Garcia et al., 2011). La deuxième étape de résection, dite de longue distance permet d'exposer jusqu'à plusieurs milliers de bases d'ADN simple brin (Langerak et al., 2011). Elle peut s'accomplir selon deux voies, soit par l'action de l'exonucléase Exo1, soit via la collaboration entre l'hélicase Sgs1 (BLM chez l'homme et Rqh1 chez *S. pombe*) et la nucléase Dna2 d'autre part (Gravel et al., 2008; Mimitou and Symington, 2008; Zhu et al., 2008).

1.1 Résection de courte distance

Le complexe MRN (Mre11-Rad50-Nbs1) chez les mammifères et *S. pombe* ou MRX (Mre11-Rad50-Xrs2) chez *S. cerevisiae* a un rôle primordial dans la résection. Il est le premier facteur à reconnaître les extrémités de la cassure double brin et il participe à la résection en mitose et en méiose (Paull and Gellert, 1998). Paradoxalement, MRN/X promeut une résection de 5' vers 3' *in vivo* alors que son activité exonucléasique s'exerce de 3' vers 5' (**Figure 16**). Cette ambiguïté a été levée par le groupe de Matt Neale qui a démontré que l'action endonucléolytique de Mre11 introduit une coupure simple brin du brin 5' à partir de laquelle son activité exonucléase 3'-5' va dégrader le brin 5' en direction de son extrémité à la cassure. La coupure simple brin sert également de point d'entrée pour les enzymes de la résection de longue distance qui opère de 5' vers 3'. Ces données montrent que la résection est un

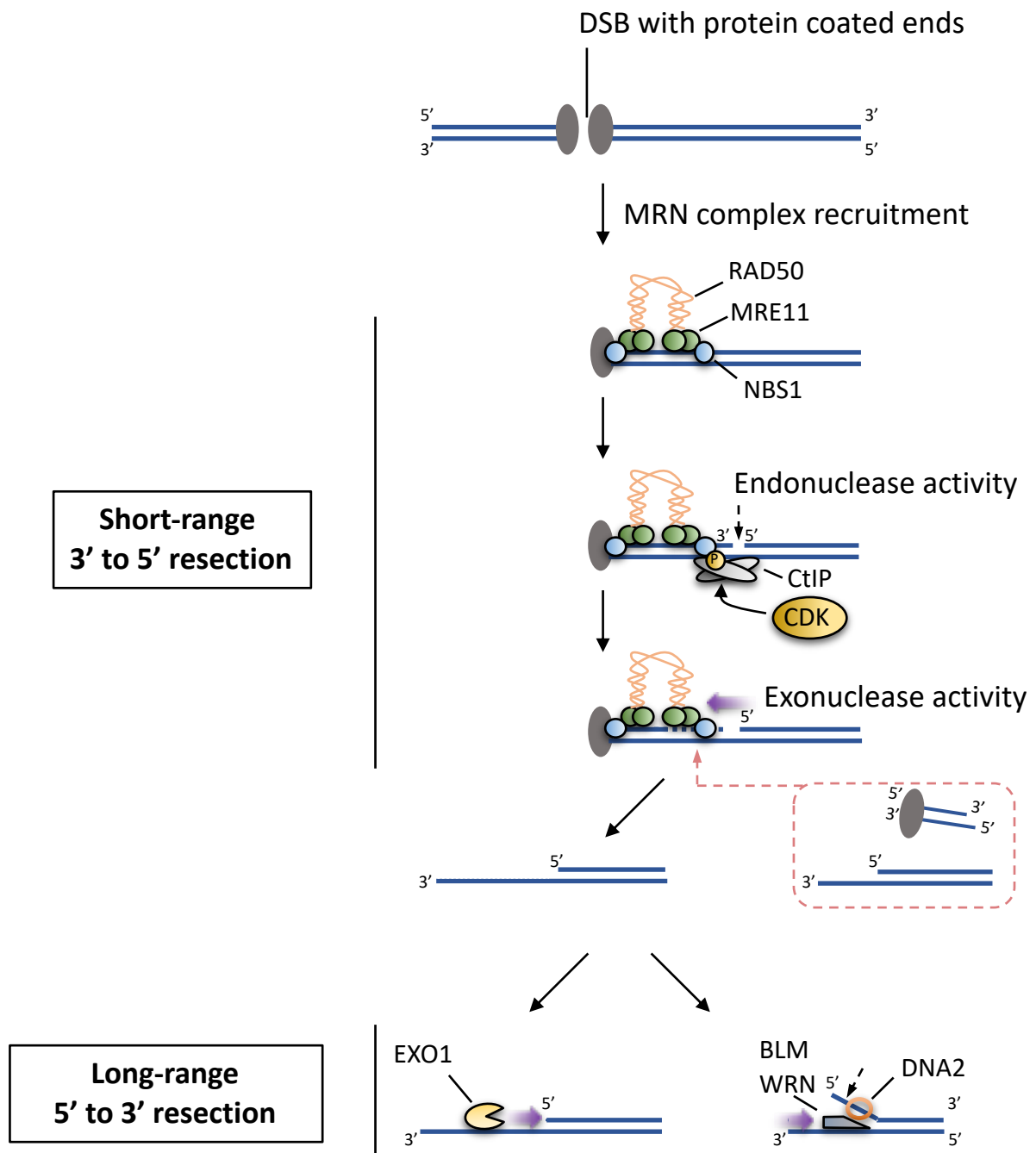


Figure 16. Résection de courte et de longue distance suite à une cassure double brin d'ADN

processus bidirectionnel ([Cannavo et al., 2019](#); [Garcia et al., 2011](#); [Myler et al., 2017](#)). Il est important de souligner que ce mécanisme permet d'initier la résection du brin 5' malgré la présence de protéines associées aux extrémités d'ADN au niveau de la DSB. En effet, l'activité endonucléase de MRE11 est stimulée par la présence de protéines aux extrémités ([Deshpande et al., 2020](#); [Reginato et al., 2017](#); [Wang et al., 2018](#)). Ceci est particulièrement important lors de la recombinaison méiotique qui est initiée par des DSB introduites par l'enzyme Spo11, laquelle est apparentée aux ADN topoisomérases de type II et demeure liée de façon covalente avec l'extrémité d'ADN bloquant toute action directe d'exonucleases à l'extrémité du brin 5' ([Keeney et al., 1997](#)). Un ensemble d'études menées *in vitro* et *in vivo* suggère que la stimulation de l'activité endonucléasique de MRE11 par la présence de protéines aux extrémités de la DSB, qui empêchent également la résection du brin 5' directement à partir de son extrémité, est importante dans les cellules végétatives (Giaccherini and Gaillard pour revue en fin d'introduction).

Mre11 agit comme un dimère et contient un domaine de fixation à l'ADN. Des mutations qui abolissent la dimérisation de Mre11 réduisent l'affinité avec l'ADN et ne restaure pas la viabilité des cellules après un traitement avec des agents génotoxiques comme la Camptothécine (CPT), l'hydroxyurée ([Williams et al., 2008](#)). La sous-unité Rad50 possède également un domaine de liaison à l'ADN ainsi qu'un domaine de dimérisation. Mre11 et Rad50 forment un hétérotétramère (M2R2) et constitue le cœur du complexe MRN ([Moreno-Herrero et al., 2005](#)). Deux monomères de la sous-unité Nbs1 interagissent avec la structure globulaire de Mre11-Rad50 de manière asymétrique. Nbs1 est un adaptateur flexible qui possède d'une part un rôle structural sur le complexe Mre11-Rad50 ([Schiller et al., 2012](#)), et d'autre part un rôle régulateur. Ensemble, ces trois sous-unités collaborent pour permettre la résection à courte distance, cependant elle nécessite l'interaction avec un co-facteur clé pour remplir leur fonction.

Ce facteur est la protéine CtIP chez les mammifères (Sae2 chez *S. cerevisiae* et Ctp1 chez *S. pombe*). CtIP est indispensable pour la résection initiale des cassures double brin notamment lorsque des adduits ou des structures en tige-boucle sont présents aux extrémités. CtIP interagit avec MRN et stimule l'activité nucléase du complexe ([Anand et al., 2016](#); [Cannavo and Cejka, 2014](#); [Hartsuiker et al., 2009](#); [Limbo et al., 2007](#); [Sartori et al., 2007](#)). La protéine Nbs1 possède des domaines FHA et BRCT qui lui permettent d'interagir avec des protéines phosphorylées, dont CtIP^{Sae2/Ctp1} ([Cannavo and Cejka, 2014](#); [Limbo et al., 2007](#); [Sartori et al.,](#)

2007; Williams et al., 2009). La phosphorylation CDK dépendante de CtIP en S/G2 ou par ATM/ATR en réponse aux dommages à l'ADN, augmente l'activité de Mre11 (Anand et al., 2016, 2019; Wang et al., 2013; Williams et al., 2009). En revanche, chez *S.pombe*, la phosphorylation Cdc2 dépendante de Ctp1 n'a aucun impact sur la viabilité des cellules en réponse ou non à des agent qui endommagent l'ADN et ne semble donc pas avoir d'importance pour les fonctions de Ctp1 associé à la réparation de l'ADN (Akamatsu et al., 2008). Cette fonction est assurée par la phosphorylation de Ctp1 par CK2 qui facilite l'interaction avec Nbs1 (Dodson et al., 2010). De manière intéressante, il a été reporté par certains laboratoires que CtIP et Sae2 ont une activité endonucléase. Cependant, ces données restent encore débattues au sein de la communauté (Lengsfeld et al., 2007; Makharashvili et al., 2014; Wang et al., 2014).

1.2 Résection de longue distance

La résection dépendante des complexes MRX/N et CtIP crée un point d'entrée pour une résection de longue distance catalysée par deux machinerie moléculaires distinctes : l'exonucléase 5'-3' EXO1 d'une part et le couple formé entre l'hélicase BLM^{Sgs1/Rqh1}/WRN et la nucléase DNA2, elle-même dotée d'une activité hélicase/translocase (Nimonkar et al., 2011; Zhu et al., 2008) (**Figure 16**). La résection génère une extrémité d'ADN simple brin 3' sortant qui sera reconnue par le complexe RPA. Ce dernier protège l'extrémité 3' sortante de l'activité endonucléase de Dna2 (Cejka et al., 2010a; Kasaciunaite et al., 2019; Niu et al., 2010). Le recrutement de l'hélicase BLM^{Sgs1/Rqh1} va permettre l'ouverture de l'hélice d'ADN. La fonction hélicase de Dna2 quant à elle n'agit pas sur l'ouverture de l'ADN, mais sert plutôt de translocase permettant d'enlever RPA du bras simple-brin 5' afin qu'il puisse être clivé par l'activité endonucléase de DNA2 ; une activité endonucléase spécifique de l'ADN simple-brin (Levikova et al., 2017; Miller et al., 2017).

Le complexe MRN joue également un rôle actif dans la résection de longue distance. En effet, MRN interagit directement avec EXO1 et renforce son activité exonucléase 5'-3' (Myler et al., 2017). De plus, au-delà de son rôle connu pour stimuler le complexe MRN, CtIP phosphorylé stimule aussi l'activité de DNA2 et participe à son recrutement à la cassure double brin pour promouvoir la résection à longue échelle (Ceppi et al., 2020; Daley et al., 2017). Il existe ainsi une coopération entre les mécanismes de résection courte et longue distance afin d'assurer

une résection optimale du brin 5' à la DSB. A noter que chez *S. pombe*, la résection longue distance semble catalysée principalement par Exo1 ([Langerak et al., 2011](#)).

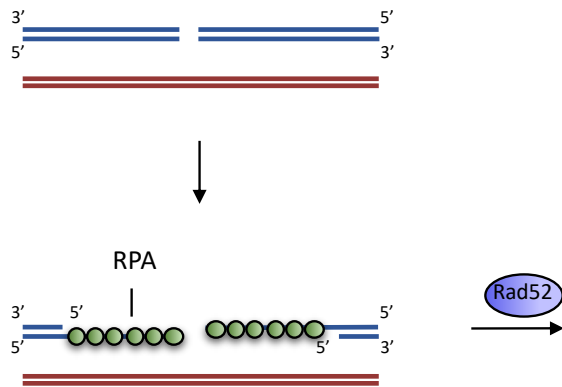
La résection de longue distance permet de générer des extensions d'ADN simple brin de plusieurs kilo bases (kb) qui, bien que non essentielles pour la recombinaison homologue, permettent d'augmenter son efficacité ([Zhu et al., 2008](#)). Ces longues extrémités simple brin 3' sortantes sont à l'origine de plusieurs voies de réparations qui vont être décrites dans les sections suivantes (**Figure 18**).

2. APPARIEMENT SIMPLE BRIN OU SSA

La résection longue distance, au sein de portions du génome comprenant des régions répétées, va permettre le rapprochement de deux blocs d'homologies et l'appariement des bras 3' simple brin au niveau de ces blocs grâce à la protéine Rad52 ([Dyck et al., 2001](#)). Les parties non-homologues des bras 3' simple-brin sont éliminées par l'endonucléase à spécificité de structure XPF-ERCC1 ([Adair et al., 2000](#); [Fishman-Lobell and Haber, 1992](#)). Ce processus est mutagène car il entraîne la délétion d'un des blocs d'homologie et de toute la portion d'ADN initialement située entre les deux blocs d'homologie (**Figure 17**).

Les mécanismes du SSA ont principalement été étudié chez *S. cerevisiae* et *S. pombe* et restent encore mal définis chez les mammifères (Giaccherini and Gaillard pour revue en fin d'introduction)

A



B

Appariement simple brin (SSA)

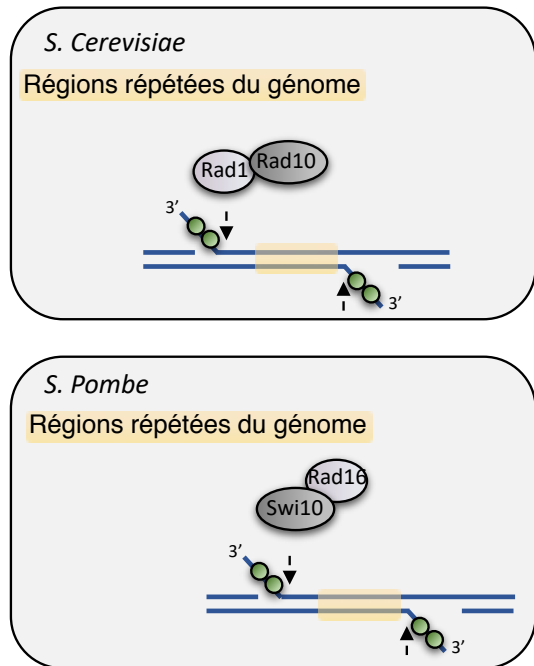


Figure 17. Mécanismes de l'appariement simple brin (SSA). A. Suite à une cassure double brin d'ADN, l'ADN peut être réséqué par la machinerie de résection. B. Réparation de la cassure double brin d'ADN par le SSA. Les flèches représentent l'action nucléolytique par les orthologues de XPF-ERCC1 chez *S. cerevisiae* ou *S. pombe*.

3. FORMATION DE LA D-LOOP

Le complexe RPA-simple brin n'a pas de capacité recombino-gène par lui-même. C'est le remplacement de RPA par la recombina-se Rad51 qui va permettre de former un nucléofilament possédant une capacité de recherche d'homologie dans de l'ADN double brin et d'appariement avec la séquence homologue par un processus dit d'échange de brin avec déplacement du brin non-complémentaire (Sugiyama and Kowalczykowski, 2002). La structure secondaire d'ADN ainsi générée est appelée boucle de déplacement ou D-loop.

Rad51 a la capacité de se fixer à l'ADN simple brin *in vitro* mais avec beaucoup moins d'affinité que RPA (Ma et al., 2017). Le chargement de Rad51 nécessite donc l'action de médiateurs de la recombinaison tel que Rad52 chez la levure ou de BRCA2 et DSS1 chez les vertébrés (New et al., 1998; Shinohara and Ogawa, 1998; Zhao et al., 2015). Le recrutement de Rad52 est promu par le complexe Rlp1^{XRCC2}-Rdl1^{RAD51D}-Sws1 au site du dommage (Chahwan et al., 2006).

Chez *S. pombe*, deux voies assurent le chargement de Rhp51^{RAD51}. Un hétérodimère formé par les protéines Rad55^{RAD51C} et Rad57^{XRCC3} interagit avec Rad51^{RAD51} via la sous-unité Rad57^{XRCC3} (Tsutsui et al., 2001) et permet la stabilisation du nucléofilament de Rad51^{RAD51} lorsque celui-ci est chargé sur l'ADN. L'hétérodimère Swi5 et Sfr1 interagit quant à lui avec Rad51^{RAD51} via la sous-unité Sfr1 et permet de stabiliser le filament et stimuler l'activité recombinase de Rad51^{RAD51} (Akamatsu et al., 2003). Les délétions de *sfr1* et Rad55^{RAD51C} phénotypent la délétion de *rad51*^{RAD51} ainsi, ces deux voies de chargement de Rad51^{RAD51} ont été initialement perçues comme indépendantes (Akamatsu et al., 2003). Cependant, il a été récemment montré que Rad55^{RAD51C} et Rad57^{XRCC3} interagissent avec Swi5 et Sfr1 et ce, indépendamment de Rad51^{RAD51} (Argunhan et al., 2020). Il a été proposé que l'hétérodimère Swi5-Sfr1 interagirait d'une part directement avec Rad51^{RAD51} et d'autre part avec Rad55^{RAD51C} et Rad57^{XRCC3}. Ainsi, en absence de Rad55^{RAD51C}, Swi5-Sfr1 peut toujours interagir avec Rad51^{RAD51} et promouvoir partiellement la réparation de l'ADN. En conséquence, dans des cellules sauvages, ces quatre protéines collaborent pour assembler et activer Rad51^{RAD51}, bien qu'elles puissent dans un contexte mutant agir de manière indépendante (Argunhan et al., 2020). Une fois assemblé, le filament Rad51^{RAD51} doit être stabilisé pour permettre l'échange de brin. La protéine remodeleuse de la chromatine Rad54^{RAD54}, appartenant à la famille des hélicase Swi2/Snf2, stabilise le nucléofilament de Rad51^{RAD51} et permet également de remodeler les nucléosomes tout en migrant le long du duplex d'ADN (Alexeev et al., 2003; Mazin et al., 2003).

Le devenir de la D-Loop dépend d'une multitude de facteurs. Il existe principalement trois voies qui seront décrites dans les sections suivantes. Les deux premières qui sont le Synthesis Dependent Strand Annealing (SDSA) et le Double Strand Break Repair (DSBR) ne permettent que la réparation de cassures à deux extrémités. La troisième, le Break Induced Replication (BIR), permet la réparation de DSB ayant une seule extrémité et sera abordée dans le chapitre 4 partie III.4 La fourche effondrée et la réplication induite par les cassures. Toutes passent par une extension du brin receveur de la D-loop mais l'étendue de la synthèse et du matériel génétique échangé entre chromatides ou chromosomes homologues diffèrent considérablement.

4. L'APPARIEMENT DE BRIN DEPENDANT DE LA SYNTHÈSE (SDSA)

L'extension du brin receveur (celui qui envahit la chromatide ou chromosome intact) est assurée par une ADN polymérase qui utilise son extrémité 3'OH comme amorce, le brin donneur (de la chromatide ou chromosome intact) servant de matrice. Cette synthèse d'ADN dépend à la fois des polymérases répliquatives et translesionnelles (Maloisel et al., 2008; McIlwraith et al., 2005) mais le contexte de recrutement et le choix la polymérase utilisée restent à ce jour mal compris. L'extension du brin receveur l'amènera à contenir une portion complémentaire de l'autre brin 3' simple brin de l'autre côté de la DSB. L'extension du brin 3' receveur est interrompue par sa dissociation du brin donneur sous l'action d'hélicases. Cela lui permet de s'apparier avec le brin 3' simple brin de l'autre côté de la cassure.

D'un point de vue moléculaire, au moins trois activités hélicase sont à même d'interrompre l'élongation de la D-loop et favoriser le SDSA. La dynamique de dissolution de la D-Loop a récemment été examinée chez *S. cerevisiae* et repose sur deux voies (Piazza et al., 2019). La première voie s'appuie sur la collaboration du complexe STR (Sgs1^{BLM/Rqh1}-Top3-Rmi1) et de l'hélicase Mph1^{FANCM/Fml1} qui permet de démanteler la D-Loop (**Figure 18**). La seconde voie repose sur l'hélicase Srs2. La voie dépendante de Srs2 agirait sur des D-Loop de longueur plus importante. La protéine Rad54 jouerait un rôle crucial dans le choix entre les deux voies (Piazza et al., 2019). Le SDSA ne produit pas d'échanges de brins ou crossing-over mais le démantèlement précoce de la D-loop après son élongation va proscrire les échanges massifs entre homologues et prévenir des effets délétères sur la stabilité du génome. C'est pourquoi, les hélicases qui démantèle cette D-loop s'appelle des anti-recombinases.

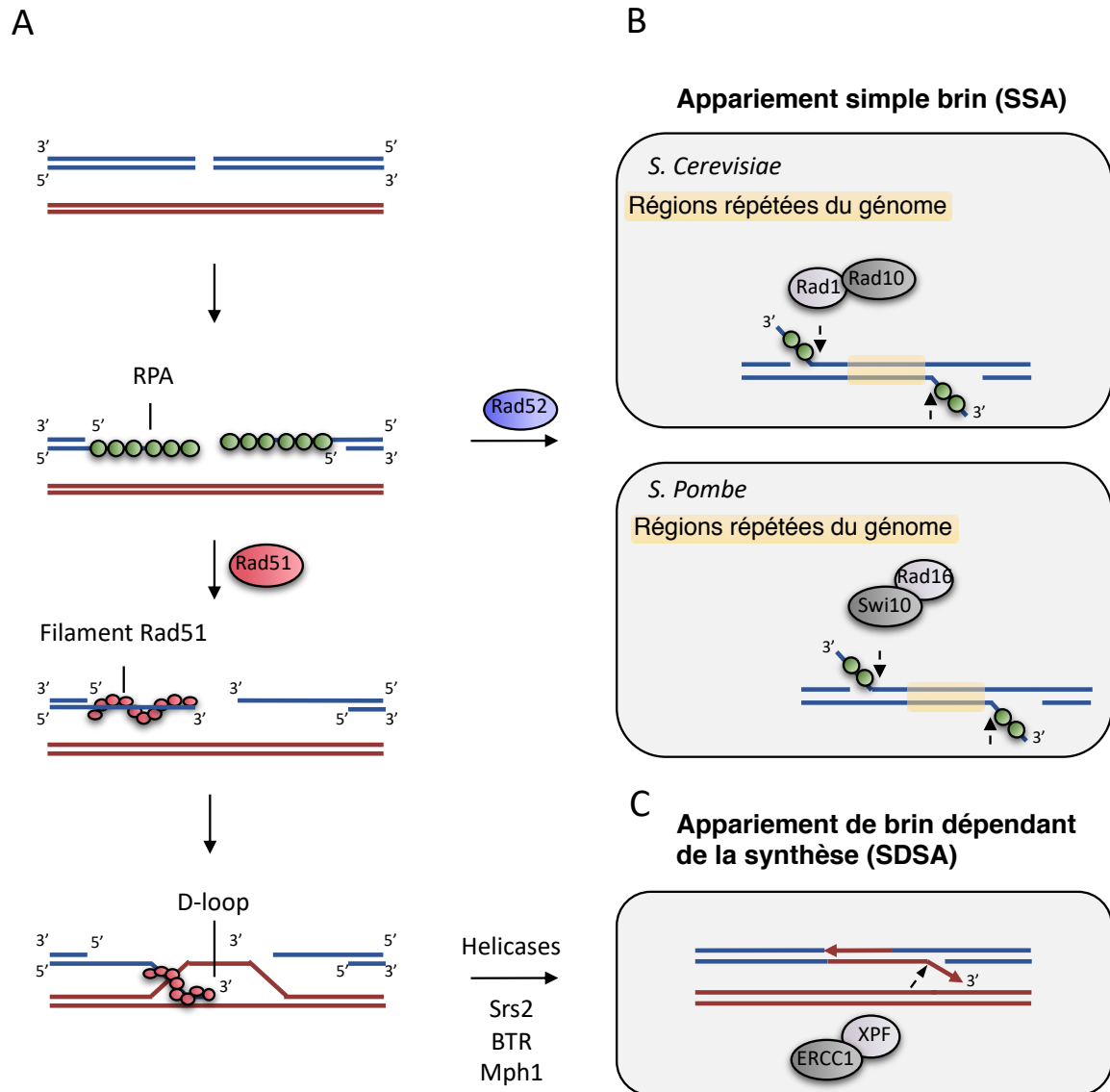


Figure 18. Mécanismes de l'appariement simple brin (SSA) et de l'appariement de brin dépendant de la synthèse (SDSA). **A.** Formation de la D-loop suite à une cassure double brin d'ADN. **B.** Réparation de la cassure double brin d'ADN par le SSA ou par **C.** le SDSA. Les flèches représentent l'action nucléolytique par les orthologues de XPF-ERCC1 chez *S. cerevisiae* ou *S. pombe*.

5. REPARATION DE LA CASSURE DOUBLE BRIN D'ADN (DSBR)

Si la D-loop persiste, le brin sortant 3' non envahissant peut s'apparier avec le brin qui forme la boucle simple brin de la D-loop. Ensuite, l'extension par une polymérase des extrémités 3'OH de la cassure et la ligation amèneront à la formation d'une double jonction de Holliday. Cette structure est le produit de la recombinaison homologue entre la chromatide sœur ou le chromosome homologue et intervient donc dans un processus permettant de réparer le DSB.

Elle est nécessaire pour le processus de réparation mais représente néanmoins un lien physique entre chromatides sœur et chromosomes homologues. Il est donc absolument nécessaire pour la cellule de gérer ces structures avant la mitose pour éviter des cassures aléatoires lors de la ségrégation des chromosomes. Auquel cas, cette dernière sera inégale et engendrera de l'aneuploïdie. Il existe principalement deux voies pour gérer cette structure : la dissolution qui se base sur l'action combinée de l'hélicase BLM et de la topoisomérase IIIa et la résolution qui implique un processus nucléolytique assuré par des endonucléases à spécificité de structures appelées résolvases de jonctions de Holliday (**Figure 19**).

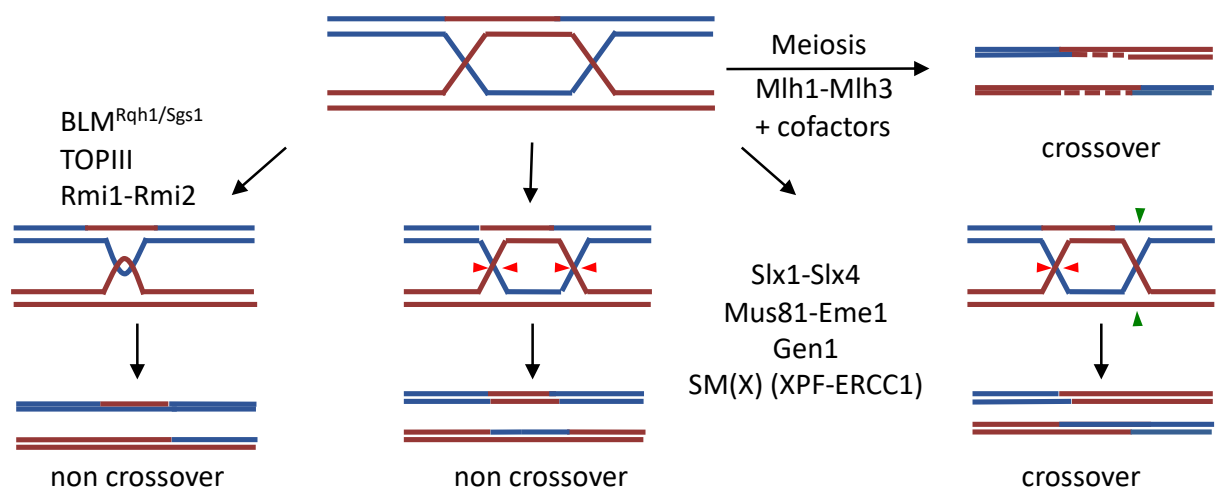


Figure 19. Gestion des doubles jonctions de Holliday. Les doubles jonctions de Holliday peuvent être gérées par plusieurs complexes protéiques : le complexe BLM-TOPIII-RMI (BTR) pour la dissolution et le complexe Slx4-Slx1, Mus81-Eme1 et Gen1 pour la résolution de ces doubles jonctions. En méiose, le complexe MLH1-MLH3 a un rôle prépondérant dans la formation de crossover excepté chez *S. pombe*.

5.1 Dissolution des doubles jonctions de Holliday

Dans le processus de dissolution, chaque jonction de Holliday est reconnue par le dissolvosome, formé par les complexes BTR/STR/RTR (**BLM/Sgs1/Rqh1-Top3-Rmi1**) respectivement chez l'humain, *S. cerevisiae* et *S. pombe*. L'activité hélicase de BLM^{Sgs1/Rqh1} va promouvoir la migration convergente de chacune des jonctions de Holliday et aboutir à la formation d'un intermédiaire topologique appelé hémicaténane (Karow et al., 1997; Wu and Hickson, 2003). Ce dernier sera incisé sur un des deux brins par la topoisomérase IIIa associée

aux cofacteurs Rmi1/Rmi2 (Chang et al., 2005; Chen and Brill, 2007; Wu and Hickson, 2003; Wu et al., 2006). L'initiation de la migration des doubles jonctions de Holliday entraîne l'apparition de super-tours positifs entre les jonctions qui pourraient bloquer la migration (Plank et al., 2006). Ainsi, l'association de BLM avec la topoisomérase IIIa est requise pour relâcher ces tensions topologiques (Plank et al., 2006). La présence seulement de BLM et de la topoisomérase IIIa est suffisante pour l'étape de migration des jonctions de Holliday (Cejka et al., 2010b; Plank et al., 2006). Enfin, lorsque les deux jonctions sont suffisamment proches l'une de l'autre, les deux molécules d'ADN sont liées l'une à l'autre et forme un héli-caténane. L'activité de TopoIIIa en association avec le co-facteur Rmi1 est essentielle pour résoudre l'héli-caténane (Cejka et al., 2012; Chang et al., 2005; Chen and Brill, 2007; Yang et al., 2010). Ce dernier stabilise une nouvelle conformation de TopoIIIa et augmente sa fixation sur la double jonction de Holliday (Bocquet et al., 2014; Cejka et al., 2012). De manière remarquable, les trois sous-unités du complexe travaillent ensemble pour dissoudre la jonction de Holliday. TopoIIIa et Rmi1 stimule l'activité hélicase de BLM et réciproquement, l'activité hélicase de BLM est importante pour l'activité de décaténation de TopoIIIa (Cejka et al., 2010b; Raynard et al., 2006, 2008; Wu et al., 2006). Ces stimulations réciproques suggèrent que les trois protéines sont requises pour une activité optimale et la dissolution des doubles jonctions de Holliday. La dissolution favorise un échange d'ADN minime entre chromosomes et contribue à la stabilité du génome ce qui en fait la voie majeure pour gérer les doubles jonctions de Holliday dans les cellules végétatives.

Un autre mécanisme existe pour gérer les doubles jonctions de Holliday. Cette deuxième voie devient essentielle en absence de la dissolution et repose sur une action nucléolytique sur les jonctions de Holliday.

5.2 Résolution des doubles jonctions de Holliday

La résolution des jonctions de Holliday (HJ) est un mécanisme alternatif à la dissolution. Il repose sur l'activité d'enzymes appelées endonucléases à spécificité de structure (SSEs), capables de coordonner l'introduction de coupures sur les brins opposés de la jonction de Holliday et contribuant à sa résolution. Ces SSEs sont aussi nommées résolvas de jonction de Holliday. Les premières résolvas identifiées chez les phages et bactéries introduisent des coupures totalement symétriques sur les brins opposés de la HJ générant par là même des

produits de coupures comportant une cassure simple brin directement religable. Basé sur des analyses enzymatiques *in vitro* il semble que chez les eucaryotes, même s'il existe des résolvases qui agissent de la même manière, d'autres résolvases telles que Mus81-Eme1 (voir chapitre 4) n'introduisent pas nécessairement des coupures symétriques. Cela entraîne des produits de coupures comportant, dans un cas une extension simple-brin qui devra être éliminé avant religation et dans l'autre une brèche simple-brin qui devra être remplie par une polymérase avant religation. Comme explique plus tard, cette différence a longtemps entraîné de vigoureux débat dans le domaine. Il est important de souligner qu'*in fine* ce que l'on attend d'une HJ résolvasse est d'éliminer le lien covalent que constitue la HJ entre chromatides sœurs ou chromosomes homologues avant leur ségrégation en mitose, la cellule disposant de tous les outils nécessaires pour gérer dans un second temps les produits d'une coupure non symétrique. De plus, nous ne savons pas aujourd'hui si *in vivo* Mus81-Eme1 en partenariat avec les bon cofacteurs et/ou modifications post-traductionnelles ne serait pas en réalité capable d'introduire des coupures symétriques. A noter que l'action des résolvases est primordiale pour la gestion de structures formant des simples jonctions de Holliday. Il existe trois familles d'endonucléase à spécificité de structure capable de résoudre les jonctions de Holliday : le complexe MUS81-EME1 (Boddy et al., 2001; Chen et al., 2001; Ciccio et al., 2003; Gaillard et al., 2003) qui appartient à la famille des endonucléases de la famille de XPF, GEN1 qui est un membre de la famille des endonucléases FEN1/XPG (Ip et al., 2008) et SLX4-SLX1 où SLX1 fait partie de la superfamille des nucléases GYI-YIG (Andersen et al., 2009; Fekairi et al., 2009; Muñoz et al., 2009; Svendsen et al., 2009). Ces endonucléases à spécificité de structures sont conservées chez *S. cerevisiae* et les cellules mammifères. Cependant, chez *S. pombe* il n'existe pas d'orthologue de GEN1 et les fonctions de Slx4-Slx1 sont principalement liées au maintien du nombre de copies de l'ARN ribosomal sans qu'il soit établi que cela implique la résolution de HJ (Coulon et al., 2004). Il semble donc que Mus81-Eme1 soit la seule HJ résolvasse chez *S. pombe*.

Alors que la dissolution résulte exclusivement en non crossing-over, la résolution des dHJ peut amener à des crossing-over. Dans les cellules mitotiques, le brassage chromosomique se doit d'être évité car il représente une source d'instabilité génomique. C'est pourquoi, la dissolution est admise comme étant majoritaire dans les cellules mitotiques.

En revanche, en méiose, la gestion des dHJ est une source majeure et nécessaire de variabilité génétique. L'évolution a ainsi sélectionné des mécanismes permettant de promouvoir les

crossing-over en méiose. La résolution est dite biaisée et repose en partie sur la nucléase MLH1-MLH3 ([Cannavo et al., 2020](#)), excepté chez *S. pombe* où elle repose entièrement sur la nucléase Mus81-Eme1 ([Boddy et al., 2001](#); [Smith et al., 2003](#)).

CHAPITRE 4

L'ENDONUCLEASE A SPECIFICITE DE STRUCTURE MUS81-EME1

Les endonucléases à spécificités de structure (SSEs) sont des enzymes capables d'inciser des structures secondaires d'ADN générées par des processus tels que la réplication, la réparation, la recombinaison et la transcription de l'ADN. Ces enzymes reconnaissent des structures secondaires d'ADN plutôt que des séquences nucléotidiques d'où leur nom d'endonucléases à spécificités de structure. La jonction ADN simple brin/double brin représente pour de nombreuses SSE le motif de base reconnu pour l'incision à proximité de cette jonction d'un des brins du duplex. On peut définir au moins deux grandes familles fonctionnelles de SSE. Celles qui vont couper un brin dont l'extrémité de sa portion simple brin est un 3'OH, on parle alors d'endonucléase 3' Flap, et celles qui vont couper un brin dont l'extrémité de sa portion simple brin est un 5'P, on parle dans ce cas d'endonucléase 5' Flap. La principale famille d'endonucléase 3'Flap correspond à la famille XPF/MUS81 tandis que la famille FEN1/XPG représente la principale famille des endonucléase 5'Flap. Il existe d'autres endonucléases 3' Flap et 5' Flap qui n'appartiennent ni à l'une ni à l'autre de ces familles (Dehé and Gaillard, 2017).

Au début des années 1980, la découverte que l'endonucléase VII du bactériophage T4, capable de résoudre des HJs indépendamment de leur séquence, a constitué une percée majeure dans la mise en évidence des résolvas (Mizuuchi et al., 1982). S'en est suivi la découverte des résolvas bactériennes telles que RuvC chez *E. coli* (Dunderdale et al., 1991; Iwasaki et al., 1991) ou Hjc et Hef chez l'archéobactérie *Pyrococcus furiosus* (Komori et al., 1999). L'identification de la première résolvas eucaryote nucléaire, la résolvas mitochondriale Cce1 ayant été identifiée dans les années 1990 (Kleff et al., 1992), a fait l'objet d'intenses recherches infructueuses pendant de nombreuses années. La première résolvas nucléaire eucaryote, la SSE Mus81-Eme1, fût finalement identifiée par des études génétiques sur les mécanismes de tolérance aux dommages menées chez *S. pombe* (Boddy et al., 2000b). Cette SSE appartient à la famille XPF, mais elle a acquis la propriété particulière de pouvoir agir sur des structures plus complexes que celles prises en charge par XPF-ERCC1, comme les D-loop et les jonctions de Holliday. Comme XPF-ERCC1, Mus81-Eme1 descend des nucléases homodimériques Hef et/ou de l'homodimère XPF d'archéobactérie.

I DECOUVERTE DE MUS81-EME1

Initialement, Mus81 fut identifié chez *S. cerevisiae* dans un crible double-hybride destiné à identifier des partenaires de la protéine Rad54 et chez *S. pombe* par des analyses protéomiques visant à identifier des partenaires/cibles de la kinase effectrice Cds1 (Boddy et al., 2000c; Interthal and Heyer, 2000).

Les travaux menés par Nick Boddy dans l'équipe de Paul Russel l'ont conduit à proposer un rôle de Mus81 dans la résolution des HJ sur la base de l'homologie de séquence entre Mus81 et le domaine catalytique de XPF et de la synthétique létalité d'un double mutant *mus81 rqh1* (Boddy et al., 2000b). Des études protéomiques menées dans la continuité de cette étude séminale ont conduit à l'identification de la protéine Eme1 comme partenaire direct de Mus81 (Boddy et al., 2001). En combinant analyses génétiques et biochimiques, il fut démontré que le complexe Mus81-Eme1 est une SSE appartenant à la familles XPF (depuis nommée famille XPF/MUS81) qui a acquis la capacité de résoudre des HJ. Ces travaux de l'équipe Russell furent publiés peu de temps après la publication d'une remarquable étude génétique visant à identifier des gènes essentiels en absence de l'hélicase Sgs1, l'orthologue chez *S. cerevisiae* de l'hélicase Rqh1 de *S. pombe* et BLM de l'homme (Mullen et al., 2001). Cette étude a identifié trois couples de gènes dont les produits forment, comme cela a été montré dans des travaux ultérieurs, trois complexes protéiques essentiels en absence de Sgs1 : la SSE Slx1-Slx4, la SSE Slx3-Slx2 (Mus81-Mms4) et la SUMO-targeted ubiquitin ligase Slx5-Slx8 (Mullen et al., 2001). Le gène Slx2 correspond au gène Mms4 identifié dans des études antérieures par la forte sensibilité des mutants *mms4* à un traitement MMS (Xiao et al., 1998). Son produit Mms4 est l'orthologue chez *S. cerevisiae* d'Eme1. Grâce à des analyses de séquences, des orthologues de Mus81 ont été identifiés chez les autres organismes dont l'homme, soulignant son importance (Chen et al., 2001; Ciccía et al., 2003) (**Figure 20**). De manière intéressante, la plupart des vertébrés possèdent deux orthologues de la protéine de levure Eme1. Ces orthologues EME1 et EME2 forment avec Mus81 deux endonucléases hétérodimériques distinctes MUS81-EME1 et MUS81-EME2 (Ciccía et al., 2003). Étonnamment, la lignée tumorale de poulet DT40 semble dépourvue de MUS81 bien qu'elle produise les sous-unités EME1 et EME2 (Kikuchi et al., 2013). De plus, XPF est essentielle à la viabilité des cellules DT40 et de manière remarquable il a été montré que le complexe humain MUS81-EME1 est capable de restaurer la viabilité des cellules DT40 déficientes en XPF (Kikuchi

et al., 2013). Ces observations ont amené les auteurs à suggérer qu'il existerait un complexe XPF-EME1 dans les cellules DT40 qui remplirait les fonctions de MUS81-EME1 chez les autres organismes. De plus, chez la drosophile, (*Drosophila melanogaster*), c'est l'orthologue de XPF, Mei9, qui est essentiel pour la recombinaison méiotique (Sekelsky et al., 1995). L'ensemble de ces données soulèvent les questions suivantes : en quoi la sous-unité catalytique XPF de chez *D. Melanogaster* ou du poulet aurait la capacité de résoudre des jonctions de Holliday ? Par quel mécanisme ? Des études biochimiques restent essentielles pour confirmer leur activité résolvasse.

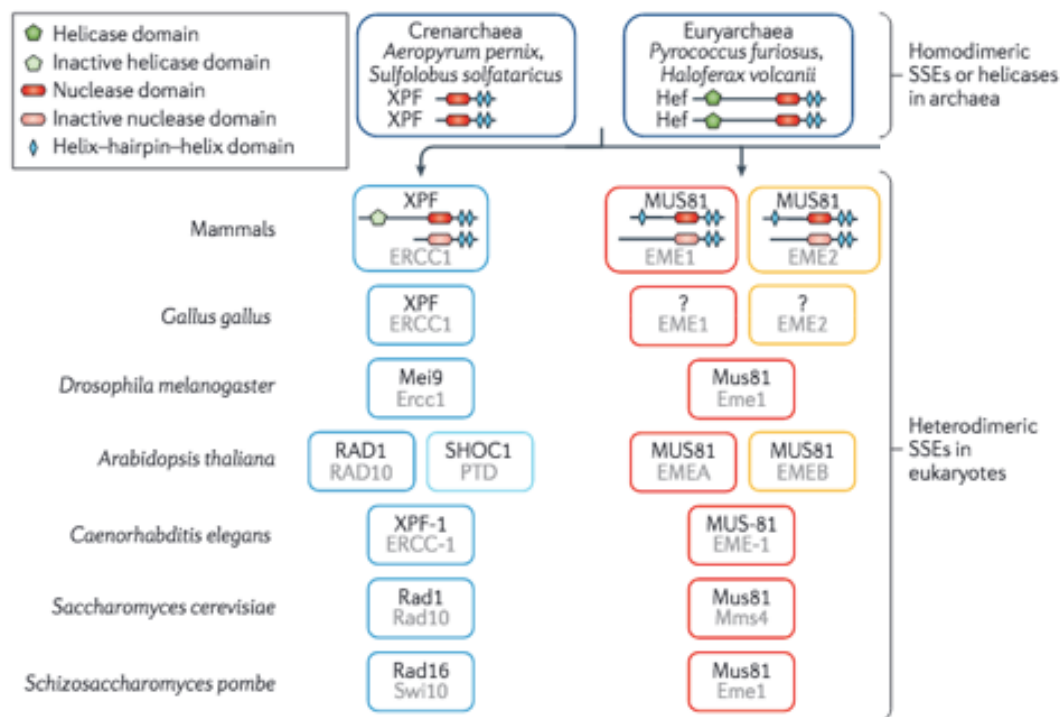


Figure 20. Évolution des endonucléases à spécificité de structure appartenant à la famille XPF/MUS81.
Adapté de Dehé and Gaillard. Nat Rev Mol Biol 2017.

1. STRUCTURE DES PROTEINES DE LA FAMILLE XPF/MUS81

Chez les eucaryotes, les endonucléases de la famille XPF/MUS81 se composent d'une sous-unité catalytique et d'une non catalytiques. Les sous-unités catalytiques partagent toutes des domaines caractéristiques, incluant le domaine endonucléase ERCC4 (Excision Repair Cross Complementation groupe 4) ainsi qu'un double domaine consécutif HhH (Helix-Hairpin-Helix)₂ (Shao and Grishin, 2000). Les domaines ERCC4 et HhH₂ sont l'unité fonctionnelle la plus petite

requis pour cibler et cliver les structures secondaires d'ADN (Taylor and McGowan, 2008). La sous-unité non catalytique possède un domaine ERCC4 qui a divergé au cours de l'évolution de leur homologue catalytique. Les protéines des archéobactéries orthologues à XPF /MUS81 contiennent également les domaines ERCC4- HhH₂ mais également un motif d'interaction avec PCNA (Roberts et al., 2003) ou un domaine hélicase fonctionnel (Komori et al., 2002; Nishino et al., 2005a), qui a été perdu au cours de l'évolution. Bien que ces protéines ancestrales soient des homodimères, un seul site actif est suffisant pour leur activité nucléase (Nishino et al., 2005b) ce qui est en accord avec les endonucléases à spécificité de structure des eucaryotes, qui ne possèdent qu'une seule sous-unité catalytique. De manière remarquable, au cours de l'évolution, les nucléases homodimériques ont divergé vers des complexes hétérodimériques, ceci permettant d'accroître les possibilités de régulation chez les eucaryotes. Chaque hétérodimère est composé d'une sous-unité possédant un domaine catalytique intacte en association avec une autre sous-unité dont le domaine catalytique est non fonctionnel. Une étude séminale fut celle de la description de la nucléase XPF-ERCC1, où l'association des deux sous-unités est essentielle pour l'activité catalytique (Biggerstaff et al., 1993; Gaillard and Wood, 2001).

Le domaine ERCC4 des sous-unités catalytiques XPF et MUS81 contient le motif GDX_nERKX₃D localisé au sein d'un feuillet β . Ce motif est requis pour l'activité endonucléase (H.Enzlin and D.Scharer, 2002; Nishino et al., 2003) via la chélation d'ions divalents par les résidus acides du cœur du site actif.

Les domaines HhH₂, quant à eux, permettent la reconnaissance des jonctions d'ADN simple brin-double brin avec une polarité précise. Ces domaines sont déterminants pour la fixation aux jonctions d'ADN branchées (Newman et al., 2005; Nishino et al., 2003, 2005a) et sont conservés dans de nombreuses protéines qui se fixent à l'ADN. De plus, ces domaines participent à la stabilité et à l'oligomérisation des endonucléases XPF/MUS81 (Newman et al., 2005; Nishino et al., 2003, 2005a). Bien que la famille XPF/MUS81 présente de grandes similarités structurelles entre les protéines, elles possèdent néanmoins certaines propriétés qui leur sont propres.

1.1 Activité biochimique de la famille XPF/MUS81

Comme indiqué plus haut, les motifs HhH₂ sont important pour l'activité de fixation à l'ADN des membres de la famille XPF/MUS81. Les différences dans les motifs HhH₂ pourrait déterminer la spécificité de substrat de chaque complexe. En effet, *a contrario* de XPF-ERCC1, MUS81-EME1 et MUS81-EME2 clivent des queues 3' (et 5' dans le cas de MUS81-EME2) et des fourches de réplication beaucoup plus efficacement que des structures à bras écartés (Bastin-Shanower et al., 2003; Boddy et al., 2001; Ciccio et al., 2003; Pepe and West, 2014a). Les études *in vitro* avec les membres de la famille XPF/MUS81 des archéobactéries ont pu montrer que les protéines Hef de *P. furiosus* et XPF de *S. solfataricus* ont des spécificités de substrats plus proches des complexes MUS81 que de XPF-ERCC1, clivant également des queues 3' et des fourches de réplication plus efficacement que des structures à bras écartés (Komori et al., 2002; Roberts and White, 2005). De manière remarquable, le XPF de *S. solfataricus* clive également des substrats de types D-loop et HJ comportant une cassure simple brin à la jonction (nHJ) (Roberts and White, 2005).

Les premières études biochimiques réalisées ont pu montrer que le complexe Mus81-Eme1 immunoprécipité à partir de lysats cellulaires de *S. pombe* (Figure 21) pouvait résoudre des HJ *in vitro* mais qu'il coupait bien plus efficacement d'autres intermédiaires de recombinaison, comme la D-loop ou une nHJ (Boddy et al., 2001; Gaillard et al., 2003) (Figure 22). *A contrario*, le complexe recombinant Mus81-Eme1 de chez *S. pombe* purifié à partir de bactéries sont quasiment inactifs sur la HJ (Boddy et al., 2001; Gaillard et al., 2003). Sur la base de cette inactivité des complexes recombinants produits dans la bactérie il a pendant longtemps était contesté que Mus81-Eme1 et Mus81-Mms4 puissent résoudre des HJ (Haber and Heyer, 2001). Comme nous le verrons plus tard, nous savons aujourd'hui que des modifications post-traductionnelles et/ou des interaction avec des co-activateurs sont déterminants pour promouvoir la résolution de HJ par Mus81-Eme1 et Mus81-Mms4 chez les levures *S. pombe*, *S. cerevisiae* et chez l'homme. D'un point de vue mécanistique, la résolution des HJ passe par un mécanisme de coupure et contre coupure, la première coupure convertissant la HJ en nHJ (Gaillard et al., 2003). Cela assure une résolution plus efficace de Mus81-Eme1 étant considérablement plus actif sur l'intermédiaire réactionnel que représente la nHJ (Gaillard et al., 2003).

Avec les protéines Hef de *P. furiosus* et XPF de *S. solfataricus*, le motif HhH₂ est perçu comme formant un pont entre les bras en duplex de la fourche de réplication. Cela permet au domaine ERCC4 de la nucléase d'être positionné proche du centre de la fourche de réplication et de la cliver ([Nishino et al., 2005b](#)). Presque 10 ans plus tard, la protéine MUS81-EME1 a été cristallisée en interaction avec une queue 3' comme substrat, ce qui a permis d'affiner le mécanisme de reconnaissance de la coupure ([Chang et al., 2008](#)). Ce dernier point va être discuté dans le paragraphe suivant, en mettant en exergue les différences structurales entre l'hétérodimère Mus81-Eme1 et les autres protéines de la famille XPF/MUS81.

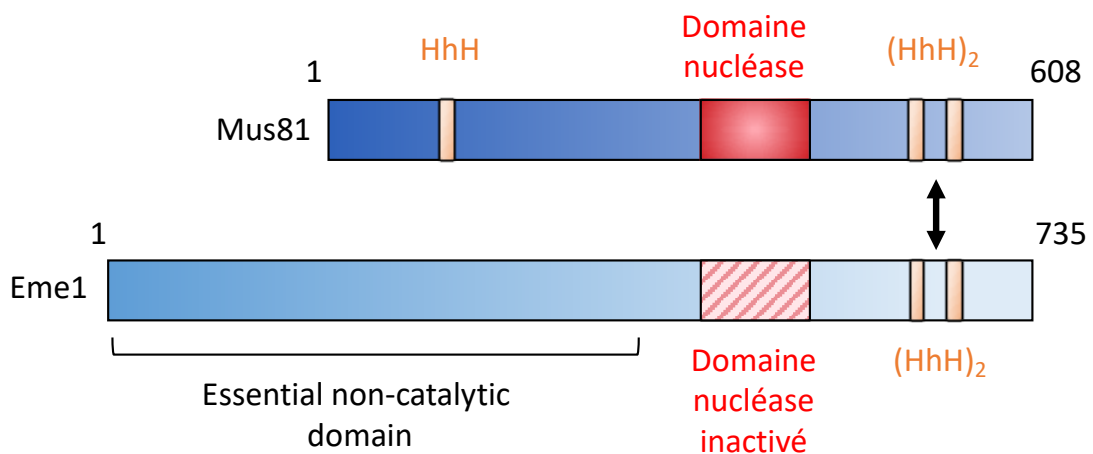


Figure 21. Structure simplifiée de Mus81-Eme1 de *S. pombe*. Mus81 possède le domaine nucléase ainsi qu'un motif (HhH)₂ en C-terminal tout comme Eme1. A l'inverse, Eme1 contient un domaine nucléase inactivée. L'interaction entre les deux sous-unités se situe en C-terminal des deux protéines.

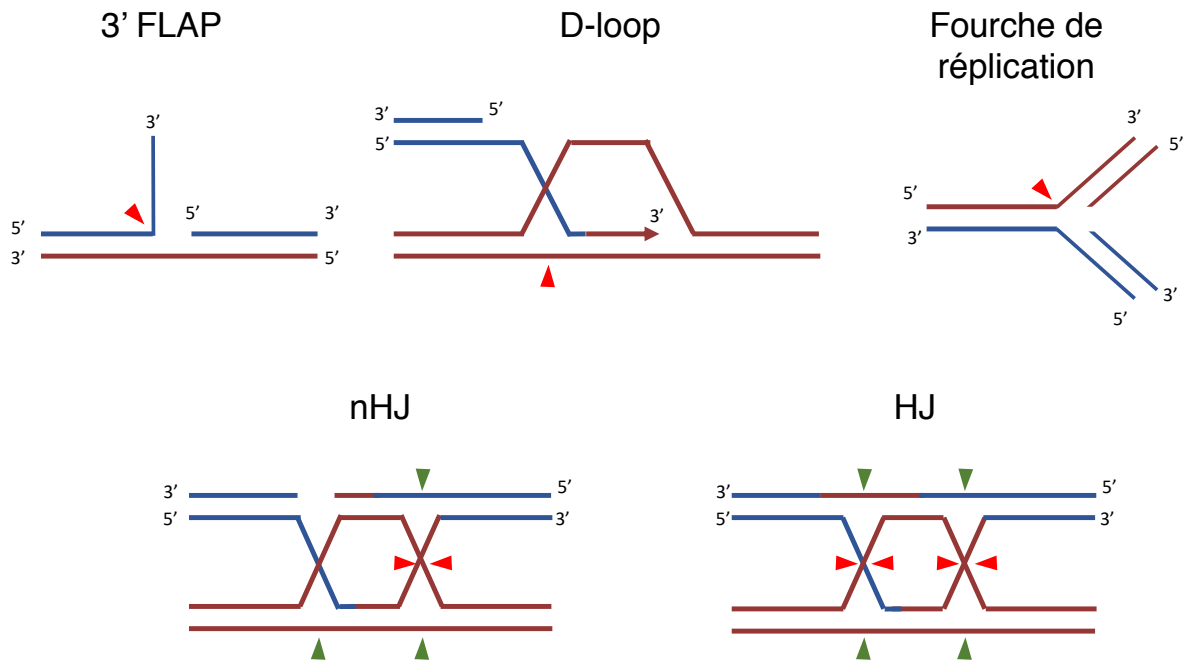


Figure 22. Substrats de l'endonuclease Mus81-Eme1. L'endonuclease est capable de cliver de nombreux substrats tels que les queues 3', les D-loop, les fourches de réceptions, et jonctions de Holliday entaillées (nHJ) ou intact (HJ)

1.2 Structure et activité du complexe Mus81-Eme1

L'analyse de la séquence de MUS81 indique que les deux domaines HhH sont situés au niveau des extrémités N-terminale et C-terminale. Cette répartition soulève la question de la manière par laquelle ces domaines agissent de concert pour favoriser une fixation à l'ADN ? La réponse a été apportée avec la première structure cristallographique du fragment C-terminal du complexe MUS81-EME1 (Chang et al., 2008). Il apparaît que MUS81 possède en réalité deux domaines HhH en tandem, de manière similaire aux autres membres de la famille XPF/MUS81. Ces domaines HhH₂ de MUS81 agissent en synergie avec les domaines HhH₂ d'Eme1 pour la fixation au substrat (Chang et al., 2008) (Figure 23). La structure du fragment C-terminal en complexe avec une extrémité 3' sortante d'ADN a permis de clarifier le mode de reconnaissance et de clivage de MUS81-EME1. D'un point de vue mécanistique, la fixation à l'ADN induit un changement conformationnel dans les interactions qui connectent le domaine nucléase de MUS81 et les domaines HhH₂ de MUS81 et d'EME1. MUS81-EME1 passe d'une configuration dite compacte à une configuration ouverte, révélant une partie hydrophobe et

créant une poche de fixation qui va entraîner la courbure de la queue 3' et placer le brin à inciser au niveau du site actif ([Gwon et al., 2014](#)). Ainsi, il existe une synergie entre les domaines HhH₂ de MUS81 et d'Eme1 ainsi qu'avec le domaine catalytique de MUS81 pour se fixer et cliver le substrat. Ces données structurelles sont fondamentales pour comprendre comment le complexe agit sur ses structures de prédilections.

Néanmoins, l'absence du domaine N-terminal d'EME1 dans ces études de cristallographie pose la question d'un rôle de ce domaine. En effet, bien que les différentes études montrent que les domaines C-terminaux de MUS81 et d'EME1 sont suffisants pour l'activité catalytique du complexe (**Figure 23**), nous verrons dans la partie IV Régulation du complexe Mus81-Eme1 en quoi le domaine N-terminal joue un rôle crucial.

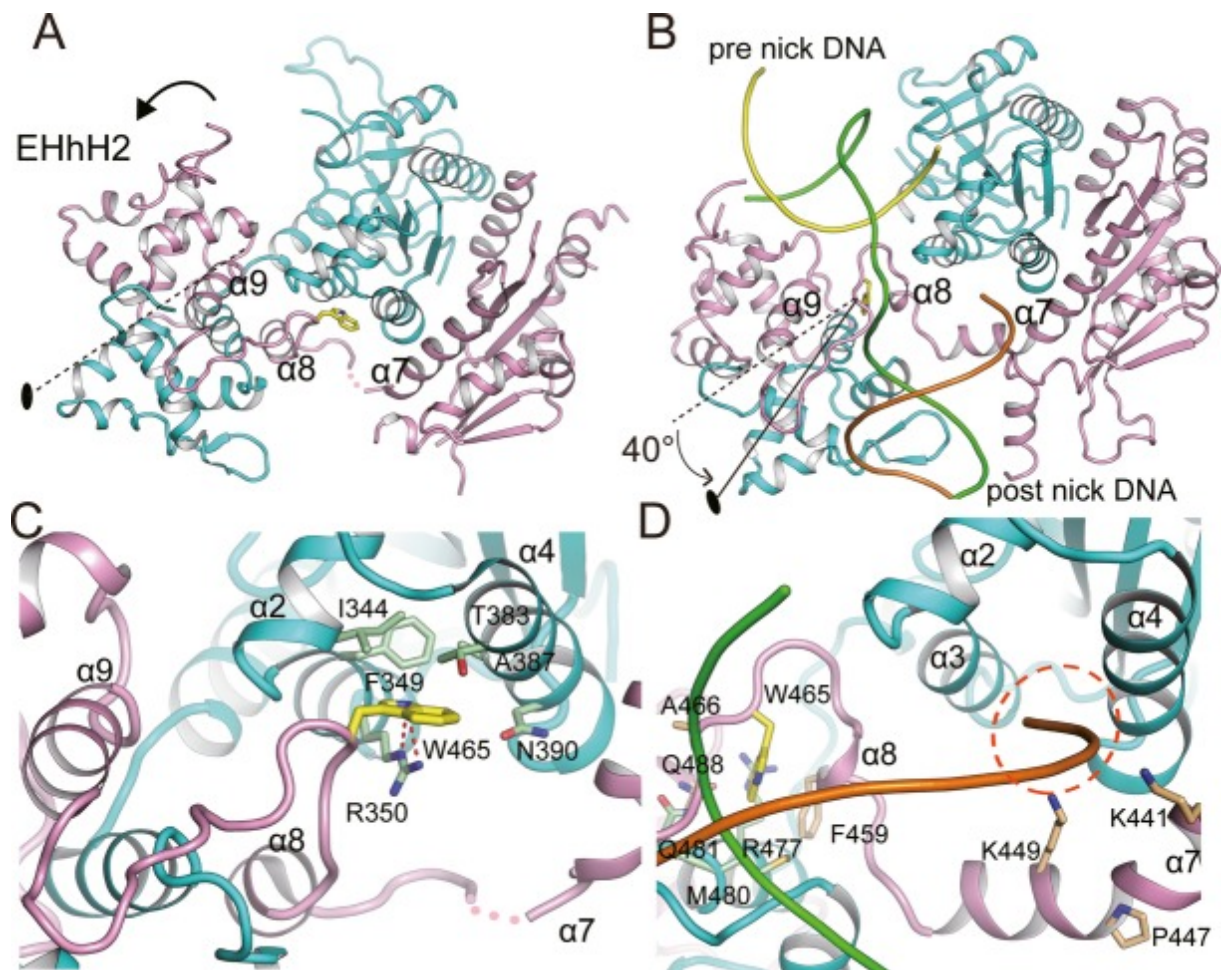


Figure 23. Structure en cristallographie de Mus81-Eme1 humain. (A et C) Structure globale (A) du complexe Mus81 (en bleu)-Eme1 (en rose) en absence de substrat ou agrandie (C) au niveau de la partie hydrophobe importante pour la fixation au substrat. (B et D). Structure globale (B) du complexe Mus81 (en bleu)-Eme1 (en rose) en présence de substrat ou agrandie (D) au niveau de la partie hydrophobe importante pour la fixation au substrat qui a subi une rotation, induisant une libération de la poche hydrophobe. Adapté de Gwon et al. 2014

II ROLE DE MUS81-EME1 EN MEIOSE

La méiose est l'étape de la formation des gamètes qui permet le passage de l'état diploïde à l'état haploïde. Cette division par deux du contenu chromosomique résulte de deux divisions successives sans phase de réplication intermittente. Lors de la première division, dite réductionnelle, les chromosomes homologues (maternels et paternels) se séparent, alors que, lors de la seconde, les chromatides sœurs se séparent. La division réductionnelle requiert l'établissement de connexions entre chromosomes homologues, réalisées par les événements de recombinaison homologues réciproques. Outre leur rôle mécanique, ces événements de

recombinaison méiotique contribuent à un brassage du génome très important qui résulte en la création de nouvelles combinaisons d'allèles à chaque génération. Or, comme vu précédemment, la recombinaison homologue nécessite initialement une cassure double brin de la molécule d'ADN. Nous avons caractérisé au préalable cette lésion comme une des plus toxiques pour la cellule. Paradoxalement, la cellule possède une enzyme appelée Spo11 ou Rec12 chez *S. pombe* capable d'introduire des cassures double brin et ainsi d'initier la recombinaison méiotique (Bergerat et al., 1997; Keeney et al., 1997). Ce processus doit être extrêmement bien contrôlé, pour éviter que ces cassures double brin ne soient létales pour la cellule.

Les extrémités de la cassure double brin vont être réséquées par la machinerie de résection MRN, amenant à la formation d'une extrémité 3' sortante simple brin (Garcia et al., 2011). Au contraire de la réparation des cassures double brin décrites ci-dessus, il existe deux recombinaisons en méiose capable d'entraîner la réparation des cassures : Rad51 et Dmc1 (Bishop et al., 1992; Shinohara et al., 1992). Chez *S. cerevisiae*, les deux sont requises pour produire des spores viables, mais l'activité d'échange de brin de Rad51, quant à elle n'est pas requise. Il semblerait que Rad51 ait un effet régulateur sur Dmc1 qui, lui, permet l'échange de brin (Cloud et al., 2012). Les intermédiaires de recombinaison en découlant sont gérés entre autres par des nucléases. Cependant, leur exact implication est resté sombre (Santos et al., 2001, 2003) jusqu'aux travaux de l'équipe de Neil Hunter. Ils ont pu montrer que chez *S. cerevisiae*, les crossing over méiotiques pouvaient s'effectuer en absence de résolvas (Mus81-Mms4, Slx4-Slx1 et Yen1) (Zakharyevich et al., 2012). C'est ainsi que le complexe Mlh1 et Mlh3 a été découvert comme participant majoritairement au crossing over (**Figure 19**). De manière remarquable, chez *S. cerevisiae* il a récemment été reconstitué *in vitro* la régulation du complexe Mlh1-Mlh3 (Cannavo et al., 2020).

Au contraire, chez *S. pombe*, les mutants de la seule résolvas *mus81* et *eme1* subissent de profonds défauts méiotiques (Boddy et al., 2000b, 2001; Osman et al., 2003). En accord avec ces résultats, la surexpression de la résolvas humaine Gen1 est suffisante pour restaurer les phénotypes des mutants *mus81* (Lorenz et al., 2009), ce qui signifie que, au moins chez *S. pombe*, Mus81-Eme1 est la résolvas capable de gérer les jonctions de Holliday.

III ROLE DE MUS81-EME1 EN REPONSE A UN STRESS REPLICATIF

1. REDEMARRAGE DES FOURCHES APRES UN STRESS REPLICATIF

Comme indiqué ci-dessus, le ralentissement ou l'arrêt de la progression des fourches de réplication représente un stress pour la cellule (stress réplicatif). Au niveau d'une fourche de réplication bloquée, la conservation de l'intégrité du réplisome peut-être suffisante pour reprendre la réplication. Un arrêt de la progression d'une fourche de réplication peut également être compensé par l'arrivée d'une fourche convergente (Ge et al., 2007; Ibarra et al., 2008; Kawabata et al., 2011; Woodward et al., 2006). Cette possibilité est néanmoins limitée à la présence d'origines de réplication voisines. Dans des régions pauvres en origines de réplication, un blocage de la fourche peut aboutir à la présence de régions génomiques non répliquées (Lambert et al., 2005; Letessier et al., 2011; Tallec et al., 2011). Un cas d'école est illustré par l'expression des sites fragiles (CFS). L'étude de ces sites fragiles a d'ailleurs permis de mettre en évidence récemment un mécanisme de synthèse d'ADN en mitose (MiDAS) permettant d'assurer la complétion de la réplication du génome et de prévenir les événements de mauvaise ségrégation des chromosomes. Une fourche de réplication bloquée peut également subir un remodelage. La réversion de fourche, par exemple, a été proposé comme un mécanisme qui permettrait de ré-initier la réplication au-delà d'un obstacle (Michel et al., 2007; Septenville et al., 2012). Enfin, un processus actif peut également contribuer à l'effondrement de la Fourche sous l'action de SSE, qui nécessitera dès lors la machinerie de recombinaison pour rétablir une structure répllicative. La réponse à un stress réplicatif sera abordée dans les sections suivantes avec une vue centrée sur le contrôle des endonucléases et en particulier de Mus81-Eme1 (**Figure 24-28**).

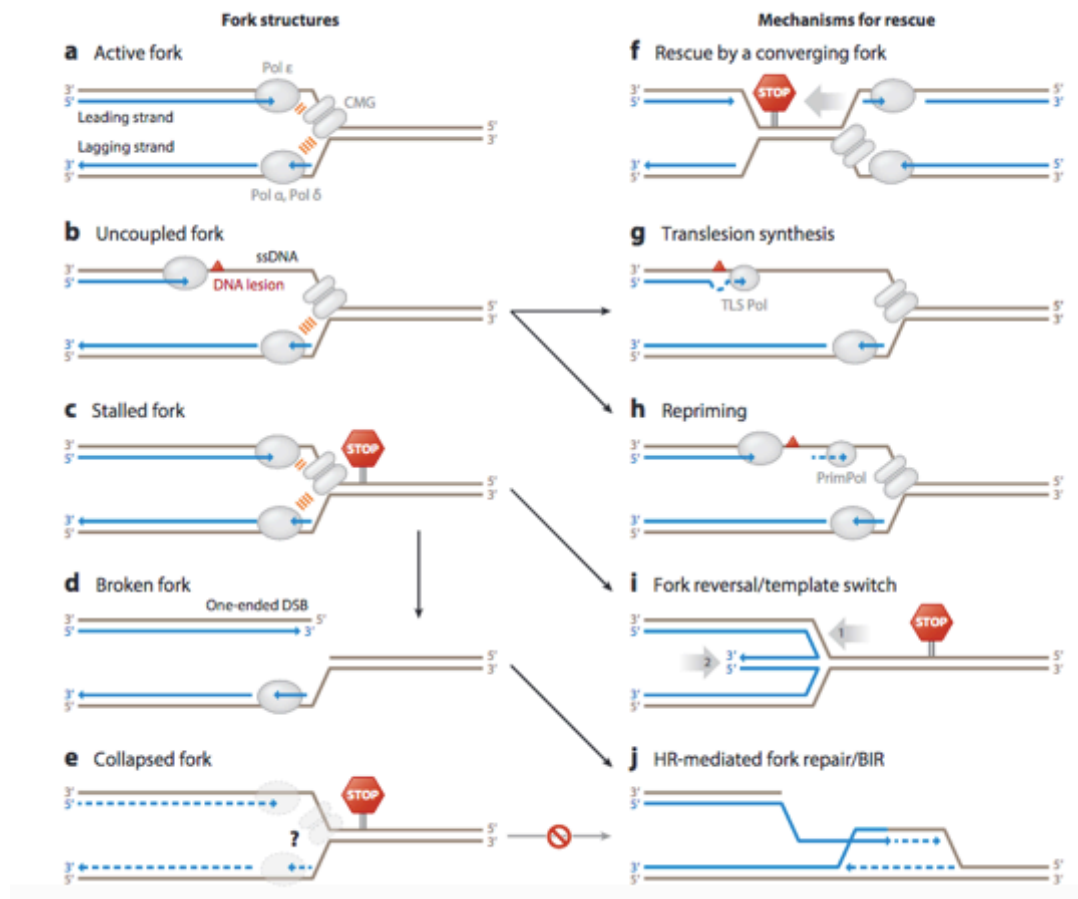


Figure 24. Mécanismes proposés pour restaurer une fourche de réplication perturbée. Récupération des fourches de réplication stressées. Cette figure illustre les différents types de structures de fourche (A-E) observées sous contrainte de réplication conditions et les mécanismes utilisés par les cellules eucaryotes pour les sauver (F-J). (A) Représentation simplifiée d'une fourche de réplication eucaryote montrant le débobinage des brins d'ADN parentaux par le complexe hélicase Cdc45 / MCM2-7 / GINS (CMG) et l'ADN polymérases agissant sur les brins continue et discontinue. Les CMG et les ADN polymérases s'associent à de nombreux facteurs supplémentaires à fourches de réplication pour former le réplisome. Les lignes orange représentent les interactions physiques entre le complexe CMG et l'ADN polymérases. (B) des obstacles (ici des lésions d'ADN) peuvent bloquer la progression des ADN polymérases, conduisant à un découplage des activités de polymérase et d'hélicase et à une augmentation de l'ADN simple brin (ADNsb) à la fourche. (C) Les fourches de réplifications se bloquent lorsqu'elles rencontrent des obstacles empêchant la progression du réplisome. (D) Elle peuvent également être cassées lorsqu'elles rencontrent une lésion de l'ADN, une cassure simple brin ou lorsqu'une fourche bloquée est clivée par une endonucléase à spécificité de structure. Cela conduit à la formation d'un seDSB. (E) Une Fourche qui ne peut pas être redémarrée ou sauvée finira par s'effondrer. L'effondrement de la fourche correspond à une inactivation irréversible de la fourche. (F) Une fourche bloquée peut être secourue par une fourche active progressant à partir d'une originie adjacente. (G) Les lésions à l'ADN peuvent être contournées par la synthèse d'ADN translésionnel (TLS). (H) Les lésions sur le brin continue peuvent également être contournées en réamorçant la synthèse en aval de la lésion avec la primase humaine PrimPol. (I) Les brins d'ADN nouvellement répliqués peuvent également s'hybrider à des fourches bloquées, entraînant des remodelages de la fourche. (J) Les fourches cassées peuvent être réparées par recombinaison homologue (HR) incluant la réplication induite par les cassures (BIR). D'après Pasero et Vindigni, 2017.

2. LA FOURCHE BLOQUEE

L'hydroxyurée (HU), un inhibiteur de la ribonucléotide réductase, entraîne une déplétion du pool de dNTPs et un arrêt de la progression des fourches de réplication. En réponse à un traitement HU, le checkpoint intra-S joue un rôle crucial dans la stabilisation du réplisome au niveau de la fourche bloquée de manière à prévenir son effondrement. Chez *S. pombe*, un traitement à l'HU entraîne l'activation du checkpoint intra-S (voir chapitre 2 partie II.2 Checkpoint intra-S) et l'activation de la kinase Cds1. Un des rôles de Cds1 est d'exclure Mus81-Eme1 de la chromatine de manière de prévenir son action opportuniste sur la fourche bloquée ou en cours de remodelage. Ce remodelage peut faire intervenir la réversion de fourche, une structure à quatre voies structurellement identiques à une HJ, un substrat de Mus81-Eme1. En absence de Cds1 ou dans un mutant de la polymérase alpha, Mus81-Eme1 va contribuer à l'effondrement de la fourche de réplication (Froget et al., 2008). Ces données soulignent la fonction du checkpoint intra-S dans la limitation de la dissociation du réplisome et la protection des fourches d'une action opportuniste de Mus81-Eme1.

3. LA REVERSION DE FOURCHE

La conversion de la fourche de réplication en fourche réversée est due à la ré-hybridation des brins parentaux et l'hybridation des brins néosynthétisés. Il en résulte une structure à 4 branches ressemblant à la jonction de Holliday et initialement appelée « chicken foot ». Ce remodelage peut résulter : 1) de la régression de la fourche de réplication à cause des contraintes topologiques en aval de la fourche 2) d'une pause de la fourche de réplication au niveau de séquences d'ADN répétées ou 3) de l'action de translocases/hélicases (Atkinson and McGlynn, 2009; Follonier et al., 2013; Fouché et al., 2006; Postow et al., 2001). Cette structure a été initialement proposée par Higgins et al., comme étant une voie de contournement et de tolérance de dommages dans les cellules de mammifères (Higgins et al., 1976). D'autres études suggèrent que la fourche réversée est un intermédiaire de réplication favorisant la stabilisation et le redémarrage, notamment par la recombinaison homologue (Ahuja et al., 2016; Atkinson and McGlynn, 2009; Berti et al., 2013; Chaudhuri et al., 2012; Zellweger et al.,

2015). Il n'est donc pas exclu que la réversion de fourche puisse coordonner différents processus en réponse au stress réplicatif.

La réversion de fourche chez les métazoaires est observée entre autres en réponse à de faibles doses d'HU, de CPT et de MMS et implique l'intervention de RAD51 et de translocases (SMARCA1, ZRANB3, HLTF et FBH1) (Ahuja et al., 2016; Chaudhuri et al., 2012; Fugger et al., 2015; Kolinjivadi et al., 2017; Mijic et al., 2017; Zellweger et al., 2015).

Parmi les déterminants moléculaires impliqués dans la réversion de fourche, plusieurs hélicases/translocases ont été identifiées et vont rentrer en compétition avec des nucléases avec qui elles partagent le même substrat (**Figure 25**). Les premières études chez la levure fissionnaire ont pu montrer qu'en absence du checkpoint intra-S, les fourches réversées sont la cible de l'activité nucléolytique de Mus81-Eme1 et Slx4-Slx1, ce qui contribue à augmenter le nombre de cassures chromosomiques (Froget et al., 2008). Par la suite, des travaux dans les cellules mammifères ont montré que même en présence d'un checkpoint intra-S fonctionnel, les fourches réversées peuvent être également clivées par MUS81 (Fugger et al., 2015; Hanada et al., 2007; Lai et al., 2017; Marco et al., 2017; Rondinelli et al., 2017). De plus, récemment, il a été montré qu'en absence de BRCA2, MUS81 peut cliver la fourche réversée ayant préalablement subi une résection par MRN/EXO1 et ainsi permettre le redémarrage de la fourche (Lemaçon et al., 2017).

Cependant, les mécanismes moléculaires du réassemblage du réplisome au niveau de la fourche ainsi que son redémarrage restent encore flous et méritent davantage de travaux.

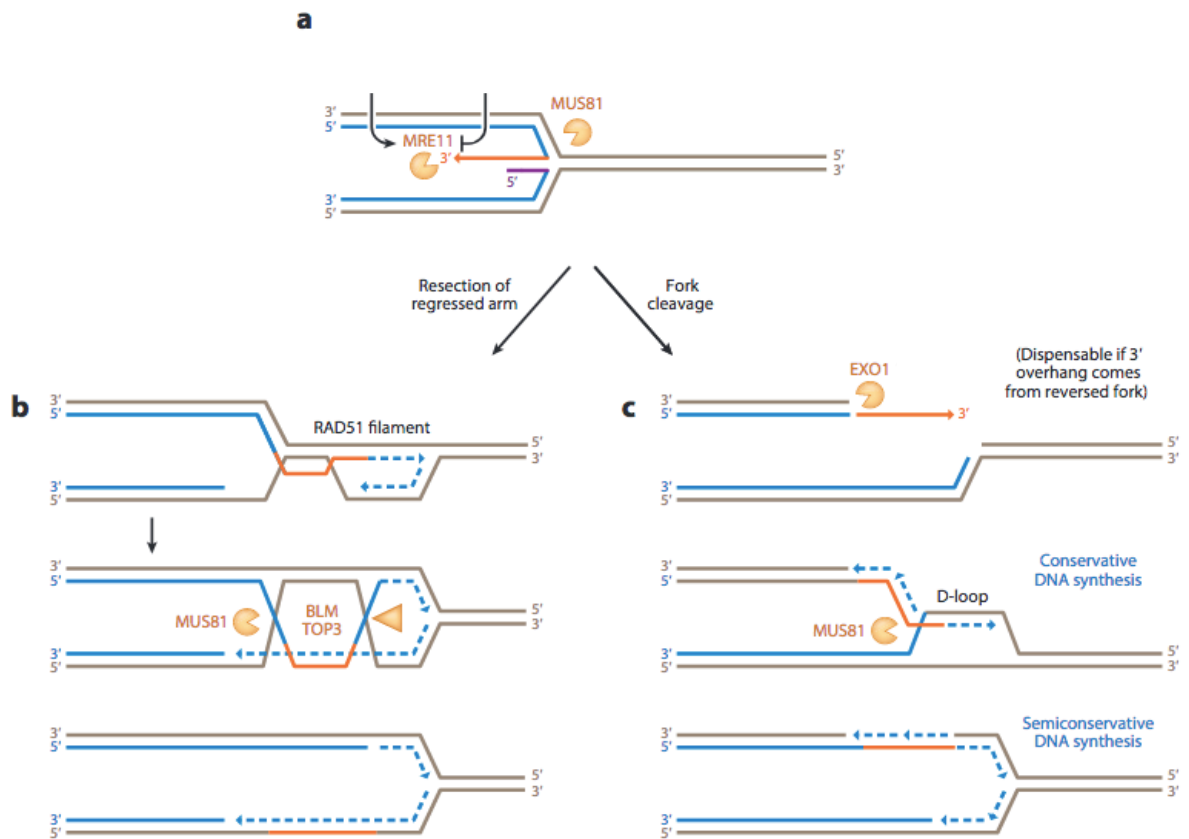


Figure 25. Rôle de l'endonucléase Mus81-Eme1 dans le redémarrage des fourches arrêtées et réversées.
A. Les fourches de réplication réversées peuvent être redémarrées par deux mécanismes impliquant soit des endonucléases, soit des exonucléases. La digestion du brin 5' de la fourche régressée (violet) par MRE11 génère une extrémité sortante 3' (orange) qui peut être utilisée pour engager la recombinaison homologue
B. La recombinaison homologue conduit à la formation de jonctions Holliday, qui peuvent être résolues par MUS81 ou dissoutes par l'action combinée de TOP3 et de BLM. **C.** Le clivage de la fourche réversée partiellement réséquée par MUS81 ou une autre endonucléase génère une cassure double brin d'ADN à une extrémité (seDSB). La D-loop peut être clivée par MUS81 pour permettre le redémarrage de la fourche de réplication. Adapté de Pasero et Vindigni, 2017

4. LA FOURCHE EFFONDREE ET LA REPLICATION INDUITE PAR LES CASSURES

4.1 La réplication induite par les cassures ou BIR

Une fourche de réplication peut s'effondrer en rencontrant une coupure simple brin ou bien sous l'action d'endonucléases telles que Mus81-Eme1. Il en résulte une cassure double brin particulière car ne possédant qu'une seule extrémité aussi appelée single-ended double strand break (SE-DSB) (**Figure 26**). La réparation de ce type de cassure fait intervenir un mécanisme particulier appelé Break Induced Replication (BIR). Le BIR est initié par une résection 5'-3' au niveau du seDSB. Cependant, il semblerait qu'une résection extensive (par Exo1 et Sgs1) soit un facteur limitant pour l'induction du BIR (Lydeard et al., 2010a; Marrero and Symington, 2010). Comme le BIR requiert les mêmes acteurs moléculaires pour l'invasion du duplex homologue que le SDSA ou la réparation des cassures double brin canonique (DSBR) (Rad51, Rad52, Rad54, Rad55 et Rad57), c'est la présence d'une seule extrémité double-brin qui favoriserait le BIR. La recombinaise Rad51 est impliquée dans 95% des événements de réparation par BIR, toutefois, une voie indépendante de Rad51 mais dépendante de Rad52 a été mise en évidence (Malkova et al., 1996). Cette fonction s'explique par le fait que Rad52 possède également une capacité d'échange de brins (Bi et al., 2004; Davis and Symington, 2004; Kagawa et al., 2001) et nécessiterait au moins 72 paires de bases d'homologie pour engager le BIR (Bosco and Haber, 1998). L'invasion du duplex d'ADN va former une D-loop, qui va pouvoir migrer sur plusieurs kb grâce à l'action de l'hélicase Pif1. Le déplacement de la D-loop est concomitant de l'action des polymérases Pol α -primase et Pol δ qui sont impliquées dans l'extension initiale de la synthèse. La synthèse au-delà de 30 kb serait réalisée par Pole (Lydeard et al., 2007) mais ces données n'ont récemment pas été reproduits (Donnianni et al., 2019). Il semblerait également que Pol32 (sous-unité non catalytique de Pol δ) soit requise pour le BIR (Lydeard et al., 2007, 2010b). Des études *in vitro* montrent que la synthèse du brin complémentaire est aussi favorisée par l'hélicase Pif1 d'une part en déplaçant la D-loop et d'autre part en stimulant la synthèse d'ADN par Pol δ (Wilson et al., 2013).

Ce mode de réplication non-canonique est conservatif (i.e. les brins néo-synthétisés se retrouvent sur la même molécule d'ADN) et s'effectue sur plusieurs milliers de paires de

bases, voire sur le chromosome entier (Donnianni and Symington, 2013; Saini et al., 2013). Ce mode opératoire fait qu'il est une source de perte d'hétérozygotie et explique les événements de recombinaisons sur de très grandes régions d'ADN (>100Kb) (Malkova et al., 1996). Qui plus est, de manière paradoxale, la synthèse de l'ADN lors du BIR est plus mutagène que la synthèse canonique au cours de la phase S (Deem et al., 2011; Donnianni and Symington, 2013; Saini et al., 2013). Bien que nous ne comprenions pas pourquoi, les polymérases répliquatives sont moins fidèles et l'efficacité de la réparation des mésappariements est diminuée (Deem et al., 2011).

D

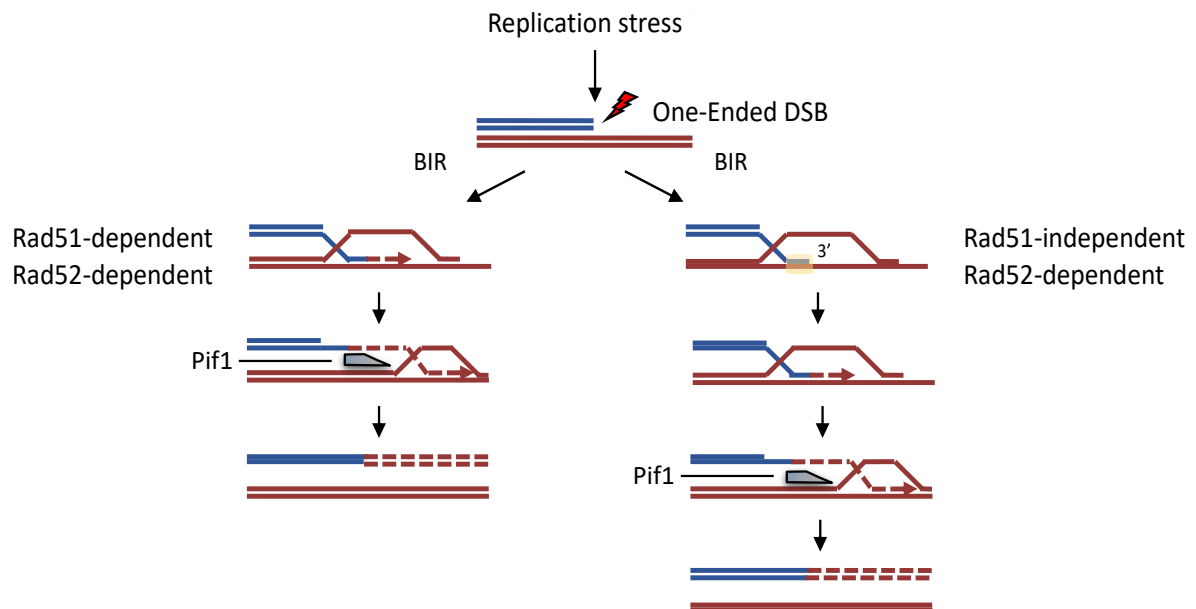


Figure 26. Réparation des seDSB par la réplication induite par les cassures ou BIR.

4.2 Rôle de Mus81-Eme1 au cours du BIR

Les premières évidences du BIR pour la réparation des fourches cassées en phase S ont été rapportées par les travaux de Moriel-Carretero et Aguilera chez *S. cerevisiae*. Ces travaux montrent qu'une fourche de réplication cassée est majoritairement réparée, en phase S, de façon dépendante de Rad51 et dans une moindre mesure via un mécanisme dépendant de Pol32 (Moriel-Carretero and Aguilera, 2010). L'utilisation du BIR en phase S est néanmoins limitée. Des travaux du groupe de G. Ira ont mis en évidence un rôle crucial de Mus81-Eme1 dans l'incision de la D-loop formée lors de l'initiation du BIR de manière à privilégier la réplication par une fourche convergente (Mayle et al., 2015). Ce mécanisme permet ainsi de limiter le potentiel mutagène d'une réplication par le BIR.

Une réplication incomplète, notamment au niveau des sites fragiles, peut entraîner leur expression par l'action de nucléases et faire intervenir un mécanisme de réparation proche du BIR de phase S (Naim et al., 2013; Ying et al., 2013). Des études chez les métazoaires ont mis en évidence un rôle des SSEs SLX4-SLX1 et MUS81-EME1 dans l'incision de fourches au niveau de zones non-entièrement répliquées (Guervilly et al., 2015; Minocherhomji et al., 2015; Naim et al., 2013; Pedersen et al., 2015; Ying et al., 2013). Ce processus nucléolytique permet la mise en place d'une synthèse d'ADN en mitose ou MiDAS et sera discuté dans la partie 5 de ce chapitre

4.3 Gestion des lésions après un traitement camptothécine

Au cours de la réplication, l'ouverture de la double hélice d'ADN entraîne l'accumulation de supertours dans l'ADN. Des protéines spécialisées, appelées topoisomérases permettent de relâcher ces contraintes en coupant un brin d'ADN (Hsiang et al., 1985; Pommier et al., 2016). Pendant cette réaction, la topoisomérase 1 reste attachée de manière covalente à l'extrémité 3'OH de la cassure, formant un « complexe de clivage » (Top1cc), avant relâchement des contraintes et religation de la cassure. Il existe des mécanismes cellulaires pour gérer ces DPC, chez *S. pombe* par exemple la protéine Tdp1 enlève les Top1cc, et la protéine Pnk1 gère les

extrémités de la cassure pour permettre la religation ([Hassine and Arcangioli, 2009](#); [Kashkina et al., 2012](#); [Schellenberg and Williams, 2011](#)).

La camptothécine est un alcaloïde capable d'inhiber l'activité de la topoisomérase I en la bloquant au stade du Top1cc. Il a longtemps été admis que la fourche de réplication s'effondrait passivement lors de son encounter avec la cassure simple brin au niveau du Top1cc résultant en un seDSB, lequel constituerait un substrat pour le BIR ([Hsiang et al., 1989](#)). Par la suite, les travaux de l'équipe de Y. Pommier ont suggéré que la progression de la fourche de réplication en direction du complexe Top1cc bloque la fourche de réplication et devient le substrat de nucléases qui vont contribuer à son effondrement et sa réparation par la recombinaison homologue ([Regairaz et al., 2011](#)). Depuis, les travaux de M. Lopes ont montré qu'il existait une autre alternative. Plutôt qu'une structure pathologique issue d'un contexte déficient pour les checkpoints, la réversion de fourche serait physiologique et représenterait un intermédiaire structurel stable permettant aux mécanismes de réparation de gérer la lésion. Il a de plus été montré que le traitement à la CPT dans des cellules de levures induit une réversion de fourche suite à l'accumulation de contraintes topologique ([Chaudhuri et al., 2012](#); [Menin et al., 2018](#)). Il a été également proposé que l'endonucléase Mus81-Eme1 pouvait cliver la fourche réversée pour promouvoir la réparation par recombinaison homologue ([Hanada et al., 2007](#)). Dans ces deux alternatives, une simple jonction de Holliday est générée au cours du processus de réparation par la HR et requiert inévitablement l'action de Mus81-Eme1 pour son élimination ([Hanada et al., 2007](#); [Roseaulin et al., 2008](#)).

Enfin, le modèle le plus récent proposé suggère également que la CPT contribuerait à la réversion de la fourche de réplication et favoriserait l'élimination du complexe Top1cc (**Figure 27**) ([Pardo et al., 2020](#)). La fourche réversée pourrait servir de substrat pour la recombinaison homologue et permettrait de reprendre la réplication par le BIR. La D-loop provenant du BIR pourrait fusionner avec une fourche convergente ce qui produirait une simple jonction de Holliday. Cette simple jonction de Holliday serait gérée par Mus81-Mms4 pour promouvoir la terminaison de la réplication ([Pardo et al., 2020](#)). Il reste à déterminer si tous ces modèles co-existent ou s'ils sont propres aux espèces dans lesquels ils ont été étudiés.

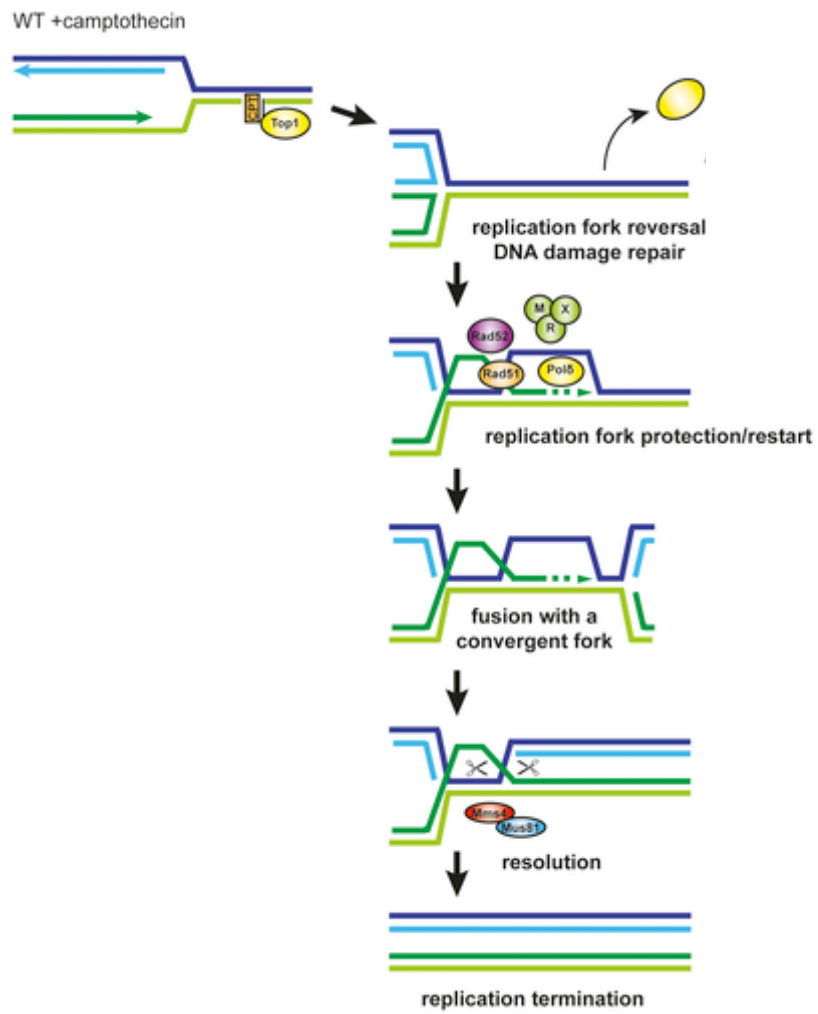


Figure 27. Rôle de l'endonuclease Mus81-Eme1 dans le redémarrage des fourches arrêtées par la CPT.
Adapté de Pardo et al. 2020.

5. STRESS REPLICATIF ET MITOSE

5.1 Les ponts anaphasiques

La présence de régions non répliquées en G2 et en mitose représente un danger pour le maintien de la stabilité du génome. Lors de la mitose, ces régions ne pourront pas être correctement ségréguées et vont former des ponts anaphasiques.

Il existe deux classes de ponts anaphasiques. La première classe correspond aux ponts chromatinien car ils contiennent des histones et peuvent être révélés grâce à des agents intercalant de l'ADN tels que le DAPI ([Chan et al., 2007, 2009](#); [Wilhelm et al., 2014](#)). La seconde classe de ponts mitotiques est représentée par les UFBs (pour Ultrafine Bridges). Les UFBs sont réfractaires à un marquage au DAPI et correspondent à des structures d'ADN étirées ([Baumann et al., 2007](#); [Biebricher et al., 2013](#); [Chan et al., 2007](#)). Les UFBs peuvent être subdivisés en trois sous-classes : C-UFB (pour centromeric UFB), T-UFB (pour telomeric UFB) et FS-UFB (pour fragile site UFB). Les C-UFBs comprennent des caténanes d'ADNdb et correspondent plutôt à des structures physiologiques résolues en mitose par la topoisomérase II ([Liu et al., 2014](#); [Rouzeau et al., 2012](#)). Les UFBs émanant des régions télomériques ou T-UFBs sont moins bien caractérisés. Ils sont préférentiellement observés dans les cellules exposées à un stress réplicatif (aphidicoline) et comprennent probablement des régions d'ADN non-répliquées ([Liu et al., 2014](#); [Sfeir et al., 2009](#)). Les FS-UFBs sont formés lorsque les cellules entrent en mitose avec un ADN non répliqué aux CFSs. Les FS-UFBs sont caractérisés par la présence de régions d'ADN simple brin révélées par la fixation de RPA ([Chan et al., 2009](#)). La résolution des UFBs implique l'intervention de différentes hélicases/translocases (telles que BLM, PICH et RIF1) dont l'absence conduit à une augmentation de la fréquence des UFBs et de leur cassure ([Baumann et al., 2007](#); [Chan et al., 2007](#); [Hengeveld et al., 2015](#); [Rouzeau et al., 2012](#)). Ainsi, des séquelles du stress réplicatif peuvent être retrouvées dans les cellules filles en G1. Cela se traduit par la présence de dommages (révélées par des foyers 53BP1 en G1 appelée « 53BP1 bodies ») et la formation de micronoyaux ([Gelot et al., 2015](#); [Lukas et al., 2011](#)).

5.2 Synthèse d'ADN mitotique

Les sites fragiles sont des zones complexes à répliquer. La pauvreté en origine de réplication, les conflits réplication-transcription sont autant de situations à même de gêner la réplication complète du génome. L'expression des sites fragiles reflète l'apparition de cassures d'ADN au niveau de ces sites suite à leur réplication incomplète. Bien qu'initialement qualifiées d'opportunistes, ces cassures se sont révélées être le résultat d'un processus actif, sous contrôle des endonucléases MUS81-EME1 et XPF ([Naim et al., 2013](#); [Ying et al., 2013](#)).

Plus récemment, le groupe de I. Hickson a mis en évidence un mécanisme de sauvetage des zones non-entièrement répliquées basée sur un mécanisme similaire au BIR. Dans des cellules exposées à un stress réplicatif, une synthèse d'ADN en prométaphase de mitose a été observée au niveau des sites fragiles communs et des télomères ([Bhowmick et al., 2016](#); [Dilley et al., 2016](#); [Minocherhomji et al., 2015](#); [Roumelioti et al., 2016](#)). Cette synthèse tardive a été nommée MiDAS (pour Mitotic DNA Synthesis) ([Minocherhomji et al., 2015](#)).

D'un point de vue mécanistique les intermédiaires de réplication aberrants, notamment au niveau des sites fragiles communs, peuvent être résolus avant la progression des cellules en anaphase. Il est proposé que la synthèse mitotique reflète des événements de BIR médiés par de la micro-homologie ([Bhowmick et al., 2016](#); [Minocherhomji et al., 2015](#)). En effet, RAD51 et BRCA2 agissent plutôt en phase S/G2 et réduiraient probablement le recours à la voie du MiDAS ([Bhowmick et al., 2016](#); [Sirbu et al., 2011](#); [Zellweger et al., 2015](#)). Dans cette situation, le MiDAS est dépendant de RAD52 et indépendant de RAD51 et BRCA2. L'endonucléase MUS81-EME1, dont le recrutement est dépendant de RAD52 et de l'hélicase RECQ5 ([Bhowmick et al., 2016](#); [Marco et al., 2017](#)), est retrouvée au niveau des sites fragiles communs en prophase et opère un clivage afin d'initier le BIR et d'amorcer une synthèse d'ADN par POL δ ([Marco et al., 2017](#); [Minocherhomji et al., 2015](#); [Naim et al., 2013](#); [Ying et al., 2013](#)).

IV REGULATION DU COMPLEXE MUS81-EME1

Le complexe MUS81-EME1 possède la capacité d'inciser différentes structures secondaires d'ADN, telles que 3' Flap, les D-loop, les jonctions de Holliday et les fourches de réplifications. Ainsi, il a été proposé dès le début des années 2000 qu'en absence d'une régulation stricte, l'activité de Mus81-Eme1 pouvait avoir des conséquences délétères sur le génome (Kai et al., 2005). Ces dernières années, de multiples études ont montré que les fonctions de Mus81-Eme1 sont finement modulées, entre autres, par des modifications post-traductionnelles. Ces dernières permettent de moduler l'activité catalytique de MUS81-EME1, son association avec d'autres nucléases, sa localisation intra-nucléaire.

Les mécanismes impliqués dans ces différents niveaux de contrôles vont être décrits dans la section suivante (**Figure 28**).

1. REGULATION DU COMPLEXE MUS81-MMS4 CHEZ *S.*

CEREVISIAE

L'activité catalytique de Mus81-Mms4 fluctue au cours du cycle cellulaire, avec une activité minimale en G1/S et maximale en G2/M (Matos et al., 2011). En fin de phase G2 et en mitose, la sous-unité Mms4 du complexe Mus81-Eme1 est hyperphosphorylée par les kinases Cdc28^{CDK1}, Cdc5^{PLK1} et Cdc7-Dbf4 (Gallo-Fernández et al., 2012; Gritenaite et al., 2014; Matos et al., 2011; Princz et al., 2017). Ces modifications post-traductionnelles corrélerent avec une stimulation de l'activité du complexe (Gallo-Fernández et al., 2012; Matos et al., 2011; Szakal and Branzei, 2013). Suite à un traitement phosphatase, l'activité nucléase de Mus81-Mms4 est réduite au niveau basal, indiquant que la stimulation du complexe est une conséquence directe de la phosphorylation de Mms4 (Matos et al., 2011).

Il a de plus été montré que les phosphorylations de Mms4 par les kinases Cdc28^{CDK1}, Cdc5^{PLK1} et DDK contribuent à son interaction avec Rtt107 et Dpb11, qui eux même interagissent avec Slx4 (Princz et al., 2017). La formation de ce complexe multifactoriel semble contribuer à la stimulation du complexe Mus81-Mms4 et à son recrutement en G2/M, bien que sa fonction exacte reste incertaine (Princz et al., 2017). Ces données font émerger que les événements de

phosphorylation spécifique en fin de G2 et en mitose modulent les fonctions de Mus81-Mms4 à travers des mécanismes complémentaires : L'augmentation de l'activité nucléase de Mus81-Mms4 par phosphorylation mais aussi la régulation des interactions protéines-protéines.

L'hyperphosphorylation de Mms4 est-elle seule à l'origine de la stimulation catalytique de complexe Mus81-Mms4 ou joue-t-elle un rôle dans le recrutement de co-facteurs qui favoriseront une stimulation catalytique ? Cette question reste ouverte.

L'importance fonctionnelle de la phosphorylation de Mms4 et de la stimulation catalytique du complexe Mus81-Mms4 est révélée par l'observation d'une augmentation du taux de crossing-over dans des cellules exprimant un phospho-mimétique de Mms4 ([Szakal and Branzei, 2013](#)). De plus, il a été récemment montré que la forme phosphorylée de Mms4 était dégradée par le protéasome en sortie de mitose ([Waizenegger et al., 2020](#)). Le mécanisme de cette dégradation reste non complètement élucidé, mais semble faire intervenir la SUMOylation de la sous-unité Mms4 phosphorylée par le complexe ubiquitin ligase Cul8-Mms21-Esc2 et son ubiquitynilation par la STUbL Slx5-Slx8 ([Waizenegger et al., 2020](#)).

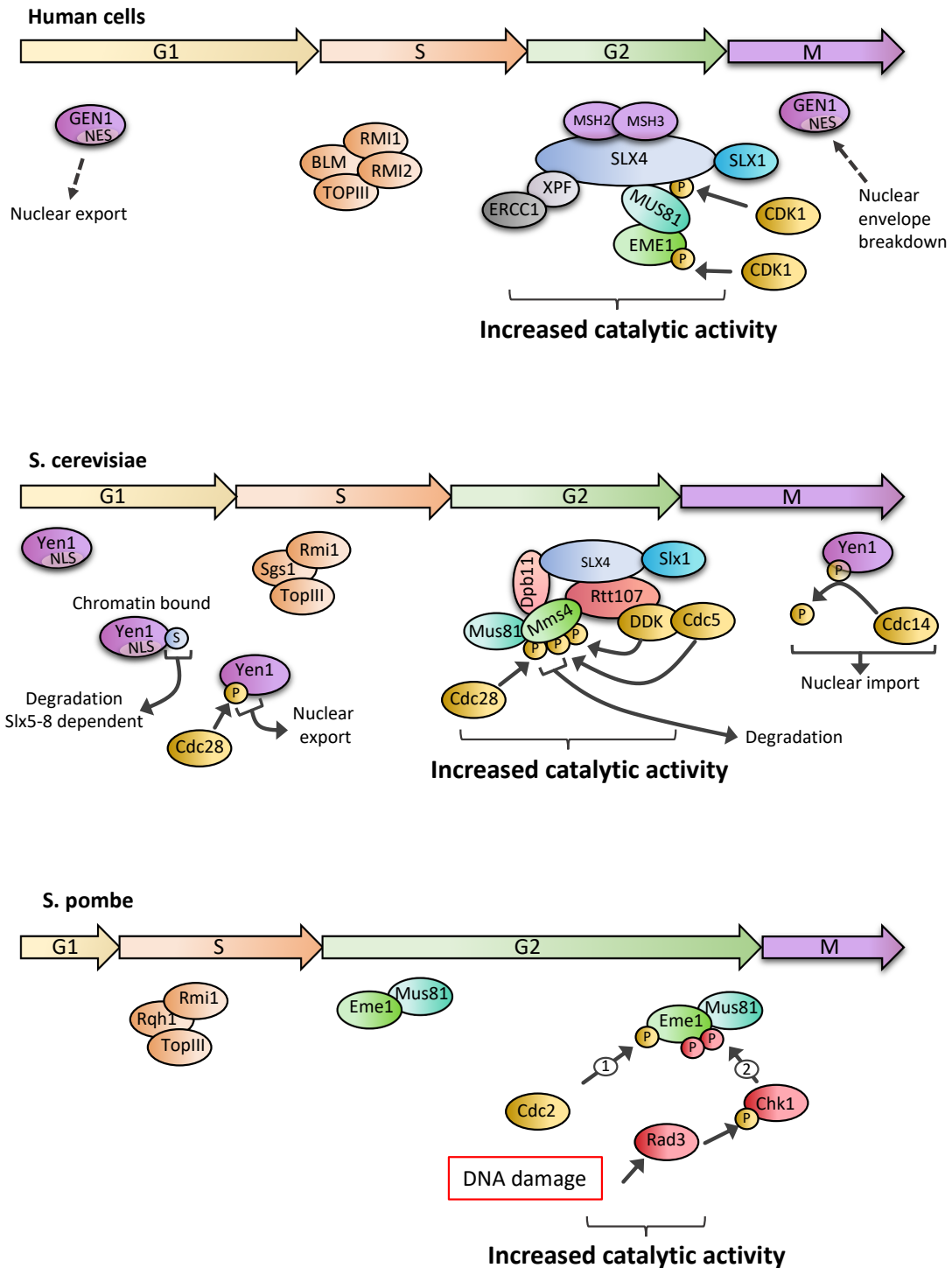


Figure 28. Régulation du complexe MUS81-EME1 et GEN1 chez les cellules humaines et les levures *S. cerevisiae* et *S. pombe*. Voir le texte pour les détails sur MUS81-EME1. Dans les cellules humaines, le contrôle de GEN1 repose sur un signal d'exportation nucléaire qui empêche GEN1 d'accéder aux chromosomes jusqu'à ce que la rupture de l'enveloppe nucléaire se produise lors de la mitose. Chez *S. cerevisiae*, Yen1^{GEN1} est phosphorylé par Cdc28^{CDK1} ce qui inhibe son activité catalytique et promeut son exclusion nucléaire. Ce contrôle inhibiteur de Yen1^{GEN1} est enlevé en anaphase après déphosphorylation par la phosphatase Cdc14. Yen1^{GEN1} s'avère également être ciblée pour la dégradation par la STUbL Slx5-Slx8 à la transition G1/S. Cette couche de régulation supplémentaire garantit que tout Yen1^{GEN1} actif associé à la chromatine qui reste à la fin de la phase G1 sera éliminé avant que les cellules n'entrent en phase S. NLS = Nuclear Localization Signal. NES = Nuclear Export Signal. P = Phosphate. S = SUMO.

2. REGULATION DU COMPLEXE MUS81-EME1 ET MUS81-EME2 DANS LES CELLULES HUMAINES

Chez l'humain, MUS81 assemble deux endonucléases à spécificité de structure en interagissant soit avec EME1, soit avec EME2. A l'heure actuelle, la régulation du complexe MUS81-EME1 est bien mieux établie que celle du complexe MUS81-EME2. Les deux complexes sont capables de gérer des structures branchées d'ADN *in vitro*, et MUS81-EME2 possède une activité nucléase plus robuste ainsi qu'une plus large spécificité de substrats, incluant les extrémités 5' sortantes ([Amangyeld et al., 2014](#); [Pepe and West, 2014b, 2014a](#)).

Les sous-unités MUS81 et EME1 apparaissent phosphorylées en réponse au nocodazole. La phosphorylation d'EME1 est dépendante de la kinase CDK1 et dans une moindre mesure de PLK1. De plus, le complexe MUS81-EME1, partiellement purifié de cellules traitées au nocodazole, présentent une activité catalytique stimulée en comparaison du complexe provenant de cellules asynchrones. Il a ainsi été proposé que les mécanismes de stimulation de MUS81-EME1 sont conservés de la levure à l'homme ([Duda et al., 2016](#); [Matos et al., 2011](#)). Tout comme pour la levure, la question de la contribution de la phosphorylation d'EME1 dans l'activité catalytique du complexe MUS81-EME1 reste entière. Néanmoins, les cellules humaines semblent posséder un autre niveau de régulation. La phosphorylation par CDK1 de la sous-unité SLX4 de l'endonucléase, SLX4-SLX1 contribue à son interaction avec MUS81-EME1. Cette interaction est médiée par la phosphorylation par CDK1 dans le domaine SAP de SLX4 et par la phosphorylation par CK2 au niveau de la région N-terminale de MUS81 ([Duda et al., 2016](#); [Palma et al., 2018](#)). L'assemblage de ce complexe MUS81-EME1-SLX4-SLX1 (SM) ([Wyatt et al., 2013](#)) contribuerait à lever une auto-inhibition de MUS81-EME1 médiée par le domaine HhH de MUS81 ([Wyatt et al., 2017](#)). De plus, l'assemblage du complexe SM est proposé comme permettant une coordination des incisions de la HJ avec une première incision faite par SLX1-SLX4 et la deuxième par MUS81-EME1 ([Wyatt et al., 2013](#)).

L'assemblage du complexe SM est coordonné avec la progression du cycle cellulaire, une inhibition de la kinase WEE1 entraîne une dé-repression de CDK1, une phosphorylation de SLX4 précoce et un assemblage du complexe SM avant la complétion de la phase S ([Duda et al., 2016](#); [Matos et al., 2011](#)). Il en résulte un phénotype dramatique de pulvérisation des

chromosomes par une action du complexe SM sur des régions en cours de réplication (Duda et al., 2016; Matos et al., 2011). Il apparaît ainsi que le contrôle des endonucléases est crucial pour le maintien de la stabilité du génome.

La complexité de la régulation des endonucléases est loin d'avoir été élucidée. En effet, des études *in vitro* montrent que chez l'homme, l'endonucléase XPF-ERCC1 et le complexe MSH2-MSH3 s'associent également au complexe SM pour moduler son activité (Wyatt et al., 2017; Young et al., 2020). Par quels moyens ces protéines modulent l'activité du complexe SM reste encore à déterminer.

De plus, une partie de ces travaux est réalisée *in vitro*, et pourrait ne pas être le reflet de ce qu'il se passe *in vivo*. D'autres travaux sont donc nécessaires pour confirmer ces mécanismes de résolution des jonctions de Holliday *in vivo*.

Bien que la régulation de MUS81-EME1 soit d'ores et déjà complexe, le contrôle des endonucléases prend encore une autre tournure avec l'existence d'un deuxième complexe MUS81-EME2. Les premiers travaux sur la régulation de MUS81-EME1 et MUS81-EME2 suggéraient qu'EME1 s'associe avec MUS81 tout au long du cycle cellulaire (Matos et al., 2011) alors que le complexe MUS81-EME2 ne s'assemble qu'exister que pendant la phase S (Pepe and West, 2014b). Ces résultats n'ont pas été confirmés et EME1 et EME2 forment un complexe avec MUS81 quelles que soient les phases du cycle (Duda et al., 2016; Matos et al., 2011). De plus, actuellement aucune donnée ne montre d'interaction entre la sous-unité SLX4 et le -complexe MUS81-EME2. La seule donnée fonctionnelle *in vivo* sur MUS81-EME2 a été obtenue dans un contexte où CHK1 est déficient. En absence de checkpoint, MUS81-EME2 contribuerait à l'apparition de dommages qui influenceraient la progression et la vitesse de la fourche de réplication (Técher et al., 2016). Il semblerait donc que les fonctions de MUS81-EME1 et MUS81-EME2 diffèrent fonctionnellement mais la régulation de ces endonucléases est loin d'être claire.

Bien que ce chapitre et mes travaux de thèse ne se concentrent que sur la nucléase Mus81-Eme1, il reste important de noter que dans les cellules mammifères et chez *S. cerevisiae*, l'endonucléase à spécificité de structure GEN1^{Yen1} (Ip et al., 2008; Matos et al., 2011) est également régulé de manière spatio-temporelle. Cette dernière peut agir sur des molécules jointes comme des dHJ. Elle agirait en fin de mitose et servirait principalement de dernier

recours pour les structures secondaires n'ayant toujours pas été résolues avant la sortie de la mitose (Blanco et al., 2014; Eissler et al., 2014; Matos et al., 2011; Talhaoui et al., 2018). Son mode de régulation est résumé dans la **figure 27**. Comme indiqué précédemment, *S. pombe* ne possède pas d'orthologue de GEN1. La compréhension des mécanismes de régulation de la seule résolvasse chez *S. pombe*, Mus81-Eme1 est donc essentiel.

3. REGULATION DU COMPLEXE MUS81-EME1 CHEZ *S. POMBE*

Le complexe Mus81-Eme1 de chez *S. pombe* a été la première nucléase nucléaire eucaryote identifiée comme une résolvasse (Boddy et al., 2001). Mus81 a été initialement décrit comme un interacteur du domaine FHA de la kinase Cds1 (Boddy et al., 2000b). Après un traitement HU, le checkpoint intra-S va activer Cds1 qui va phosphoryler Mus81 sur sa Thr239 et entraîner la dissociation de Mus81-Eme1 de la chromatine (Kai et al., 2005). Bien que la phosphorylation de Mus81 par Cds1 n'influe pas sur l'activité catalytique de Mus81-Eme1, cette modification prévient une action opportuniste de l'endonucléase sur des structures générées après un traitement HU.

Tout comme *S. cerevisiae* et l'humain, la sous-unité Eme1 de *S. pombe* est phosphorylée par la kinase Cdc2^{CDK1} en phase G2 et en mitose (Dehé et al., 2013). Bien que conservée, la kinase Plo1^{PLK1} ne semble pas à l'heure actuelle impliquée dans la modification post-traductionnelle d'Eme1 (Dehé et al., 2013).

De manière surprenante, la phosphorylation d'Eme1 au cours du cycle ne semble pas affecter l'activité catalytique du complexe Mus81-Eme1 mais servirait de pré-requis pour une deuxième vague de phosphorylation. C'est la présence de dommages et l'activation de la voie de réponse aux dommages qui stimule l'activité catalytique de Mus81-Eme1. Cette stimulation est corrélée avec la phosphorylation d'Eme1 par les kinases Rad3 et Chk1 (Dehé et al., 2013).

Le mécanisme de phosphorylation bimodale de la sous-unité Eme1 contribue ainsi à contenir l'hyper-activation du complexe Mus81-Eme1 à une phase restreinte du cycle cellulaire. De plus, ce mécanisme de contrôle s'avère crucial pour garantir la stabilité du génome en absence de l'hélicase Rqh1^{BLM} (Dehé et al., 2013).

V. BALANCE ENTRE HELICASE ET NUCLEASE : HELICASES DE LA FAMILLE BLM VS MUS81-EME1

Comme exposé dans la section réparation des cassures double brin, l'hélicase BLM^{Sgs1/Rqh1} et l'endonucléase MUS81-EME1 peuvent partager des substrats similaires, comme la double jonction de Holliday, mais également les D-loop et les fourches de réplifications. De cette intrigante observation est née la question de la régulation de la balance entre l'activité hélicase de BLM^{Sgs1/Rqh1} et l'activité nucléase de MUS81-EME1 sur le même substrat. Il était admis que l'hélicase BLM agissait tout au long du cycle cellulaire pour empêcher l'accumulation de substrat pour les SSE. Ces SSE agissaient en dernier recours en phase G2/M pour gérer les structures qui ont échappé à l'action de BLM. Cependant, les mécanismes moléculaires impliqués sont encore sombres et à l'heure actuelle, il n'existe que très peu de travaux qui ont disséqué cette balance. L'exemple à la fois le plus concret et le plus récent a été mis en avant par l'équipe de J. Matos ([Grigaitis et al., 2020](#)). Ils ont pu déterminer chez *S. cerevisiae* que Sgs1^{BLM} est phosphorylée de manière successive par la CDK de phase S puis par Cdc5^{PLK1}. La première phosphorylation augmente sa capacité d'ouverture de la double hélice de l'ADN en phase S alors que la phosphorylation par Cdc5^{PLK1} réduit au contraire cette capacité en G2/M ([Grigaitis et al., 2020](#)). En mettant en perspective ces résultats avec la régulation de Mus81-Mms4, on peut s'apercevoir que la régulation des deux protéines est partiellement opposée. Alors que la phosphorylation Cdc5^{PLK1} dépendante de Sgs1 réduit son activité en G2/M ([Grigaitis et al., 2020](#)), la phosphorylation Cdc5^{PLK1} dépendante de Mms4 augmente l'activité nucléase du complexe Mus81-Mms4 ([Matos et al., 2013](#)). De ce fait, il semblerait que chez *S. cerevisiae*, il existe au moins deux voies pour gérer les molécules jointes : une première reposant sur Sgs1 dès la phase S et une seconde se basant sur Mus81-Mms4 agissant en G2/M. Cette régulation permettrait de déterminer quel complexe doit agir à un moment précis sur des structures communes.

REVUE PUBLIEE DANS
CURRENT OPINION IN GENETICS
& DEVELOPMENT



Control of structure-specific endonucleases during homologous recombination in eukaryotes

Cédric Giaccherini and Pierre-Henri Gaillard

Structure-Specific Endonucleases (SSE) are specialized DNA endonucleases that recognize and process DNA secondary structures without any strict dependency on the nucleotide sequence context. This enables them to act virtually anywhere in the genome and to make key contributions to the maintenance of genome stability by removing DNA structures that may stall essential cellular processes such as DNA replication, transcription, repair and chromosome segregation. During repair of double strand breaks by homologous recombination mechanisms, DNA secondary structures are formed and processed in a timely manner. Their homeostasis relies on the combined action of helicases, SSE and topoisomerases. In this review, we focus on how SSE contribute to DNA end resection, single-strand annealing and double-strand break repair, with an emphasis on how their action is fine-tuned in those processes.

Address

Centre de Recherche en Cancérologie de Marseille, CRCM, Inserm, CNRS, Aix-Marseille Université, Institut Paoli-Calmettes, Marseille, France

Corresponding author:

Gaillard, Pierre-Henri (pierre-henri.gaillard@inserm.fr)

Current Opinion in Genetics & Development 2021, **71**:195–205

This review comes from a themed issue on **Homologous recombination in meiosis and repair**

Edited by **Eric C Greene** and **Rodney J Rothstein**

<https://doi.org/10.1016/j.gde.2021.09.005>

0959-437X/© 2021 The Author(s). Published by Elsevier Ltd. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

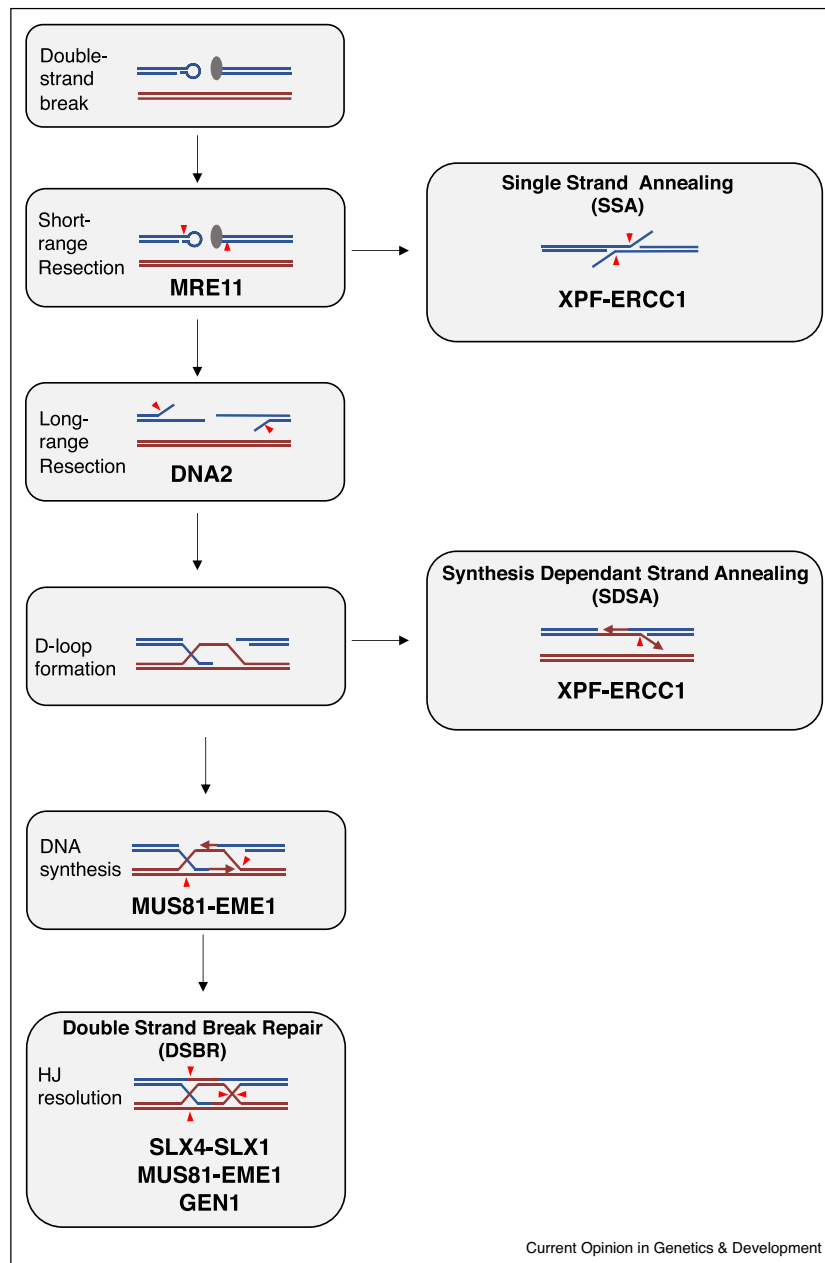
Introduction

Homology directed repair of DNA double-strand breaks (DSB) relies on elaborate DNA transactions that involve the formation of a variety of secondary DNA structures. These include double-stranded DNA ends, single-stranded DNA flaps as well as more complex structures such as displacement loops (D-loop) and Holliday junctions that are generated after the exchange of complementary strands between sister chromatids or homologous chromosomes (Figure 1). The homeostasis of these structures relies on the coordination of DNA processing enzymes including DNA helicases, topoisomerases and nucleases [1]. Here, we review the key contributions

made by so-called structure-specific endonucleases, a specialized class of nucleases that recognize and process secondary DNA structures without any strict dependency on the DNA sequence context. This enables them to act virtually anywhere in the genome and to process secondary DNA structures at multiple steps of HR mechanisms (Figure 1).

The first step in DSB repair by HR that relies on SSEs is the so-called end resection mechanism that promotes the 5' to 3' resection of a DNA double-stranded end (Figures 1, 2). It is a key process that generates a 3' single-strand overhang that will serve for homology search and annealing to the complementary homologous sequence in all HR pathways (Figures 1, 3). It is cell cycle regulated, occurring in S/G2 when a sister chromatid is available. Over the last two decades or so, tremendous efforts have been put into dissecting the ins and outs of this process with the latest developments reviewed in this issue [2]. We will focus here specifically on the tightly controlled action of MRE11 and DNA2 which are the two main SSEs that contribute to DNA end resection [3,4]. Following end resection, homology-directed repair of a double-ended DSB can be executed by single-strand annealing (SSA), synthesis-dependent strand annealing (SDSA) or double-strand break repair (DSBR) (Figure 1). SSA proceeds through the annealing of homologous sequences that flank the break site. This is a highly error prone mechanism that ends with the deletion of one of the repeats and the entire intervening sequence between the homologous repeats. It also results in the formation of two non-homologous single-strand 3' tails that will need to be removed for completion of the repair process (Figures 1, 3b). Their removal is carried out by the XPF-ERCC1 SSE in mammals and its yeast counterparts Rad1^{XPF}-Rad10^{ERCC1} and Swi10^{XPF}-Rad16^{ERCC1} in *Saccharomyces cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe*, respectively [5]. We will review the important progress made on understanding how 3' flap removal is controlled in yeast SSA. In contrast to SSA, SDSA and DSBR involve homology search and strand invasion of an intact sister chromatid or homolog chromosome. This leads to the formation of the D-Loop (Figures 1, 3a) where the 3' end of the invading strand is used to prime DNA synthesis. In SDSA, the extended invading strand dissociates from the intact complementary donor strand and anneals to the 3' overhang on the other side of the break following D-loop disassembly by helicases (Figures 1, 3c). This can result in the formation of a 3' flap if DNA synthesis runs far enough before D-loop disassembly (Figures 1, 3c). As in

Figure 1



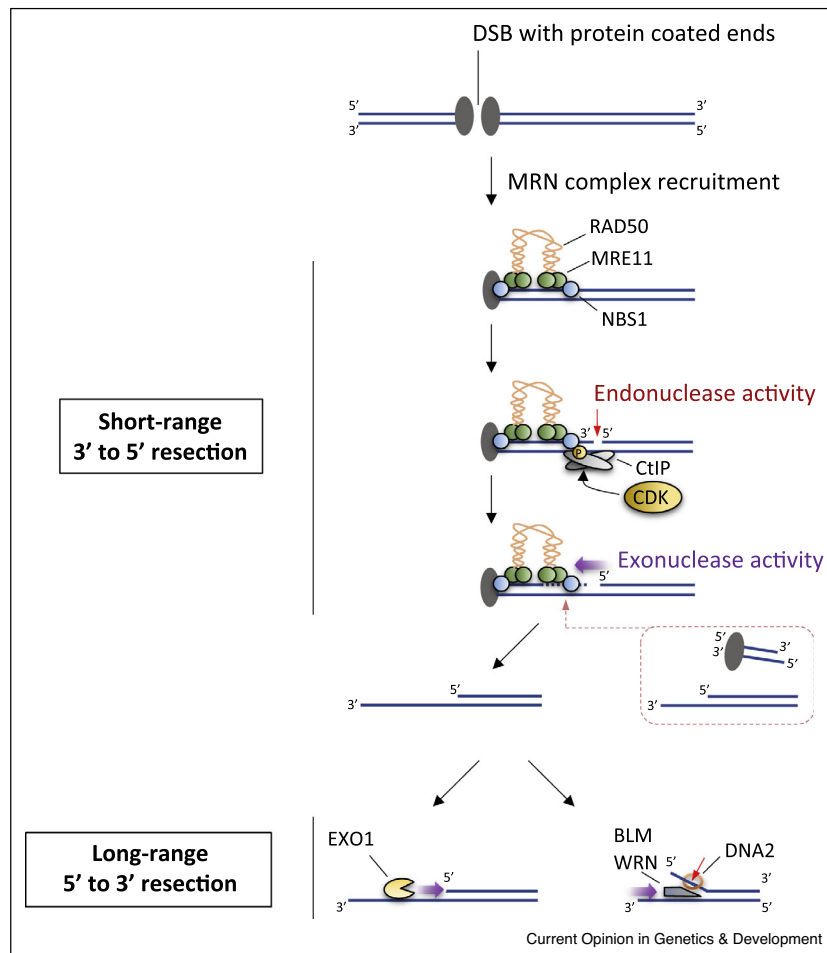
SSEs in HR-mediated repair of a two-ended DSB.

Simplified outline of homologous recombination (HR) pathways showing the processing of secondary DNA structures by SSEs (preferential cut sites are indicated with red arrows). These range from protein-coated DNA ends (grey oval on the right end of the break) and/or ends with secondary DNA structures (shown on left end of the break) that block 5'–3' resection, 3' flaps to more complex branched DNA structures such as D-loops and Holliday junctions. As explained in the main text, it is noteworthy that there are important functional interactions at play between helicases and SSEs. Helicases can either generate secondary structures for SSEs to process, such as during end processing (see Figure 2 for details), or instead dismantle structures such as D-loops and dHJs that otherwise need to get processed by SSEs (see Figure 4 for details).

SSA, the 3' flap will be endonucleolytically removed by XPF-ERCC1 in mammalian cells and Rad1^{XPF}-Rad10^{ERCC1} in *S. cerevisiae* (for review Ref. [6]). However, compared to SSA, much less is currently known on how they are targeted and controlled in SDSA. Noteworthy, SDSA is a non-crossover (non-CO) process that avoids

extensive exchange of genetic information, making it one of the least mutagenic HR mechanisms. If the D-loop persists, the non-invading 3' overhang can anneal to the complementary intact donor strand that forms the single-stranded loop (Figure 1). This combined with extension of both 3' ends of the break and ligation will ultimately

Figure 2



DNA end resection.

MRE11 initiates end-resection by nicking the strand that is 5' terminated at the break (for simplicity end resection is shown for only one of the ends). It will then carry out 3'–5' short-range resection with its 3'–5' exonuclease activity while the gap it has generated constitutes an entry point for the EXO1 and DNA2 nucleases that will carry out long-range 5'–3' resection. Whereas long-range resection carried out by Exo1 relies on a classical exonucleolytic 'chewing back' process of the DNA strand, it is carried out by a more elaborate mechanism when achieved by DNA2. Indeed, DNA2 is a single-strand DNA endonuclease that will drive 5'–3' resection by nicking inside the single-strand 5' flaps which is generated by 5'–3' DNA unwinding catalyzed by BLM. The pink dotted arrow shows a second cut that can be made by MRE11 opposite its first cut or a gap. The cleavage products generated by that second cut are shown in the dotted lined box. These are a protein-coated short duplex DNA product and a protein free end that can undergo further resection. Note: cuts are indicated with red arrows.

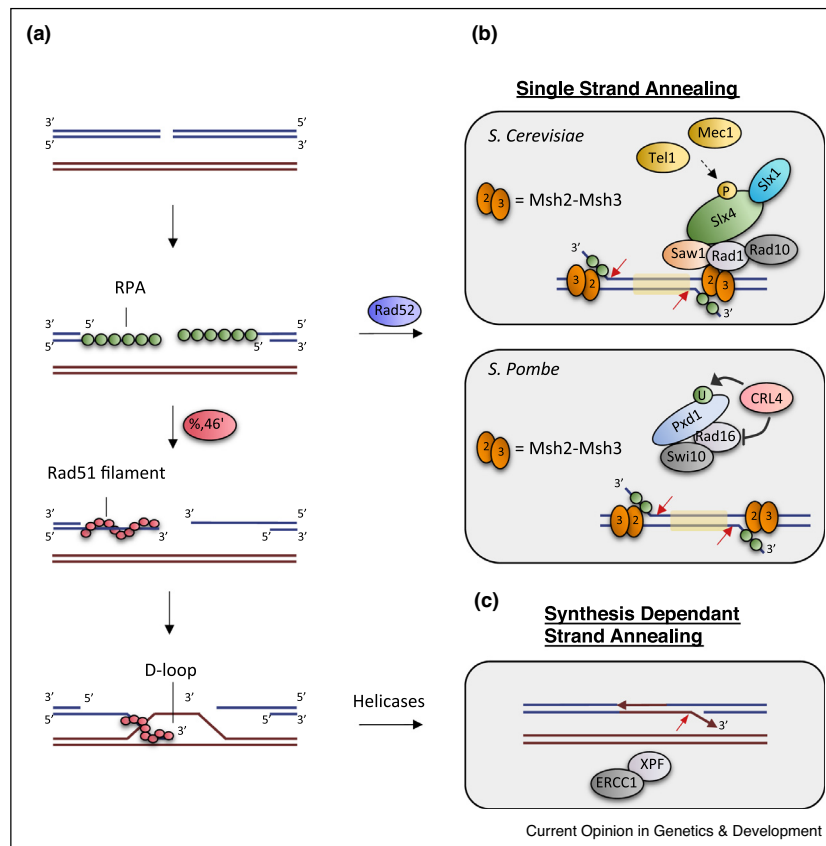
lead to the formation of the canonical double-Holliday junction structure (dHJ) (Figure 1). HJs covalently link both sisters or homologs and need to be processed before chromosome segregation to avoid segregation defects and aneuploidy. They can be removed by dHJ dissolution, which relies on the combined action of a DNA helicase and a type I topoisomerase, or by HJ resolution, which involves the nucleolytic processing of HJs by the MUS81-EME1, SLX1-SLX4 and GEN1 SSEs (Figure 4a) or by the MLH1-MLH3 nuclease complex. HJ resolution by MLH1-MLH3, which is not an SSE as such, is reviewed by Sanchez and colleagues in this issue and will not be further discussed here [7]. While HJ dissolution is exclusively a non-CO process like SDSA, HJ resolution can

lead to both non-CO or CO. Controlling the balance between SDSA and DSBR is therefore critical in determining the genetic outcome of the recombination process. As reviewed in this issue, DNA helicases are key enzymes that weigh into that balance reversing D-loops and other intermediates to promote SDSA or eliminating dHJs in DSBR [8]. We will see how elaborate spatio-temporal control mechanisms of HJ-processing SSEs also contribute (Figure 4b).

MRE11 and DNA2 in DNA end resection

The first SSE to come into action in HR is MRE11, which displays both DNA endonuclease and 3' to 5' exonuclease activities. MRE11 initiates end resection by nicking the

Figure 3



SDSA and SSA.

(a) A DSB with resected ends and RPA-coated 3' overhangs can be channeled by RAD52 towards SSA if homologous repeats flank the break **(b)** or toward homology search and strand invasion of an intact double-stranded donor after replacement of RPA by RAD51 **(c)**.

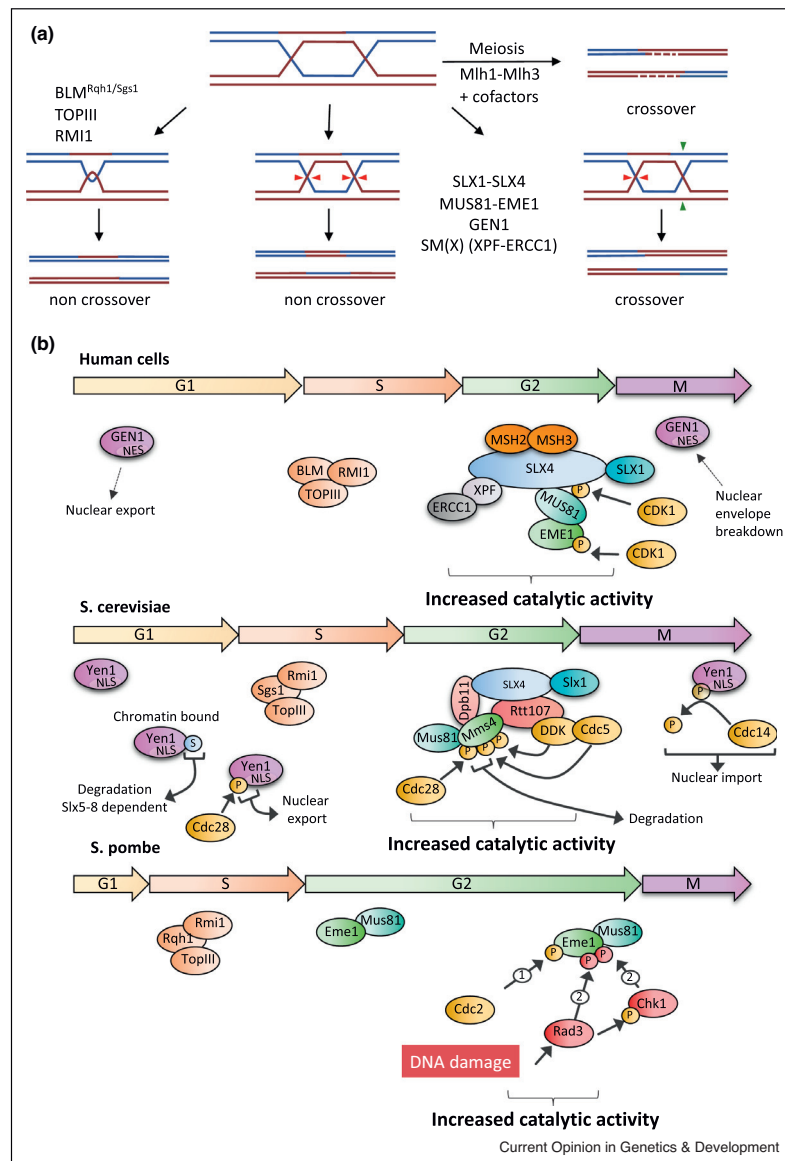
(b) In SSA the 3' overhangs anneal when complementary sequences (yellow hallow) corresponding to the homologous repeats flanking the break are uncovered by resection. This results in the formation of two 3' single-stranded non-homologous tails that will be removed by Rad1-Rad10 in *S. cerevisiae* (ortholog of human XPF-ERCC1). As further detailed in the main text the recruitment, precise positioning and stimulation of Rad1-Rad10 relies on multiple protein-protein contacts established between Rad1-Rad10 and Msh2-Msh3, Saw1 and Rpa as well as Slx4 phosphorylated by Mec1/Tel1. In *S. pombe*, Pxd1 was identified as the Saw1 ortholog. It binds and stimulates Rad16-Swi10 (the ortholog of Rad1-Rad10 and XPF-ERCC1). Pxd1 can also interact with Dna2 and inhibit Rpa-mediated stimulation of Dna2 in S-phase. Pxd1 was recently shown to be degraded in S-phase after it is ubiquitinated by the CRL4-Cdt2 ubiquitin ligase. For simplicity only one SSA complex is shown. Note: cuts are indicated with red arrows.

(c) In SDSA, the invading strand is displaced after the D-loop gets dismantled by DNA helicases and annealed to the 3' overhang on the other side of the break. If DNA synthesis and extension of the 3' invading strand proceeds far enough, a 3' flap will be generated after the invading strands anneals to the opposite 3' overhang. The 3' flap will be removed by XPF-ERCC1 and its counterparts in yeast. Note: cuts are indicated with red arrows.

strand that is 5'-terminated at the break. The endonucleolytic cut serves as an entry point for the EXO1 and DNA2 nucleases that carry out long-range 5' to 3' resection while short-range 3' to 5' resection towards the end is carried out by MRE11 exonuclease activity (Figure 2) [9,10-12]. It operates in complex with RAD50 and NBS1, or Xrs2 in *S. cerevisiae*, as part of the MRN or MRX complex, respectively (Figure 2). Recruitment of MRE11 to the ends is controlled in multiple ways (reviewed in Ref. [3]), including the recently reported unsuspected contribution of GRB2 as a direct partner of MRE11 [13]. The MRE11-RAD50 (MR) complex represents the catalytic core where ATP binding and

hydrolysis by RAD50 induces conformational changes that specifically stimulate the endonuclease activity of MRE11 while inhibiting its exonuclease activity [14-16]. The key regulatory cofactor of MRN/X is CtIP in mammals, Ctp1^{CtIP} in *S. pombe* and Sae2^{CtIP} in *S. cerevisiae* [17-20]. Intriguingly, both CtIP and Sae2^{CtIP} have been reported to have endonuclease activity, but this remains controversial in the field [20-23]. Stimulation of MRE11 endonuclease activity by CtIP was recently shown to rely on a small conserved C-terminal motif [24**]. Phosphorylation of CtIP by various kinases including CDK1 in S/G2, ATM/ATR in response to DNA damage as well as CK2 in *S. pombe*, enhances its stimulatory effect by

Figure 4



dHJ processing in DSB.

(a) During dHJ dissolution the two HJs are merged by the BLM (ortholog of the *S. pombe* and *S. cerevisiae* Rqh1 and Sgs1 helicases, respectively) helicase into a hemicatenated structure where one strand of one chromosome is threaded between the two strands of the other chromosome. Processing of the hemicatenane by the type I topoisomerase that cuts and religates one of the intertwined strands completes the dissolution process without CO formation.

(b) Control mechanisms of HJ resolvases in human cells, *S. cerevisiae* and *S. pombe*. See main text for details. NLS = Nuclear Localization Signal. NES = Nuclear Export Signal. P = Phosphate. S = SUMO.

driving its interaction with the FHA and BRCT domains of NBS1 [24^{••},25–28], or with Rad50 in the case of Sae2^{CtIP} [29[•]]. Importantly, CDK1-mediated phosphorylation is critical to restrict the initiation of end resection to S/G2 when a sister chromatid is available [17,30]. MRN/X endonuclease stimulation by CtIP is essential in the presence of protein-DNA complexes (DPC) at the ends of the DSB. This was first demonstrated *in vitro* on dsDNA substrates with biotin-streptavidin coated ends

[17,30–32]. Follow-up studies went on to show that KU forms a physiologically relevant DPC that stimulates MRN/X endonuclease activity [31,33–35]. DNA-PKcs further stimulates endonucleolytic cutting by MRE11 of KU-coated ends, enhancing the binding of CtIP to the MR core complex seven to eightfold [34^{••}]. Remarkably, MRE11 endonuclease activity was shown to be stimulated by a nick or a gap on the opposite strand in the vicinity of protein-coated DNA ends [11,32,34^{••}].

This ability of MRE11 to nick both strands was shown to drive the release of short dsDNA/KU and dsDNA/DNA-PKcs cleavage products detected both *in vitro* and *in vivo* (Figure 2) [11,34**]. Whether this is a general feature that applies to other naturally occurring protein blocks at DNA ends such as topoisomerase-DNA cleavage complexes and the meiotic topoisomerase-related Spo11 enzyme remains to be determined.

While all of the above relates to positive regulation of the MRE11 endonuclease activity, recent studies have identified new MRE11 binding partners that can negatively control DNA end resection. These factors influence MRE11 stability, DNA binding, DNA exonuclease activity and/or chromatin retention and it is not known whether some may directly modulate the endonuclease activity of MRE11 [36–38].

DNA2 is the next SSE to come into action during end-resection where it is recruited by MRN/X via direct interaction with MRE11 to promote long-range resection in coordination with the RecQ-like helicases BLM and WRN in mammals, Sgs1^{BLM} in *S. cerevisiae* and Rqh1^{BLM} in *S. pombe* [33,39–42,43*,44,45]. DNA2 is a bifunctional enzyme that carries both single-strand specific endonuclease and DNA helicase activities. It can introduce cuts within either 3' or 5' flaps [4]. The 3' overhang generated by end resection is protected by RPA from DNA2 SSE activity, which is instead targeted to the 5'-flap generated by its RecQ helicase partner [40,46,47]. DNA2 helicase activity does not contribute to DNA unwinding but rather acts as a translocase that removes RPA from the 5'-flap so that it can get cleaved by DNA2 [46,47]. Remarkably, human phosphorylated CtIP (P-CtIP) is also a key co-activator of DNA2 [42,48**]. This is mediated by a central domain of CtIP that is not required for MRE11 stimulation and is missing in Sae2^{CtIP} [48**]. Accordingly, Sae2^{CtIP} is unable to stimulate Dna2 [48**]. Dna2 recruitment through direct binding to Mre11 is negatively regulated by the NHEJ factor Nej1, which competes with Dna2 for Mre11 binding and shifts the balance in favor of NHEJ [49]. In *S. cerevisiae*, SUMOylation of Dna2 in its N-terminal regulatory domain, that is not found in its human counterpart, was recently shown to impair its endonuclease activity *in vitro* [50], but to contribute to nuclear localization and recruitment of Dna2 to DNA damage induced foci, which is also stimulated by Cdk1 and Mec1^{ATR}-mediated phosphorylation of Dna2 [50,51]. In human cells, nuclear localization of DNA2, which lacks an NLS, instead strictly relies on K63 polyubiquitination mediated by the TRAF6 E3 ligase [52].

Considering the importance of P-CtIP in promoting end-resection in part through direct stimulation of both MRE11 and DNA2 SSEs, mechanisms that control its turnover are expected to be critical for controlling the timing and extent of resection. In line with this, protein

phosphatase 1 coordinates with RIF1 to counteract DNA end resection by suppressing the accumulation of CtIP at DSBs immediately after damage and was proposed to achieve this by dephosphorylating P-CtIP [53]. Other possible avenues rely on the control of CtIP levels by proteasomal degradation [54,55]. Remarkably, ATM-mediated hyperphosphorylation of chromatin-bound CtIP stimulates its SUMOylation and subsequent degradation by the proteasome following polyubiquitination by the RNF4 SUMO targeted ubiquitin ligase (STUbL) [56,57]. Impeding on this process results in excessive resection and defective HR.

Control of 3' flap processing during SSA

SSA strongly relies on end resection which must proceed until complementary sequences are exposed in the resulting 3' single-strand overhangs. Accordingly, SSA was found to depend on CtIP and to be low in G1 arrested human cells [58,59]. The pairing of the opposite overhangs driven by RAD52 results in the formation of two 3' non-homologous single-stranded tails that will be removed by XPF-ERCC1 SSEs in mammals and yeast (Figure 3b).

A number of studies have unraveled the mechanisms that control the recruitment, DNA binding and catalytic activity of Rad1^{XPF}-Rad10^{ERCC1} during SSA in *S. cerevisiae*. Recruitment of Rad1^{XPF}-Rad10^{ERCC1} to recombination intermediates relies on both Saw1 and the Msh2-Msh3 mismatch repair complex [60,61]. Saw1 is a structure-specific DNA binding protein that also interacts directly with Rad1 [60]. Both properties are essential for targeting Rad1^{XPF}-Rad10^{ERCC1} to 3' flaps that are over 30 nucleotides [60]. Msh2-Msh3 which is also a structure-specific DNA binding protein that binds ds/ss DNA junction at the base of a 3' flap is required when repeat length is below 1 kb probably to stabilize the annealed 3' overhangs [62,60]. Msh2-Msh3 also interacts directly with Rad1^{XPF}-Rad10^{ERCC1} [63**]. Biochemical studies show that Rad1^{XPF}-Rad10^{ERCC1} and Saw1 can form a stable complex in the absence of DNA and it is currently unclear whether Saw1 loads on the recombination intermediates before it recruits Rad1^{XPF}-Rad10^{ERCC1} or whether they arrive as a preformed ternary complex [60,63**]. Importantly, Saw1 stimulates Rad1^{XPF}-Rad10^{ERCC1} *in vitro* specifically on 3' flap structures, not on other structures such as a model replication fork with no 3' flap [60]. RPA also directly binds and stimulates Rad1^{XPF}-Rad10^{ERCC1} during SSA [63**,64**]. Intriguingly, earlier studies had shown that Slx4 stimulates Rad1^{XPF}-Rad10^{ERCC1} during SSA after its phosphorylation by Mec1^{ATR}/Tel1^{ATM} [65,66]. However, although Slx4 also directly interacts with Rad1^{XPF}, it is not involved in the recruitment of Rad1^{XPF}-Rad10^{ERCC1} [60], which is in striking contrast with the key role fulfilled by mammalian SLX4 in the recruitment of XPF-ERCC1 to interstrand crosslinks or telomeres

[67]. Separation of function *rad1* mutants that are unable to process 3' flaps and are deficient in gene conversion and SSA but proficient for NER were generated by mutating conserved residues in the N-terminal domain of Rad1 [63^{••},64^{••}]. Combined biochemical and genetic analyses of these mutants suggest that the timely and precise positioning of Rad1^{XPF}-Rad10^{ERCC1} at the base of the 3' flap is mediated by its interaction with Msh2-Msh3, Saw1 and possibly RPA [63^{••},64^{••}]. Interactions between Saw1 and DNA and Saw1 and Msh2-Msh3 also contribute to the process [63^{••}]. However, further investigations will be necessary to better understand the catalytic stimulation of Rad1^{XPF}-Rad10^{ERCC1} by Saw1, RPA and/or Slx4 and get a complete picture of its spatio-temporal control during SSA.

Interestingly, Pxd1 was identified as the fission yeast Saw1 ortholog and a key regulator of SSA [68]. Remarkably though, Pxd1 interacts with Dna2 in addition to Rad16^{Rad1}-Swi10^{Rad10} [68] and while it promotes SSA by activating Rad16^{Rad1}-Swi10^{Rad10}, it inhibits RPA-mediated Dna2 activation [68]. Zhang *et al.* recently demonstrated that Pxd1 is degraded in S-phase after its ubiquitination by the CRL4-Cdt2 ubiquitin ligase [69[•]]. This ensures that S-phase related functions of Dna2 are not inhibited by Pxd1 while avoiding Pxd1-mediated stimulation of Rad16^{Rad1}-Swi10^{Rad10} and error prone SSA [69[•]].

Control of dHJ processing in DSBR

As previously mentioned, two different processes ensure removal of dHJs. One is the so-called dissolution mechanism that is achieved by the concerted action of a RecQ-like helicase (BLM in mammals, Sgs1^{BLM} or Rqh1^{BLM} in budding and fission yeasts, respectively) and a type 1A topoisomerase (TOPO III α in mammals, TopIII in both yeasts) in complex with an accessory factor Rmi1 (for review Ref. [70]) (Figure 4a). dHJ dissolution is a conservative mechanism that leads exclusively to non-CO and is considered the pathway of choice in vegetative cells. HJ resolution is the alternative mechanism. It is carried out by SSEs that have acquired the capacity to introduce coordinated cuts on opposite strands at the junction. Unlike dHJ dissolution, HJ resolution by these so-called HJ resolvases can result in either non-CO or CO (Figure 4a) and nucleolytic processing of HJs and other HJ-related structures is a major source of genetic variability in meiosis. Importantly, HJ resolution is also the only mechanism for eliminating single HJs. Three conserved families of nuclear SSEs are capable of HJ resolution. These include MUS81-EME1 (Mus81-Mms4 in *S. cerevisiae*) that belongs to the XPF-family of endonucleases, Gen1 (Yen1 in *S. cerevisiae*) that is a member of the FEN1/XPG endonucleases and Slx1-Slx4 where Slx1 belongs to the GYI-YIG superfamily of nucleases ([71–77] and for review Ref. [78]). Remarkably, there is no Gen1 ortholog in fission yeast and an Slx4 ortholog has

yet to be found in plants. Importantly, as reviewed in this issue, CO-biased resolution of HJs in meiosis relies primarily on the Mlh1-Mlh3 endonuclease and its co-factors in *S. cerevisiae* and mammals, while CO in *S. pombe* relies exclusively on Mus81-Eme1 [7].

Elaborate control mechanisms have been selected to ensure the timely hyperactivation and spatial control of HJ resolvases in late G2 and mitosis (Figure 4b). They guarantee efficient resolution of persisting HJs and other recombination intermediates before chromosome segregation. Importantly, they also provide time for conservative helicase-driven processing of those structures earlier in the cell cycle, thereby limiting CO in vegetative cells.

Control of MUS81-EME1

In *S. cerevisiae*, catalytic upregulation of Mus81-Mms4^{EME1} at the G2/M transition relies on the phosphorylation of Mms4 by Cdc28^{CDK1}, Cdc5^{PLK1} and DDK [79–82] (Figure 4b). This also triggers complex formation between Mus81-Mms4^{EME1} and the Rtt107, Slx4 and Dpb11 scaffolds, which is mediated by direct interactions between Mus81-Mms4^{EME1} and Rtt107 and Dpb11 [80]. Formation of this multifactorial complex seems to further contribute to Mus81-Mms4^{EME1} stimulation and is suspected to contribute to the timely recruitment of Mus81-Mms4^{EME1} but its exact functional relevance is uncertain. The importance of restricting hyper-activation of Mus81-Mms4^{EME1} to late G2 and mitosis is underscored by increased rates of aberrant CO and processing of replication intermediates in cells producing phosphomimetic *mms4* mutants [83]. Recently, an additional level of control was found to be imposed by the degradation of phosphorylated Mms4^{EME1} specifically [84[•]]. This is mediated by SUMOylation of phosphorylated Mms4^{EME1} by an as yet unknown process, and targeted ubiquitination by the Slx5-Slx8 STUbL and the Cul8-Mms21-Esc2 E3 ubiquitin ligase complex [84[•]]. It will be important to better understand why Mms4 needs to be ubiquitinated by two different and apparently independent ligases as well as whether Esc2 acts as a co-activator of Mus81-Mms4^{EME1}, as previously suggested [85], before promoting Mms4^{EME1} degradation [84[•]].

Human MUS81-EME1 also undergoes CDK1-mediated catalytic upregulation [79,86], but this relies instead on phosphorylation of the SLX4 nuclease scaffold which acts as a stimulatory cofactor of MUS81-EME1 [74–76] and shows enhanced interaction with MUS81 in G2/M following phosphorylation by CDK1 [86]. EME1 also appears to be phosphorylated by CDK1 but whether this also stimulates MUS81-EME1 remains to be established. Importantly, binding of SLX4 to the N-terminus of MUS81 relieves auto-inhibition of MUS81-EME1 imposed by MUS81's N-terminal Helix-hairpin-Helix domain [87]. *In vitro* studies showed that efficient HJ resolution by SLX4-MUS81-EME1 is strongly promoted

by SLX1 within a SLX1-SLX4-MUS81-EME1 (SLX-MUS) complex [88]. Productive HJ resolution by the SLX-MUS complex relies on a nick and counter mechanism that coordinates a first cut by SLX1 and a second cut on the opposite strand by MUS81-EME1. This reaction can be further stimulated *in vitro* when the N-terminus of SLX4 is in interaction with its XPF and MSH2 partners [87,89].

In *S. pombe*, stimulation of HJ resolution by Mus81-Eme1 is mediated by dual phosphorylation of Eme1 by Cdc2^{CDK1} and Rad3^{ATR} in response to DNA damage [90,91]. Importantly, hyper-phosphorylation of Eme1 by Rad3^{ATR} requires that it is first phosphorylated by Cdc2^{CDK1}. This ensures rapid hyperactivation of Mus81-Eme1 in response to DNA damage in late G2/M. Preventing Mus81-Eme1 hyperactivation in cells lacking Rqh1^{BLM} results in gross chromosomal rearrangements and impaired cell viability [90,91].

Control of GEN1

In *S. cerevisiae*, Yen1^{GEN1} also undergoes Cdc28^{CDK1}-mediated phosphoregulation [79]. However, the outcomes are opposite to those described above for Mus81-Mms4^{EME1}, as phosphorylation of Yen1^{GEN1} results in both its catalytic inhibition and nuclear exclusion [92,93] (Figure 4b). This inhibitory control of Yen1^{GEN1} is relieved in anaphase after dephosphorylation by Cdc14 [92,93]. The importance of Yen1^{GEN1} control is underscored by the detrimental impact of premature activation of Yen1 on genome stability [92–94]. Furthermore, Cdc28^{CDK1}-driven inhibition of Yen1^{GEN1} was recently shown to be particularly important in meiosis where it prevents the premature resolution by Yen1^{GEN1} of recombination intermediates that are needed to establish a controlled distribution of CO [95]. Reminiscent of the previously mentioned Slx5-Slx8 mediated degradation of phosphorylated Mms4^{EME1} [84], Yen1^{GEN1} turns out to be targeted for degradation by Slx5-Slx8 dependent ubiquitination at the G1/S transition [96]. This additional layer of regulation is proposed to ensure that any chromatin associated active Yen1^{GEN1} that remains at the end of G1 will be eliminated before the cells enter S phase [96]. Preventing ubiquitination of Yen1^{GEN1} by Slx5-Slx8 results in increased levels of CO [96]. In human cells, control of GEN1 instead relies on a nuclear export signal that prevents GEN1 from accessing chromosomes until nuclear envelope breakdown occurs in mitosis [97].

Conclusion

Important progress has been made in recent years on dissecting the mechanisms underlying the control of SSEs in end-resection and on understanding how from a structural standpoint they modulate the enzymatic activity and/or DNA binding properties of the enzyme. This also stands true for the control of Rad1^{XPF}-

Rad10^{ERCC1} during SSA in budding yeast. However, as discussed throughout this review many questions still need to be answered before we can get a full picture of how SSEs are regulated. This relates for example to how XPF-ERCC1 is controlled in SSA in higher eukaryotes and to what extent the principles of Rad1^{XPF}-Rad10^{ERCC1} control in budding yeast can be extrapolated to its human counterpart. Control of these SSEs in the SDSA pathway is also poorly understood. On another note, while remarkably elaborate regulatory networks that ensure the timely upregulation of MUS81-EME1 enzymes have been unraveled over this last decade, we still do not understand how catalytic stimulation mediated by phosphorylation of EME1 and Mms4^{EME1} actually operates, not to mention whether phosphorylation of human EME1 has any relevance at all. Many more questions remain and there is no doubt that investigating how SSEs are controlled in HR and beyond will yield important new findings of potential therapeutic value.

Conflict of interest statement

Nothing declared.

CRedit authorship contribution statement

Cédric Giaccherini: Writing - original draft, Visualization.
Pierre-Henri Gaillard: Writing - review & editing.

Acknowledgements

We wish to thank Jean-Hugues Guervilly for critical reading of the manuscript and our colleagues of the CRCM 3R community for stimulating discussions with special thanks to Bertrand Llorente, Mauro Modesti, Valérie Garcia and Pierre-Marie Dehé.

We apologize to many of our colleagues whose work we were unable to reference due to the constraints imposed by the format of this short review.

This work was supported by grants from Institut National du Cancer (INCa-PLBio2019-152) awarded to PHLG. CG was a recipient of a fellowship awarded by the Fondation pour la Recherche Médicale (Equipe FRM grant number ECO20170637468) and the Fondation ARC (grant ARCD0C42020010001276).

References and recommended reading

Papers of particular interest, published within the period of review, have been highlighted as:

- of special interest
- of outstanding interest

1. Scully R, Panday A, Elango R, Willis NA: **DNA double-strand break repair-pathway choice in somatic mammalian cells.** *Nat Rev Mol Cell Biol* 2019, **20**:698-714.
2. Gnügge R, Symington LS: **DNA end resection during homologous recombination.** *Curr Opin Genet Dev* 2021, **71**:99-105.
3. Syed A, Tainer JA: **The MRE11-RAD50-NBS1 complex conducts the orchestration of damage signaling and outcomes to stress in DNA replication and repair.** *Annu Rev Biochem* 2018, **87**:1-32.
4. Zheng L, Meng Y, Campbell JL, Shen B: **Multiple roles of DNA2 nuclease/helicase in DNA metabolism, genome stability and human diseases.** *Nucleic Acids Res* 2019, **48**:16-35.

5. Bhargava R, Onyango DO, Stark JM: **Regulation of single-strand annealing and its role in genome maintenance.** *Trends Genet* 2016, **32**:566-575.
 6. Lyndaker AM, Alani E: **A tale of tails: insights into the coordination of 3' end processing during homologous recombination.** *Bioessays* 2009, **31**:315-321.
 7. Sanchez A, Reginato G, Cejka P: **Crossover or non-crossover outcomes: tailored processing of homologous recombination intermediates.** *Curr Opin Genet Dev* 2021, **71**:39-47.
 8. Branzei D, Szakal B: **DNA helicases in homologous recombination repair.** *Curr Opin Genet Dev* 2021, **71**:27-33.
 9. Cannavo E, Reginato G, Cejka P: **Stepwise 5' DNA end-specific resection of DNA breaks by the Mre11-Rad50-Xrs2 and Sae2 nuclease ensemble.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2019, **116**:201820157
- An important study that uses recombinant MRX and Sae2 proteins to look into the relative control of both endonuclease and exonuclease activities of Mre11 on free DNA ends. Several key findings are made: Rad50 strongly inhibits the exonuclease activity of Mre11 in the presence of ATP, this is counteracted by pSae2 (which also stimulates the endonuclease activity of Mre11) and finally the short-range resection machinery preferentially degrades the 5'-ended strand up to 300 nt into the duplex. A model proposes a step-wise where one MRX-pSae2 complex stimulates the next.
10. Garcia V, Phelps SEL, Gray S, Neale MJ: **Bidirectional resection of DNA double-strand breaks by Mre11 and Exo1.** *Nature* 2011, **479**:241-244.
 11. Myler LR, Gallardo IF, Soniat MM, Deshpande RA, Gonzalez XB, Kim Y, Paull TT, Finkelstein IJ: **Single-molecule imaging reveals how Mre11-Rad50-Nbs1 initiates DNA break repair.** *Mol Cell* 2017, **67**:891-898.e4.
 12. Shibata A, Moiani D, Arvai AS, Perry J, Harding SM, Genois M-M, Maity R, van Rossum-Fikkert S, Kertokallio A, Romoli F *et al.*: **DNA double-strand break repair pathway choice is directed by distinct MRE11 nuclease activities.** *Mol Cell* 2014, **53**:7-18.
 13. Ye Z, Xu S, Shi Y, Bacolla A, Syed A, Moiani D, Tsai C-L, Shen Q, Peng G, Leonard PG *et al.*: **GRB2 enforces homology-directed repair initiation by MRE11.** *Sci Adv* 2021, **7**:eabe9254.
 14. Trujillo KM, Sung P: **DNA structure-specific nuclease activities in the *Saccharomyces cerevisiae* Rad50-Mre11 complex.** *J Biol Chem* 2001, **276**:35458-35464.
 15. Liu Y, Sung S, Kim Y, Li F, Gwon G, Jo A, Kim A, Kim T, Song O, Lee SE *et al.*: **ATP-dependent DNA binding, unwinding, and resection by the Mre11/Rad50 complex.** *EMBO J* 2016, **35**:743-758.
 16. Deshpande RA, Williams GJ, Limbo O, Williams RS, Kuhnlein J, Lee J, Classen S, Guenther G, Russell P, Tainer JA *et al.*: **ATP-driven Rad50 conformations regulate DNA tethering, end resection, and ATM checkpoint signaling.** *EMBO J* 2014, **33**:482-500.
 17. Cannavó E, Cejka P: **Sae2 promotes dsDNA endonuclease activity within Mre11-Rad50-Xrs2 to resect DNA breaks.** *Nature* 2014, **514**:1-16.
 18. Sartori A, Lukas C, Coates J, Mistrik M, Fu S *et al.*: **Human CtIP promotes DNA end resection.** *Nature* 2007, **450**:509-514.
 19. Limbo O, Chahwan C, Yamada Y, de Bruin RAM, Wittenberg C, Russell P: **CtIP1 is a cell-cycle-regulated protein that functions with Mre11 complex to control double-strand break repair by homologous recombination.** *Mol Cell* 2007, **28**:134-146.
 20. Lengsfeld BM, Rattray AJ, Bhaskara V, Ghirlando R, Paull TT: **Sae2 is an endonuclease that processes hairpin DNA cooperatively with the Mre11/Rad50/Xrs2 complex.** *Mol Cell* 2007, **28**:638-651.
 21. Makharashvili N, Tubbs AT, Yang S-H, Wang H, Barton O, Zhou Y, Deshpande RA, Lee J-H, Löbrich M, Sleckman BP *et al.*: **Catalytic and noncatalytic roles of the CtIP endonuclease in double-strand break end resection.** *Mol Cell* 2014, **54**:1022-1033.
 22. Wang H, Li Y, Truong LN, Shi LZ, Hwang PY-H, He J, Do J, Cho MJ, Li H, Negrete A *et al.*: **CtIP maintains stability at common fragile sites and inverted repeats by end resection-independent endonuclease activity.** *Mol Cell* 2014, **54**:1012-1021.
 23. Andres SN, Williams RS: **CtIP/Ctp1/Sae2, molecular form fit for function.** *DNA Repair* 2017, **56**:109-117.
 24. Zdravković A, Daley JM, Dutta A, Niwa T, Murayama Y, Kanamaru S, Ito K, Maki T, Argunhan B, Takahashi M *et al.*: **A conserved Ctp1/CtIP C-terminal peptide stimulates Mre11 endonuclease activity.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2021, **118**:e2016287118
- The authors undertake a thorough structure-function analysis of Ctp1 and identify a small 15 amino acids peptide of the Ctp1 C terminus that is sufficient to stimulate MRN *in vitro*. They also show that an equivalent peptide from human CtIP that contains an extra 4 residues comprising two phosphorylated ATM and CDK phosphorylation sites can also stimulate MRN *in vitro*.
25. Anand R, Jasrotia A, Bundschuh D, Howard SM, Ranjha L, Stucki M, Cejka P: **NBS1 promotes the endonuclease activity of the MRE11-RAD50 complex by sensing CtIP phosphorylation.** *EMBO J* 2019, **38**.
 26. Williams RS, Dodson GE, Limbo O, Yamada Y, Williams JS, Guenther G, Classen S, Glover JNM, Iwasaki H, Russell P *et al.*: **Nbs1 flexibly tethers Ctp1 and Mre11-Rad50 to coordinate DNA double-strand break processing and repair.** *Cell* 2009, **139**:87-99.
 27. Lloyd J, Chapman JR, Clapperton JA, Haire LF, Hartsuiker E, Li J, Carr AM, Jackson SP, Smerdon SJ: **A supramolecular FHA/BRCT-repeat architecture mediates Nbs1 adaptor function in response to DNA damage.** *Cell* 2009, **139**:100-111.
 28. Wang H, Shi LZ, Wong CCL, Han X, Hwang PY-H, Truong LN, Zhu Q, Shao Z, Chen DJ, Berns MW *et al.*: **The interaction of CtIP and Nbs1 connects CDK and ATM to regulate HR-mediated double-strand break repair.** *PLoS Genet* 2013, **9**:e1003277.
 29. Cannavo E, Johnson D, Andres SN, Kissling VM, Reinert JK, Garcia V, Erie DA, Hess D, Thomä NH, Enchev RI *et al.*: **Regulatory control of DNA end resection by Sae2 phosphorylation.** *Nat Commun* 2018, **9**:4016
- This study shows that Sae2 phosphorylation (P-Sae2) drives direct interaction with Rad50, providing a molecular explanation for the meiotic defects of the Rad50S that turns out to be defective for binding to P-Sae2. It also shows that phosphorylation of Sae2 mediates conformational changes that convert Sae2 in S/G2 into a potent co-activator of MRX.
30. Anand R, Ranjha L, Cannavo E, Cejka P: **Phosphorylated CtIP functions as a co-factor of the MRE11-RAD50-NBS1 endonuclease in DNA end resection.** *Mol Cell* 2016, **64**:940-950.
 31. Wang W, Daley JM, Kwon Y, Krasner DS, Sung P: **Plasticity of the Mre11-Rad50-Xrs2-Sae2 nuclease ensemble in the processing of DNA-bound obstacles.** *Gene Dev* 2017, **31**:2331-2336.
 32. Deshpande RA, Lee J-H, Arora S, Paull TT: **Nbs1 converts the human Mre11/Rad50 nuclease complex into an endo/exonuclease machine specific for protein-DNA adducts.** *Mol Cell* 2016, **64**:593-606.
 33. Wang W, Daley JM, Kwon Y, Xue X, Krasner DS, Miller AS, Nguyen KA, Williamson EA, Shim EY, Lee SE *et al.*: **A DNA nick at Ku-blocked double-strand break ends serves as an entry site for exonuclease 1 (Exo1) or Sgs1-Dna2 in long-range DNA end resection.** *J Biol Chem* 2018, **293**:17061-17069.
 34. Deshpande RA, Myler LR, Soniat MM, Makharashvili N, Lee L, Lees-Miller SP, Finkelstein IJ, Paull TT: **DNA-dependent protein kinase promotes DNA end processing by MRN and CtIP.** *Sci Adv* 2020, **6**:eaay0922
- An important study where the authors follow up on their previous Myler *et al.* (Ref 7) and Deshpande *et al.* (Ref 26) studies to further investigate the stimulation of MRN endonucleolytic processing of KU-coated ends and the release of KU-DNA cleavage products following nicking of both 5' ended and 3' ended strands. In this study, the authors show that DNA-PKcs may contribute to the regulation of end processing by MRN. They provide evidence for the release of DNA/KU/DNA-PKcs cleavage products *in vivo*.
35. Reginato G, Cannavo E, Cejka P: **Physiological protein blocks direct the Mre11-Rad50-Xrs2 and Sae2 nuclease complex to initiate DNA end resection.** *Gene Dev* 2017, **31**:2325-2330.

36. Bai Y, Wang W, Li S, Zhan J, Li H, Zhao M, Zhou XA, Li S, Li X, Huo Y *et al.*: **C1QBP promotes homologous recombination by stabilizing MRE11 and controlling the assembly and activation of MRE11/RAD50/NBS1 complex.** *Mol Cell* 2019, **75**:1299-1314. e6.
37. Jachimowicz RD, Beleggia F, Isensee J, Velpula BB, Goergens J, Bustos MA, Doll MA, Shenoy A, Checa-Rodriguez C, Wiederstein JL *et al.*: **UBQLN4 represses homologous recombination and is overexpressed in aggressive tumors.** *Cell* 2019, **176**:505-519.e22.
38. He YJ, Meghani K, Caron M-C, Yang C, Ronato DA, Bian J, Sharma A, Moore J, Niraj J, Detappe A *et al.*: **DYNLL1 binds to MRE11 to limit DNA end resection in BRCA1-deficient cells.** *Nature* 2018, **563**:522-526.
39. Kasaciunaitė K, Fettes F, Levikova M, Daldrop P, Anand R, Cejka P, Seidel R: **Competing interaction partners modulate the activity of Sgs1 helicase during DNA end resection.** *EMBO J* 2019, **38**:e101516.
40. Cejka P, Cannavo E, Polaczek P, Masuda-Sasa T, Pokharel S, Campbell JL, Kowalczykowski SC: **DNA end resection by Dna2-Sgs1-RPA and its stimulation by Top3-Rmi1 and Mre11-Rad50-Xrs2.** *Nature* 2010, **467**:112-116.
41. Sturzenegger A, Burdova K, Kanagaraj R, Levikova M, Pinto C, Cejka P, Janscak P: **DNA2 cooperates with the WRN and BLM RecQ helicases to mediate long-range DNA-end resection in human cells.** *J Biol Chem* 2014, **289**:27314-27326.
42. Daley JM, Jimenez-Sainz J, Wang W, Miller AS, Xue X, Nguyen KA, Jensen RB, Sung P: **Enhancement of BLM-DNA2-mediated long-range DNA end resection by CtIP.** *Cell Rep* 2017, **21**:324-332.
43. Xue C, Wang W, Crickard JB, Moevus CJ, Kwon Y, Sung P, Greene EC: **Regulatory control of Sgs1 and Dna2 during eukaryotic DNA end resection.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2019, **116**:201819276.
- Real time single-molecule imaging is used to make important findings on the interplay between Dna2 and Sgs1/Top3/Rmi1 at DNA ends and in end processing in the presence of nucleosomes.
44. Zhu Z, Chung W-H, Shim EY, Lee SE, Ira G: **Sgs1 helicase and two nucleases Dna2 and Exo1 resect DNA double-strand break ends.** *Cell* 2008, **134**:981-994.
45. Whelan DR, Rothenberg E: **Super-resolution mapping of cellular double-strand break resection complexes during homologous recombination.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2021, **118**: e2021963118.
46. Miller AS, Daley JM, Pham NT, Niu H, Xue X, Ira G, Sung P: **A novel role of the Dna2 translocase function in DNA break resection.** *Gene Dev* 2017, **31**:503-510.
47. Levikova M, Pinto C, Cejka P: **The motor activity of DNA2 functions as an ssDNA translocase to promote DNA end resection.** *Gene Dev* 2017, **31**:493-502.
48. Ceppi I, Howard SM, Kasaciunaitė K, Pinto C, Anand R, Seidel R, Cejka P: **CtIP promotes the motor activity of DNA2 to accelerate long-range DNA end resection.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2020, **117**:8859-8869.
- Using ensemble and single-molecule biochemistry the authors make the important demonstration that CtIP is a potent co-activator of DNA2, in addition to MRN, that is particularly important for the degradation of RPA-coated ssDNA.
49. Mojumdar A, Sorenson K, Hohl M, Toulouze M, Lees-Miller SP, Dubrana K, Petrini JHJ, Cobb JA: **Nej1 interacts with Mre11 to regulate tethering and Dna2 binding at DNA double-strand breaks.** *Cell Rep* 2019, **28**:1564-1573.e3.
50. Ranjha L, Levikova M, Altmannova V, Krejci L, Cejka P: **Sumoylation regulates the stability and nuclease activity of *Saccharomyces cerevisiae* Dna2.** *Commun Biol* 2019, **2**:174 <http://dx.doi.org/10.1038/s42003-019-0428-0>.
51. Chen X, Niu H, Chung W-H, Zhu Z, Papusha A, Shim EY, Lee SE, Sung P, Ira G: **Cell cycle regulation of DNA double-strand break end resection by Cdk1-dependent Dna2 phosphorylation.** *Nat Struct Mol Biol* 2011, **18**:1015-1019.
52. Meng Y, Liu C, Shen L, Zhou M, Liu W, Kowolik C, Campbell JL, Zheng L, Shen B: **TRAF6 mediates human DNA2 polyubiquitination and nuclear localization to maintain nuclear genome integrity.** *Nucleic Acids Res* 2019, **47**:7564-7579.
53. Isobe S-Y, Hiraga S, Nagao K, Sasanuma H, Donaldson AD, Obuse C: **Protein phosphatase 1 acts as a RIF1 effector to suppress DSB resection prior to Shieldin action.** *Cell Rep* 2021, **36**:109383.
54. Ferretti LP, Himmels S-F, Trenner A, Walker C, von Aesch C, Eggenschwiler A, Murina O, Enchev RI, Peter M, Freire R *et al.*: **Cullin3-KLHL15 ubiquitin ligase mediates CtIP protein turnover to fine-tune DNA-end resection.** *Nat Commun* 2016, **7**:12628.
55. Li F, Mladenov E, Mortoga S, Iliakis G: **SCFSPK2 regulates APC/CCDH1-mediated degradation of CTIP to adjust DNA-end resection in G2-phase.** *Cell Death Dis* 2020, **11**:548.
56. Han J, Wan L, Jiang G, Cao L, Xia F, Tian T, Zhu X, Wu M, Huen MSY, Wang Y *et al.*: **ATM controls the extent of DNA end resection by eliciting sequential posttranslational modifications of CtIP.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2021, **118**: e2022600118.
57. Perry JJP, Tainer JA, Boddy MN: **A SIM-ultaneous role for SUMO and ubiquitin.** *Trends Biochem Sci* 2008, **33**:201-208.
58. Al-Minawi AZ, Saleh-Gohari N, Helleday T: **The ERCC1/XPF endonuclease is required for efficient single-strand annealing and gene conversion in mammalian cells.** *Nucleic Acids Res* 2008, **36**:1-9.
59. Bannardo N, Cheng A, Huang N, Stark JM: **Alternative-NHEJ is a mechanistically distinct pathway of mammalian chromosome break repair.** *PLoS Genet* 2008, **4**:e1000110.
60. Li F, Dong J, Eichmiller R, Holland C, Minca E, Prakash R, Sung P, Shim EY, Surtees JA, Lee SE: **Role of Saw1 in Rad1/Rad10 complex assembly at recombination intermediates in budding yeast.** *EMBO J* 2013, **32**:461-472.
61. Li F, Dong J, Pan X, Oum J-H, Boeke JD, Lee SE: **Microarray-based genetic screen defines SAW1, a gene required for Rad1/Rad10-dependent processing of recombination intermediates.** *Mol Cell* 2008, **30**:325-335.
62. Sugawara N, Pâques F, Colaiácovo M, Haber JE: **Role of *Saccharomyces cerevisiae* Msh2 and Msh3 repair proteins in double-strand break-induced recombination.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997, **94**:9214-9219.
63. Eichmiller R, Medina-Rivera M, DeSanto R, Minca E, Kim C, Holland C, Seol J-H, Schmit M, Oramus D, Smith J *et al.*: **Coordination of Rad1-Rad10 interactions with Msh2-Msh3, Saw1 and RPA is essential for functional 3' non-homologous tail removal.** *Nucleic Acids Res* 2018, **46**:5075-5096.
- In both related articles, the authors identify a series of separation of function Rad1 mutants that are proficient in NER but defective in the processing of 3' non-homologous tails and which have defects in SSA, gene conversion and/or ICL repair. Importantly, they investigate how those mutations impact interactions between Rad1 and several key players in SSA. Some of the Rad1 mutations that they have studied model patient derived XPF mutations.
64. Seol J-H, Holland C, Li X, Kim C, Li F, Medina-Rivera M, Eichmiller R, Gallardo IF, Finkelstein IJ, Hasty P *et al.*: **Distinct roles of XPF-ERCC1 and Rad1-Rad10-Saw1 in replication-coupled and uncoupled inter-strand crosslink repair.** *Nat Commun* 2018, **9**:2025 <http://dx.doi.org/10.1038/s41467-018-04327-0>.
- In both related articles, the authors identify a series of separation of function Rad1 mutants that are proficient in NER but defective in the processing of 3' non-homologous tails and which have defects in SSA, gene conversion and/or ICL repair. Importantly, they investigate how those mutations impact interactions between Rad1 and several key players in SSA. Some of the Rad1 mutations that they have studied model patient derived XPF mutations.
65. Flott S, Alabert C, Toh GW, Toth R, Sugawara N, Campbell DG, Haber JE, Pasero P, Rouse J: **Phosphorylation of Slx4 by Mec1 and Tel1 regulates the single-strand annealing mode of DNA repair in budding yeast.** *Mol Cell Biol* 2007, **27**:6433-6445.

66. Toh GW-L, Sugawara N, Dong J, Toth R, Lee SE, Haber JE, Rouse J: **Mec1/Tel1-dependent phosphorylation of Slx4 stimulates Rad1-Rad10-dependent cleavage of non-homologous DNA tails.** *DNA Repair* 2010, **9**:718-726.
 67. Guervilly J-H, Gaillard PH: **SLX4: multitasking to maintain genome stability.** *Crit Rev Biochem Mol* 2018, **53**:1-40.
 68. Zhang J-M, Liu X-M, Ding Y-H, Xiong L-Y, Ren J-Y, Zhou Z-X, Wang H-T, Zhang M-J, Yu Y, Dong M-Q *et al.*: **Fission yeast Pxd1 promotes proper DNA repair by activating Rad16XPF and inhibiting Dna2.** *PLoS Biol* 2014, **12**:e1001946.
 69. Zhang J-M, Zheng J-X, Ding Y-H, Zhang X-R, Suo F, Ren J-Y, Dong M-Q, Du L-L: **CRL4Cdt2 ubiquitin ligase regulates Dna2 and Rad16 (XPF) nucleases by targeting Pxd1 for degradation.** *PLoS Genet* 2020, **16**:e1008933.
- This study identifies a novel regulatory mechanism that targets the Pxd1 scaffold protein (the ortholog of budding yeast Saw1) that interacts with both Rad16Rad1-Swi10Rad10 and Dna2 and is a co-activator of the former and a co-repressor of the later.
70. Bizard AH, Hickson ID: **The dissolution of double Holliday junctions.** *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2014, **6**:a016477.
 71. Boddy MN, Gaillard PH, McDonald WH, Shanahan P, Yates JR, Russell P: **Mus81-Eme1 are essential components of a Holliday junction resolvase.** *Cell* 2001, **107**:537-548.
 72. Chen XB, Melchionna R, Denis CM, Gaillard PH, Blasina A, de Weyer IV, Boddy MN, Russell P, Vialard J, McGowan CH: **Human Mus81-associated endonuclease cleaves Holliday junctions in vitro.** *Mol Cell* 2001, **8**:1117-1127.
 73. Ip SCY, Rass U, Blanco MG, Flynn HR, Skehel JM, West SC: **Identification of Holliday junction resolvases from humans and yeast.** *Nature* 2008, **456**:357-361.
 74. Fekairi S, Scaglione S, Chahwan C, Taylor ER, Tissier A, Coulon S, Dong M-Q, Ruse C, Yates JR, Russell P *et al.*: **Human SLX4 is a Holliday junction resolvase subunit that binds multiple DNA repair/recombination endonucleases.** *Cell* 2009, **138**:78-89.
 75. Svendsen JM, Smogorzewska A, Sowa ME, O'Connell BC, Gygi SP, Elledge SJ, Harper JW: **Mammalian BTBD12/SLX4 assembles a Holliday junction resolvase and is required for DNA repair.** *Cell* 2009, **138**:63-77.
 76. Munoz IM, Hain K, Déclais A-C, Gardiner M, Toh GW, Sanchez-Pulido L, Heuckmann JM, Toth R, Macartney T, Eppink B *et al.*: **Coordination of structure-specific nucleases by human SLX4/BTBD12 is required for DNA repair.** *Mol Cell* 2009, **35**:116-127.
 77. Andersen SL, Bergstralh DT, Kohl KP, LaRocque JR, Moore CB, Sekelsky J: **Drosophila MUS312 and the vertebrate ortholog BTBD12 interact with DNA structure-specific endonucleases in DNA repair and recombination.** *Mol Cell* 2009, **35**:128-135.
 78. Dehé P-M, Gaillard P-HL: **Control of structure-specific endonucleases to maintain genome stability.** *Nat Rev Mol Cell Biol* 2017, **18**:315-330.
 79. Matos J, Blanco MG, Maslen S, Skehel JM, West SC: **Regulatory control of the resolution of DNA recombination intermediates during meiosis and mitosis.** *Cell* 2011, **147**:158-172.
 80. Princz LN, Wild P, Bittmann J, Aguado FJ, Blanco MG, Matos J, Pfander B: **Dbf4-dependent kinase and the Rtt107 scaffold promote Mus81-Mms4 resolvase activation during mitosis.** *EMBO J* 2017, **36**:664-678.
 81. Gritenaite D, Gritenaite D, Princz LN, Princz LN, Szakal B, Szakal B, Bantele SCS, Bantele SCS, Wendeler L, Wendeler L *et al.*: **A cell cycle-regulated Slx4-Dpb11 complex promotes the resolution of DNA repair intermediates linked to stalled replication.** *Genes Dev* 2014, **28**:1604-1619.
 82. Gallo-Fernandez M, Gallo-Fernández M, Saugar I, Saugar I, Ortiz-Bazan MA, Ortiz-Bazán MÁ, Vázquez MV, Vázquez MV, Tercero JA, Tercero JA: **Cell cycle-dependent regulation of the nuclease activity of Mus81-Eme1/Mms4.** *Nucleic Acids Res* 2012, **40**:8325-8335.
 83. Szakal B, Branzei D: **Premature Cdk1/Cdc5/Mus81 pathway activation induces aberrant replication and deleterious crossover.** *EMBO J* 2013, **32**:1155-1167.
 84. Waizenegger A, Urulangodi M, Lehmann CP, Reyes TAC, Saugar I, Tercero JA, Szakal B, Branzei D: **Mus81-Mms4 endonuclease is an Esc2-STUbL-Cullin8 mitotic substrate impacting on genome integrity.** *Nat Commun* 2020, **11**:5746.
- This study identifies a novel mechanism that specifically targets phosphorylated Mms4 for degradation thereby ensuring that cells exit mitosis without hyper-activated Mus81-Mms4. The mechanism relies on SUMOylation of Mms4 and subsequent ubiquitination by the Slx5-Slx8 StUbL as well as ubiquitination by the Esc2/Cul8/Mms21 E3 ubiquitin ligase.
85. Sebesta M, Urulangodi M, Stefanovie B, Szakal B, Pacesa M, Lisby M, Branzei D, Krejci L: **Esc2 promotes Mus81 complex-activity via its SUMO-like and DNA binding domains.** *Nucleic Acids Res* 2016, **45**:215-230.
 86. Duda H, Arter M, Gloggnitzer J, Teloni F, Wild P, Blanco MG, Altmeyer M, Matos J: **A mechanism for controlled breakage of under-replicated chromosomes during mitosis.** *Dev Cell* 2016, **39**:740-755.
 87. Wyatt HDM, Laister RC, Martin SR, Arrowsmith CH, West SC: **The SMX DNA repair tri-nuclease.** *Mol Cell* 2017, **65**:848-860.e11.
 88. Wyatt HDM, Sarbajna S, Matos J, West SC: **Coordinated actions of SLX1-SLX4 and MUS81-EME1 for Holliday junction resolution in human cells.** *Mol Cell* 2013, **52**:234-247.
 89. Young SJ, West SC: **Coordinated roles of SLX4 and MutSβ in DNA repair and the maintenance of genome stability.** *Crit Rev Biochem Mol* 2021, **56**:157-177.
 90. Dehé P-M, Coulon S, Scaglione S, Shanahan P, Takedachi A, Wohlschlegel JA, Yates JR, Llorente B, Russell P, Gaillard P-HL: **Regulation of Mus81-Eme1 Holliday junction resolvase in response to DNA damage.** *Nat Struct Mol Biol* 2013, **20**:598-603.
 91. Giaccherini C, Scaglione S, Coulon S, Dehé PM, Gaillard PHL: **Regulation of Mus81-Eme1 structure-specific endonuclease by Eme1 SUMO-binding and Rad3ATR kinase is essential in the absence of Rqh1BLM helicase.** *bioRxiv* 2021 <http://dx.doi.org/10.1101/2021.07.29.454171>.
 92. Eissler CL, Mazón G, Powers BL, Savinov SN, Symington LS, Hall MC: **The Cdk/cDc14 module controls activation of the Yen1 Holliday junction resolvase to promote genome stability.** *Mol Cell* 2014, **54**:80-93.
 93. Blanco MG, Matos J, West SC: **Dual control of Yen1 nuclease activity and cellular localization by Cdk and Cdc14 prevents genome instability.** *Mol Cell* 2014, **54**:94-106.
 94. Bittmann J, Grigaitis R, Galanti L, Amarell S, Wilfling F, Matos J, Pfander B: **An advanced cell cycle tag toolbox reveals principles underlying temporal control of structure-selective nucleases.** *eLife* 2020, **9**:e52459.
 95. Arter M, Hurtado-Nieves V, Oke A, Zhuge T, Wettstein R, Fung JC, Blanco MG, Matos J: **Regulated crossing-over requires inactivation of Yen1/GEN1 resolvase during meiotic prophase I.** *Dev Cell* 2018, **45**:785-800.e6.
- The authors show how CDK1-mediated phosphoinhibition of Yen1 is an important mechanism in meiosis that prevents the premature resolution by Yen1 of recombination intermediates that are needed to establish a controlled distribution of meiotic CO.
96. Talhaoui I, Bernal M, Mullen JR, Dorison H, Palancade B, Brill SJ, Mazón G: **Slx5-Slx8 ubiquitin ligase targets active pools of the Yen1 nuclease to limit crossover formation.** *Nat Commun* 2018, **9**:5016.
- The authors identify new layers in the control of Yen1 that rely on its SUMOylation by the Siz1/Siz2 SUMO-ligases and ubiquitination by the Slx5-Slx8 StUbL. Ubiquitination by Slx5-Slx8 targets Yen1 for degradation at the G1/S transition. Mutating the main ubiquitination site in Yen1 drives the accumulation of CO while it rescues chromosome segregation defects in cells lacking Mus81.
97. Chan YW, West SC: **Spatial control of the GEN1 Holliday junction resolvase ensures genome stability.** *Nat Commun* 2014, **5**:4844.

OBJECTIFS

L'endonuclease à spécificité de structure Mus81-Eme1 est importante pour gérer les structures secondaires d'ADN émanant des processus de recombinaison et de réplication. Dans la levure fissipare, la stimulation catalytique du complexe en réponse aux dommages repose sur la phosphorylation séquentielle de la sous-unité Eme1 médiée dans un premier temps par Cdc2 et dans un deuxième temps par le point de contrôle des dommages à l'ADN. Mon travail de thèse a consisté à disséquer de nouveaux mécanismes de régulation du complexe Mus81-Eme1 pour en appréhender l'importance en absence de l'hélicase Rqh1.

Par des approches génétiques, cellulaire et enzymatique, j'ai exploré le rôle de nouvelles modifications post-traductionnelles de la sous-unité Eme1 et leurs importances fonctionnelles en absence de Rqh1.

Les résultats obtenus au cours de mon doctorat sont ainsi organisés dans cette section en deux parties :

- I. Les résultats sont présentés sous forme d'article intitulé : « Regulation of Mus81-Eme1 structure-specific endonuclease by Eme1 SUMO-binding and Rad3ATR kinase is essential in the absence of Rqh1BLM helicase ».
- II. Dans cette seconde partie, je présente des données non publiées concernant le contrôle des niveaux intracellulaires de la protéine Eme1 par le complexe ubiquitin ligase APC/C.

Dans l'ensemble, ce travail aide à mieux comprendre comment le complexe Mus81-Eme1 est contrôlé et son importance pour la stabilité du génome.

RESULTATS

I. MUS81-EME1 EST CONTROLEE PAR LA KINASE RAD3^{ATR} ET LES PROPRIETES DE FIXATION A SUMO D'EME1.

1. RÉSUMÉ

Le laboratoire a identifié un mécanisme de contrôle de Mus81-Eme1 via la phosphorylation de la sous-unité Eme1 du complexe (Dehé et al. 2013). La phosphorylation incrémentale d'Eme1 par Cdc2 lors de la phase S et G2 du cycle cellulaire constitue un prérequis pour une deuxième phosphorylation médiée par la voie de réponse aux dommages de l'ADN. Cette phosphorylation bimodale d'Eme1 assure une hyper-activation catalytique de Mus81-Eme1, restreinte à la fin de la phase G2 et la mitose. Ce contrôle est crucial pour garantir la stabilité du génome en absence de l'hélicase Rqh1^{BLM}. Mon projet de thèse visait à mieux comprendre les mécanismes moléculaires sous-jacents du contrôle de Mus81-Eme1. Par des analyses *in silico* de la séquence primaire des 117 premiers acides aminés d'Eme1, dont la délétion est létale en absence de Rqh1^{BLM}, j'ai identifié la présence de sites consensus pour la kinase Rad3^{ATR} (SQ/TQ) et de deux motifs putatifs d'interaction avec SUMO (SIM). J'ai pu montrer par des approches génétiques et biochimiques que la stimulation de l'activité catalytique de Mus81-Eme1 repose entièrement sur la phosphorylation par Rad3^{ATR}, cette dernière s'avérant cruciale en absence de Rqh1^{BLM}. La phosphorylation de Eme1 dépendante de Chk1 décrite précédemment (Dehé et al. 2013) est apparue au contraire non essentielle à la stimulation de Mus81-Eme1, qu'elle amplifie uniquement si Eme1 a été préalablement phosphorylée par Cdc2 et Rad3^{ATR}. En parallèle, j'ai pu montrer que les domaines SIMs interagissent avec SUMO et qu'un de ces deux motifs contribue, en partie, à la phosphorylation d'Eme1 en réponse aux dommages à l'ADN. Soulignant la relevance fonctionnelle de la phosphorylation bimodale d'Eme1 et de ses propriétés de liaison à SUMO, j'ai démontré qu'elles contribuent aux fonctions essentielles que remplit Mus81-Eme1 en absence de Rqh1.

Ainsi, ces travaux mettent en lumière des mécanismes de régulations élaborés pour contrôler finement le complexe Mus81-Eme1, d'une part par phosphorylations et d'autre part, par l'interaction avec SUMO.

RESULTAT 1

PUBLICATION

GIACCHERINI ET AL.

Regulation of Mus81-Eme1 structure-specific endonuclease by Eme1 SUMO-binding and Rad3^{ATR} kinase is essential in the absence of Rqh1^{BLM} helicase

Giaccherini C.^{1,#}, Scaglione S.¹, Coulon S.¹, Dehé P.M.^{1,#,*} and Gaillard P.H.L.^{1*}

¹ Centre de Recherche en Cancérologie de Marseille, CRCM, Inserm, CNRS, Aix-Marseille Université, Institut Paoli-Calmettes, Marseille, France.

#The authors contributed equally

*correspondence

pierre-marie.dehe@inserm.fr

pierre-henri.gaillard@inserm.fr

Short Title:

Control of the Mus81-Eme1 endonuclease

Abstract

The Mus81-Eme1 structure-specific endonuclease is crucial for the processing of DNA recombination and late replication intermediates. In fission yeast, stimulation of Mus81-Eme1 in response to DNA damage at the G2/M transition relies on Cdc2^{CDK1} and DNA damage checkpoint-dependent phosphorylation of Eme1 and is critical for chromosome stability in absence of the Rqh1^{BLM} helicase. Here we identify Rad3^{ATR} checkpoint kinase consensus phosphorylation sites and two SUMO interacting motifs (SIM) within a short N-terminal domain of Eme1 that is required for cell survival in absence of Rqh1^{BLM}. We show that catalytic stimulation of Mus81-Eme1 depends entirely on direct phosphorylation of Eme1 by Rad3^{ATR} and that while Eme1 also undergoes Chk1-mediated phosphorylation, this is not essential for catalytic modulation. Both Rad3^{ATR}- and Chk1-mediated phosphorylation of Eme1 as well as the SIMs are independently critical for cell fitness in absence of Rqh1^{BLM} and abrogating bimodal phosphorylation of Eme1 along with mutating the SIMs is incompatible with *rqh1Δ* cell viability. Our findings unravel an elaborate regulatory network that relies on the poorly structured N-terminal domain of Eme1 and which is essential for the vital functions Mus81-Eme1 fulfills in absence of Rqh1^{BLM}.

Keywords: Cell cycle, DNA damage checkpoint, Genome stability, Holliday junction resolution, Structure-specific endonuclease

Introduction

Structure-specific DNA endonucleases are cornerstones in the proper execution of DNA replication, repair and recombination; yet they harbor the potential for causing genome instability. Controlling these enzymes is essential to ensure efficient processing of appropriate substrates while preventing counterproductive targeting of other similar DNA structures. The Mus81-Eme1 structure-specific endonuclease (SSE) has emerged as a key player in the processing of recombination intermediates that form during homology directed repair of two-ended double strand breaks or during the rescue of stalled or broken

replication forks. Over this last decade, elaborate control mechanisms of Mus81-Eme1 that are tightly linked to cell cycle progression have been identified.

In *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*), Mus81-Mms4^{EME1} is stimulated at the G2/M transition by Cdc5^{PLK1}-, Cdc28^{CDK1}- and Dbf4-dependent phosphorylation of Mms4^{EME1} [1–5]. In human cells, catalytic upregulation of MUS81-EME1 is driven by complex formation with the SLX4 nuclease scaffold[6–8]. This regulation is mediated by direct interaction between MUS81 and SLX4, which is strongly stimulated at the G2/M transition by phosphorylation of SLX4 by CDK1[9]. Reminiscent of what has been observed in *S. cerevisiae*, maximal processing of joint molecules such as Holliday junctions by MUS81-EME1 also correlates with hyperphosphorylation of EME1, possibly by CDK1 or PLK1[4]. Whether phosphorylation of EME1 contributes to the stimulation of MUS81-EME1 in human cells remains to be formally demonstrated. These mechanisms ensure that joint molecules such as Holliday junctions, D-loops or replication intermediates at under-replicated loci are efficiently resolved in mitosis before chromosome segregation[10]. By restricting the catalytic stimulation of Mus81-Eme1 to late stages of the cell cycle these control mechanisms also ensure that joint molecules and replication intermediates get a chance to be processed by more conservative non-endonucleolytic mechanisms that rely on their unfolding by RecQ helicases such as the BLM helicase in human cells and its Sgs1 and Rqh1^{BLM} orthologs in *S. cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe* (*S. pombe*), respectively. These temporal controls further prevent the accumulation of hyper-activated Mus81-Eme1 in S-phase and the risk of the unscheduled processing of replication intermediates. The importance of such control mechanisms is underscored by the marked genomic instability that is caused by the premature stimulation of Mus81-Mms4 in budding yeast cells that produce an Mms4 mutant that mimics a constitutively phosphorylated Mms4 protein[2]. Interestingly, SUMOylation and ubiquitination of Mms4 were recently shown to specifically target phosphorylated Mms4 for degradation by the proteasome, further ensuring that hyperactivation of Mus81-Mms4 is restricted to mitosis[11]. In human cells, SLX4-MUS81 complex formation induced by premature activation of CDK1 results in the unscheduled processing of replication intermediates genome wide and chromosome pulverization[9].

In *S. pombe*, upregulation of Mus81-Eme1 also relies on the phosphorylation of Eme1 by Cdc2^{CDK1}[12]. However, in contrast to what has been described in *S. cerevisiae*, phosphorylation of Eme1 by Cdc2^{CDK1} primes Eme1 for further DNA damage checkpoint-mediated phosphorylation in response to DNA damage. This elaborate control mechanism ensures that Mus81-Eme1 is rapidly hyperactivated in response to DNA damage in late G2 and mitosis and is critical to prevent gross chromosomal rearrangements in absence of the BLM-related helicase Rqh1^{BLM}[12].

To gain further insight into the molecular mechanisms involved in the control of Mus81-Eme1 in *S. pombe*, we undertook *in silico* analyses of a relatively short N-terminal domain of Eme1 that we found to be essential for cell viability in the absence of Rqh1^{BLM}. We identified Rad3^{ATR} consensus phosphorylation sites and two SUMO interacting Motifs (SIM1 and SIM2) within that domain. We demonstrate that Eme1 is a direct substrate for Rad3^{ATR} both *in vitro* and *in vivo* and show that it is phosphorylation of Eme1 by Rad3^{ATR}, not Chk1 as initially proposed, that primarily leads to the catalytic stimulation of Mus81-Eme1 in response to DNA damage. We provide genetic evidence that both Rad3^{ATR} - and Chk1-mediated phosphorylation of Eme1 are independently critical for cell fitness in the absence of Rqh1^{BLM}. Remarkably, Chk1-mediated phosphorylation of Eme1 is lost when SIM2 is mutated, while mutating SIM1 has no impact. Both SIMs are important for cell fitness in absence of Rqh1^{BLM}, while abrogating phosphoregulation of Mus81-Eme1 and mutating SIM1 and SIM2 recapitulates the synthetic lethality observed by deleting the N-terminus of Eme1 in the absence of Rqh1^{BLM}.

Results

Eme1 N-terminus is essential in absence of Rqh1^{BLM}

To gain further insight into the mechanisms underlying the catalytic stimulation of Mus81-Eme1 in response to DNA damage, we searched for domains of Eme1 that are essential in absence of Rqh1^{BLM} while dispensable for the intrinsic catalytic activity of Mus81-Eme1. Interestingly, we found that deleting a relatively short N-terminal domain (residues 1-117) of Eme1 is synthetic lethal

with *rqh1Δ* (**Fig 1A**). Importantly, this domain does not contain the Cdc2^{CDK} sites that we had previously reported to be involved in the stimulation of Mus81-Eme1 in response to DNA damage and to be critical for cell viability in absence of Rqh1^{BLM} [12]. A detailed *in silico* analysis of the first 117 residues of Eme1 led to the identification of two SQ/TQ Rad3^{ATR} consensus sites (S23Q and T50Q) and two putative SUMO-Interacting Motifs (SIMs), hereafter named SIM1 and SIM2, which matched the described (V/I)-X-(V/I)-X-(V/I/L) consensus sequence (**Fig 1B**)[13]. These observations suggested that Eme1 might be a direct substrate for Rad3^{ATR} and possess SUMO-binding properties. We tested these predictions in the following experiments.

Eme1 is a direct target of Rad3^{ATR} kinase

Eme1 contains in total eight putative Rad3^{ATR} consensus phosphorylation sites (S₂₃Q, T₅₀Q, S₁₂₆Q, T₁₄₅Q, T₂₁₅Q, S₃₁₃Q, T₃₈₄Q, S₄₅₈Q) (**Fig S1**). To determine whether Eme1 is a direct substrate of Rad3^{ATR} we set up *in vitro* kinase assays with recombinant Mus81-Eme1 and Rad3^{ATR}. Recombinant Mus81(6His)-(MBP)Eme1 was produced in *E. coli* and affinity purified on Ni⁺⁺ and amylose resins (**Fig 2A**). Recombinant (GFP)Rad3^{ATR} was instead transiently overproduced in yeast cells exposed to bleomycin in order to induce DNA damage and activate Rad3^{ATR}. We used a *chk1Δ cds1Δ rad3Δ* mutant strain to eliminate the possibility of endogenous checkpoint kinases co-purifying with (GFP)Rad3^{ATR}. As shown in **Figure 2B**, Eme1 was efficiently phosphorylated by (GFP)Rad3^{ATR}. To explore which SQ/TQ sites were important for phosphorylation we produced Mus81-Eme1 complexes in which SQ/TQ sites were mutated to AQ in three different clusters (**Fig S1**). The strongest effect was seen with mutations in Cluster 1, whilst mutations in Clusters 2 and 3 had a mild impact (**Fig 2B and C**). Noticeably, *in vitro* Rad3^{ATR}-mediated phosphorylation of Eme1 does not require the priming by Cdc2^{CDK1}. Taken together, these data indicate that the S₂₃Q and T₅₀Q sites in the N-terminus of Eme1 are most critical for its *in vitro* phosphorylation by Rad3^{ATR}.

To investigate whether Eme1 is a substrate for Rad3^{ATR} *in vivo*, we generated an *eme1^{8AQ}* mutant strain in which all SQ/TQ sites are mutated to AQ (**Fig S1**). As expected, whereas the cell-cycle dependent phosphorylation profile of Eme1^{8AQ} is comparable to that of the WT protein (**Fig 2D**), we observed a strong

reduction of the CPT-induced phosphorylation (**Fig 2E**). However, Rad3^{ATR}-dependent phosphorylation was not totally abolished in the Eme1^{8AQ} background (**Fig 2E**). We suspected that the residual Rad3^{ATR}-dependent phosphorylation of Eme1^{8AQ} was catalyzed by Chk1. Accordingly, we observed a complete loss of CPT-induced phosphorylation of Eme1^{8AQ} in *eme1^{8AQ} chk1Δ* cells (**Fig 2E**). Overall, our data strongly indicate that Eme1 is phosphorylated by both Chk1 and Rad3^{ATR} following activation of the DNA damage checkpoint.

Phosphorylation of Eme1 by Rad3^{ATR} is crucial in absence of Rqh1^{BLM}

We previously showed that *in vivo* DNA damage-induced hyperphosphorylation of Eme1 is strictly subordinated to prior Cdc2^{CDK1}-dependent phosphorylation [12]. Accordingly, mutating four CDK consensus target sites totally abrogates not only the cell-cycle dependent phosphorylation of the resulting Eme1^{4SA} protein but also its phosphorylation in response to DNA damage[12]. Importantly, the same study found that while an *eme1^{4SA}* single mutant displays no abnormal phenotype, an *eme1^{4SA} rqh1Δ* double mutant is extremely sick. These observations suggest that the Cdc2^{CDK1}-dependent phosphorylations of Eme1 are required for its phosphorylation by Rad3^{ATR}, and these events are critical in the absence of Rqh1^{BLM}.

To investigate the functional relevance of phosphorylation of Eme1 by Rad3^{ATR}, we introduced *eme1^{8AQ}* mutations in the *rqh1Δ* background. While we observed no obvious phenotype in the *eme1^{8AQ}* single mutant, the *eme1^{8AQ} rqh1Δ* double mutant displayed pronounced growth and colony formation defects compared to the *rqh1Δ* single mutant (**Fig 3A-C and S2A**). This genetic interaction was further exacerbated by exposure to genotoxic agents (**Fig S2B**). Hence, direct phosphorylation of Eme1 by Rad3^{ATR} appears to be important for cell viability in the absence of Rqh1^{BLM}.

Rad3^{ATR} direct phosphorylation of Eme1 contributes to the catalytic stimulation of Mus81-Eme1

We have previously shown that Rad3^{ATR} contributes to the catalytic stimulation of the HJ-resolvase activity of Mus81-Eme1[12]. We inferred at that time that the Rad3^{ATR}-Chk1 axis was involved in this catalytic control. The finding

that Rad3^{ATR} can directly phosphorylate Eme1, and this phosphorylation is crucial in absence of Rqh1^{BLM}, prompted us to investigate whether it contributed to the catalytic stimulation of Mus81-Eme1.

As previously reported[12], hyperphosphorylation of Eme1 following activation of the DNA damage checkpoint by CPT correlates with increased HJ-resolvase activity of Mus81-Eme1 complex isolated from fission yeast cells expressing TAP-tagged Eme1 (**Fig 4A and S3A**). Accordingly, no catalytic stimulation is detected when Mus81-Eme1 is precipitated from *rad3Δ* cells ([12] and **Fig 4B and S3B**). Remarkably, we find that the Mus81-Eme1^{8AQ} complex is not stimulated following CPT treatment despite a fully functional DNA damage checkpoint in *eme1^{8AQ}* mutant (**Fig 4C and S3C**). This demonstrates that it is the phosphorylation of Eme1 by Rad3^{ATR}, rather than by Chk1, that contributes to the catalytic stimulation of Mus81-Eme1. Consistently, Mus81-Eme1 can still be stimulated in *chk1Δ* cells following CPT treatment (**Fig 4D and S3D**). Overall, our data demonstrate that catalytic stimulation of Mus81-Eme1 relies primarily on phosphorylation of Eme1 by Rad3^{ATR} and not Chk1.

Here we have shown that two axes phosphorylate Eme1 in response to DNA damage with different outcomes. The Rad3^{ATR}-Chk1 branch of the DNA damage checkpoint phosphorylates Eme1 and contributes to non-catalytic functions of the complex while Rad3^{ATR} direct phosphorylation of Eme1 stimulates the HJ-resolvase activity of the Mus81-Eme1 complex (**Fig 4E**).

Eme1 contains bona-fide SIMs

Having confirmed our predictions that Eme1 is directly phosphorylated by Rad3^{ATR} and shown that this is critical for catalytic stimulation of Mus81-Eme1 and cell fitness in absence of Rqh1^{BLM}, we next undertook the analysis of the predicted SUMO-binding properties of Eme1 mediated by the putative SIM1 and SIM2 motifs in the N-terminal domain of Eme1 (**Fig 1B and 5A**).

The SUMO-binding capacities of SIM1 and SIM2 were assessed by a yeast two-hybrid assay against the unique *S. pombe* SUMO ortholog Pmt3. A fragment of Eme1 (Eme1¹⁻¹³⁰) containing SIM1 and SIM2 displayed strong binding to Pmt3, confirming that the N-terminus of Eme1 possesses SUMO-binding properties (**Fig 5A**). Introducing point mutations in the conserved aliphatic residues of SIM1

strongly impaired interaction with Pmt3 (**Fig 5A**) while mutations in SIM2 had a milder effect (**Fig 5A**). Mutations in both SIMs led to complete loss of interaction with Pmt3 (**Fig 5A**). Our data confirm that the N-terminal domain of Eme1, which is essential for cell viability in absence of Rqh1^{BLM} (**Fig 1A**), contains *bona fide* SIMs that jointly contribute to the SUMO-binding properties of Eme1, with a predominant contribution made by SIM1.

Eme1 SIMs are required in absence of Rqh1^{BLM}

To assess the functional relevance of SIM1 and SIM2, we generated mutant strains harboring the point mutations described in **Figure 5A** in SIM1 (*eme1^{SIM1*}*), SIM2 (*eme1^{SIM2*}*) or both SIMs (*eme1^{SIM1*+SIM2*}*) of Eme1. None of the three *eme1^{SIM1*}*, *eme1^{SIM2*}* and *eme1^{SIM1*+SIM2*}* mutant strains presented any obvious growth defect or reduced fitness compared to a WT strain in absence of exogenous DNA damage (**Fig 5B and C**) and following CPT treatment (**Fig 5D**). Since *eme1^{Δ117} rqh1Δ* double mutants are non-viable (**Fig 1A**), we next assessed the importance of SIM1 and/or SIM2 for cell viability in absence of Rqh1^{BLM}. As shown in **Figures 5E and F**, while mutating SIM1 in the *rqh1Δ* background does not reduce colony formation capacities of the resulting *eme1^{SIM1*} rqh1Δ* double mutant compared to the *rqh1Δ* single mutant, it leads to a marked increase in the proportion of elongated and sick cells (**Fig S4A**). In contrast, mutating SIM2 strongly impairs the ability of *eme1^{SIM2*} rqh1Δ* to form viable colonies (**Fig 5E and F**) in addition to causing a strong increase in the number of sick cells (**Fig S4A**). Simultaneously mutating both SIMs did not further impair colony formation capacities compared to *eme1^{SIM2*} rqh1Δ* cells (**Fig 5E and F**). However, it had an additive effect regarding the proportion of elongated and sick cells (**Fig S4A**).

We further looked at cell fitness following chronic exposure to CPT. Loss of Rqh1^{BLM} in *eme1^{SIM1*}* mutant slightly exacerbated CPT sensitivity compared to *rqh1Δ*. This effect was slightly more pronounced for *eme1^{SIM2*} rqh1Δ* mutants while the *eme1^{SIM1*+SIM2*} rqh1Δ* mutants displayed the steepest increase in CPT sensitivity compared to *rqh1Δ* (**Fig S4B**). Overall, these data demonstrate that both SIMs contribute to the essential role of the Eme1¹⁻¹¹⁷ N-terminal domain in absence of Rqh1^{BLM}, with a more prominent contribution made by SIM2.

SIM2 contributes to DNA damage-induced Eme1 phosphorylation

The importance of the Eme1 SIMs in absence of Rqh1^{BLM} prompted us to assess possible functional ties between the SUMO-binding properties of Eme1 and its phosphorylation. Interestingly, whereas mutating the SIMs had no obvious effect on the phosphorylation profile of Eme1^{SIM1*+SIM2*} throughout the cell cycle (**Fig 6A**), mutating SIM2 alone was sufficient to substantially reduce phosphorylation levels in response to CPT (**Fig 6B**). In contrast, mutating SIM1 had barely any impact. We next investigated which of the fission yeast SUMO E3 ligases, Pli1 and Nse2 (Watts et al., 2007), are required for DNA damage-induced phosphorylation of Eme1. Unexpectedly, we could detect clear DNA damage-induced phosphorylation of Eme1 in both *pli1Δ* and *nse2-SA* CPT-treated cells, as well as in a double mutant *pli1Δ nse2-SA* that lacks both SUMO-E3 ligases activities (**Fig 6C**). These results were replicated in *pmt3Δ* cells that lack SUMO (**Fig 6C**). Thus, the DNA damage-mediated phosphorylation of Eme1 that relies on an intact SIM2 motif does not require a SIM2-SUMO interaction.

Eme1 SIMs are not required for Mus81-Eme1 catalytic stimulation

To help decipher whether SIM2-dependent functions are important for phosphorylation of Eme1 by Chk1 or Rad3^{ATR}, we investigated whether they contribute to the catalytic stimulation of Mus81-Eme1, which we have shown strickly relies on Rad3^{ATR} and not Chk1 (**Fig 4B,D** and **S3B,D**). Strikingly, the Mus81-Eme1^{SIM1*+SIM2*} complex was efficiently stimulated following CPT-treatment (**Fig 6E and S5**) despite reduced levels of CPT-induced phosphorylation (**Fig 6D**). This demonstrates that the SIM-dependent functions of Eme1 are totally dispensable for direct phosphorylation of Eme1 by Rad3^{ATR} and catalytic stimulation of Mus81-Eme1 and suggests that they are instead key for phosphorylation of Eme1 by Chk1 (**Fig 6F**). Based on these findings and the severe growth defect of an *eme1^{SIM2*} rqh1Δ* double mutant, we propose that phosphorylation of Eme1 by Chk1 represents an additional phosphorylation-based layer of control of Mus81-Eme1 that is non-catalytic yet critical for cell viability in absence of Rqh1^{BLM}.

SUMO-binding capacities and phosphorylation cooperate for cell viability in absence of Rqh1^{BLM}

To further assess whether we have unraveled independent layers of regulation of Mus81-Eme1 that all contribute in their own way to cell survival in absence of Rqh1^{BLM}, we undertook genetic analyses by combining the mutations that impair the SIMs (i.e. *eme1^{SIM1*+SIM2*}*) with those that abrogate the cell-cycle and DNA damage dependent phosphorylations of Eme1 (i.e. *eme1^{4SA}*). The resulting *eme1^{SIM1*+SIM2*+4SA}* mutant strain displays a slightly reduced ability to form viable colonies in absence of exogenous stress (**Fig 7A and B**). Remarkably, while *eme1^{SIM1*+SIM2*} rqh1Δ* (**Fig 5E**) and *eme1^{4SA} rqh1Δ*[12] double mutant strains are sick but viable, we were unable to generate a viable *eme1^{SIM1*+SIM2*+4SA} rqh1Δ* strain (**Fig 7C**). This is reminiscent of the synthetic lethal interaction between *eme1^{Δ117}* and *rqh1Δ* and demonstrates that the Eme1¹⁻¹¹⁷ N-terminal domain is involved in three independent regulatory processes that each make key contributions to the essential functions fulfilled by Mus81-Eme1 in absence of Rqh1^{BLM}.

Discussion

In this study we have identified three independent layers of control of Mus81-Eme1 that are critical in absence of Rqh1^{BLM} (**Fig 7D**). A first layer relies on the phosphorylation of Eme1 by Rad3^{ATR} in response to DNA damage and is critical for the catalytic stimulation of Mus81-Eme1 (**Fig 4E and 7D**). A second layer also relies on the phosphorylation of Eme1 in response to DNA damage, but in this case it is mediated by Chk1 and does not involve the catalytic stimulation of Mus81-Eme1 (**Fig 4E and 7D**). It is noteworthy that both these layers require that Eme1 is first phosphorylated by Cdc2^{CDK1}[12]. The third layer relies on newly described SIM1- and SIM2-dependent SUMO-binding properties of Eme1.

In our initial study we had suggested that catalytic stimulation of Mus81-Eme1 in response to DNA damage relied on the phosphorylation of Eme1 by a classical DNA damage checkpoint signaling mechanism and that it was ultimately driven by phosphorylation of Eme1 by Chk1[12]. With the demonstration that it is in fact direct phosphorylation of Eme1 by Rad3^{ATR} and not Chk1 that is critical

in that process, we are providing important new insight into a control mechanism of Mus81-Eme1 that turns out to be even more elaborate than initially anticipated. Indeed, in addition to this Rad3-mediated catalytic control, our genetic analyses of the *eme1^{SIM2*}* mutant suggest that Chk1-dependent phosphorylation of Eme1, which relies on SIM2 (**Fig 6**), has to be kept in the picture as another functionally important modification for cell fitness in absence of Rqh1^{BLM} (**Fig 5E, S4**). It is noteworthy that all eight Rad3^{ATR} SQ/TQ phosphorylation sites are located before the coiled-coil domain of Eme1 and sit therefore within an intrinsically disordered part of Eme1. This is particularly relevant for the first two phosphorylation sites found in cluster 1 which are the only two within the Eme1¹⁻¹¹⁷ domain. They are the ones that also contribute the most to the phosphorylation of Eme1 by Rad3^{ATR} *in vitro*. It will be important to further investigate what structural impact phosphorylation of the N-terminus of Eme1 may have or whether it drives conformational changes by promoting the association with a coactivator and how this stimulates Mus81-Eme1. Hints that the poorly structured N-terminal domain of Eme1 may negatively impact the catalytic activity of Mus81-Eme1 may be seen in the increased *in vitro* activity that results from clipping off large N-terminal domains of human MUS81 and EME1 that are dispensable for the endonuclease function of the complex[14]. This would also be reminiscent of the auto-inhibition of human MUS81-EME1 by the N-terminal Helix-hairpin-Helix domain within MUS81 that is relieved upon association of the N-terminus of MUS81 with SLX4[15]. Cryo-EM studies of XPF-ERCC1 also revealed how conformational changes imposed by DNA binding relieved auto-inhibition by the N-terminal helicase domain of XPF[16]. Members of the XPF-family of SSEs, which all carry their catalytic-relevant functions in the C-terminal part of their subunits, appear to have evolved in a way that provides their N-terminal domains with regulatory functions mediated through controlled conformational changes. Based on our findings, such conformational changes driven by phosphorylation seems like a plausible explanation in the case of Eme1.

By demonstrating that stimulation of Mus81-Eme1 relies on direct phosphorylation of Eme1 by Rad3^{ATR} and not Chk1, we uncouple the catalytic control of Mus81-Eme1 in response to DNA damage from the canonical DNA

damage checkpoint signaling pathway. Indeed, we formally ruled out any contribution of Chk1 to the catalytic stimulation of Mus81-Eme1 given that a Mus81-Eme1^{8AQ} mutant complex still undergoes Chk1-mediated phosphorylation of Eme1^{8AQ} but shows absolutely no increased activity in response to DNA damage (**Fig 2E and 4C**). Importantly, phosphorylation of Eme1 by Rad3^{ATR} only occurs when Eme1 has first been phosphorylated by Cdc2^{CDK1}, which precludes phosphorylation of Eme1 by Rad3^{ATR} when the DNA replication checkpoint is activated[12]. It will be interesting to further investigate the timing of Mus81-Eme1 stimulation by Rad3^{ATR} in response to DNA damage. Is Mus81-Eme1 stimulated by Rad3^{ATR} before activation of the downstream Chk1 kinase? If so, Chk1-mediated phosphorylation of Eme1 that would occur after stimulation of Mus81-Eme1 could constitute a way to “turn off” Mus81-Eme1 once it has resolved recombination intermediates, maybe by driving its dissociation from chromatin as observed following phosphorylation of Mus81 by Cds1 in response to replication stress[17]. Or, are we instead in a scenario closer to what has been proposed by Smolka and colleagues where Mec1 signaling is uncoupled in *S. cerevisiae* from downstream Rad53 activation to allow direct control of repair enzymes by Mec1 without the need for prolonged cell-cycle arrest[18]?

Another pivotal finding of this study is the identification of two SIMs (SIM1 and SIM2) in the Eme1¹⁻¹¹⁷ N-terminal domain that jointly contribute to the newly reported SUMO-binding properties of Eme1, with a predominant contribution of the stronger SUMO-binder SIM1 (**Fig 5A**). It is noteworthy that while mutating the SIMs of Eme1 severely impacts cell viability in absence of Rqh1^{BLM} (**Fig 5E**) it did not lead to any increased sensitivity to CPT (**Fig 5D**). This contrasts with the acute hypersensitivity of *mus81Δ* and *eme1Δ* null cells and indicates that the Eme1 SIM-dependent functions are intimately linked to the control of Mus81-Eme1 in relation to Rqh1^{BLM} functions. This is reminiscent of what we have observed for the *eme1*^{4SA} and *eme1*^{8AQ} phosphorylation mutants that are unable to undergo Cdc2^{CDK1} or Rad3^{ATR}-mediated phosphorylation, respectively([12]and this study). However, we established that the SIM-dependent functions are not related to the catalytic control of Mus81-Eme1 in response to DNA damage. A likely explanation is that instead they contribute to the efficient recruitment and stabilization of

Mus81-Eme1 at sites where it is needed to process secondary DNA structures that accumulate in absence of Rqh1^{BLM}. In line with this, it was recently proposed that the human SLX4 nuclease scaffold that targets the XPF-ERCC1, MUS81-EME1 and SLX1 SSEs to specific genomic loci contains several SIMs that are involved in its own recruitment to telomeres, PML bodies and DNA damage[19,20]. An alternative and radically opposite explanation could be that the SIMs of Eme1 are involved in a process that negatively controls Mus81-Eme1 by sequestering the nuclease in subnuclear compartments, away from DNA secondary structures such as replication intermediates that could otherwise get opportunistically processed. In absence of Rqh1^{BLM} such structures would accumulate and their premature endonucleolytic processing would be deleterious to the cell. Such compartmentalisation has been observed in human cells with the nucleolar accumulation of MUS81-EME1 in S-phase and its relocalisation out of the nucleolus to sites of DNA damage in replicating cells following UV-irradiation[21].

Having confirmed by yeast two hybrid that SIM1 and SIM2 are *bone fide* SIMs that bind SUMO (**Fig 5A**), the most straightforward assumption would be that they are involved in the control of Mus81-Eme1 by jointly driving the interaction of Eme1 with one or several SUMOylated proteins. They could also drive transient conformational changes through internal interactions between the SIMs of Eme1 and SUMOylated Eme1 or Mus81, which both have been reported to undergo SUMOylation in *S. cerevisiae* and human cells [11,22,23]. Remarkably, we find that SIM1 and SIM2 fulfil independent functions. First of all, mutating the strong SUMO binding SIM1 causes the accumulation of sick cells in absence of Rqh1^{BLM} but it barely impacts colony formation, whereas mutating the much weaker SUMO-binder SIM2 significantly reduces colony formation in addition to causing the accumulation of sick cells. Mutating both SIMs synergistically increased the proportion of sick cells (**Fig 5E, F and S4A**). Furthermore, we also found that SIM2 but not SIM1 is required for the Chk1-dependent phosphorylation of Eme1 in response to DNA damage (**Fig 6B**). These results not only suggest that each SIM fulfils different functions, they also suggest that some of those fulfilled by SIM2 might extend beyond SUMO-binding when putting into perspective the SIM2-specific phenotypes and its relatively poor affinity for SUMO compared to

SIM1. In line with this, we found that Eme1 still undergoes DNA damage-triggered phosphorylation in mutant cells that do not produce SUMO (**Fig 6C**). This indicates that the processes that lead to the phosphorylation of Eme1 in response to DNA damage do not involve SUMO, including those that rely on SIM2. It also begs the question of what kind of protein-protein interaction might involve SIM2. While we cannot exclude that the mutations introduced in SIM2 induce structural changes that impact more than just SUMO-binding, there remains the exciting possibility that SIM2 drives the association of Eme1 with a partner that contains a SUMO-like domain (SLD)[24]. The only SLD-containing protein described so far in *S. pombe* is the Rad60 genome stability factor that contains two SLDs, each of which interact with different players of the SUMO pathway[25]. Interestingly, the presumed *S. cerevisiae* Rad60 ortholog Esc2 has been reported to interact with Mus81 via its SLDs and to stimulate the Mus81-Mms4 complex[26]. In addition, Esc2 was recently found to promote the degradation of phosphorylated Mms4[11]. We can exclude similar scenarios involving Rad60 as catalytic stimulation of Mus81-Eme1 still occurs when both SIMs are mutated (**Fig 6E**) and none of the SIMs were found to modulate the levels of Eme1 or phosphorylated Eme1. However, based on such functional promiscuity between Mus81-Mms4 and the SLD-containing Esc2 protein it is tempting to see Rad60 as the ideal candidate for a SIM2-mediated partner of Eme1 that would promote Chk1-dependent phosphorylation of Eme1 in response to DNA damage. This would not be the first example of regulatory processes that involve similar players but different outcomes for Mus81-Eme1 and Mus81-Mms4.

Overall, our findings show that the poorly structured N-terminal domain of Eme1 harbors essential regulatory functions of Mus81-Eme1, the control of which appears to be remarkably more elaborate than initially described. With the demonstration that it relies on three independent regulatory layers that together contribute to the vital functions it fulfils in cells lacking Rqh1^{BLM}, we are setting the basis for new lines of investigation that should contribute to a better understanding of the contributions made Mus81-Eme1 in the maintenance of genome stability.

Materials and Methods

Fission yeast strains, media, techniques and plasmids

Fission yeast strain genotypes are listed in Supplementary **table 1**. Media and methods for studying *S. pombe* were as described elsewhere[27].

The *eme1* mutants (*eme1*^{8AQ}, *eme1*^{SIM1*}, *eme1*^{SIM2*}, *eme1*^{SIM1*+SIM2*}, *eme1*^{SIM1*+SIM2*+4SA}) were generated as follows. The *Eme1* genomic locus from strain PH81 (*h+*, *leu1-32 ura4-D18 TAP-eme1 mus81:13Myc-KanMX6*), which produces N-terminally TAP-tagged Eme1, was subcloned into a TopoTA vector (Invitrogen). Point mutations were introduced on that TopoTA-*EME1* vector by using a Multiprime site-directed mutagenesis kit (Stratagene). Mutations were confirmed by DNA sequencing. The mutated *Eme1* genomic locus from the TopoTA-*Eme1* vector was used as template for PCR using primers forward 5' – acccatctctcacctaacc – 3' and reverse 5'- cagtattagcttacagcc – 3'. The PCR fragment was then used to transform strain PH41, in which a URA4 cassette replaces the start codon of *EME1* gene. 5'-FOA- resistant clones were selected and confirmed as *TAP-eme1* mutant producing strains by genomic DNA sequencing.

Cell synchronization

For synchronization of cells by *cdc25-22* block and release, cells containing the temperature-sensitive *cdc25-22* allele were grown to exponential phase at permissive temperature (25 °C) and shifted at restrictive temperature (36 °C) for 3.5 h to arrest the cell cycle in G2. Upon release to permissive temperature (25 °C), the cells synchronously enter the cell cycle. Cells were collected and processed every 20 min. Progression into S phase was monitored microscopically by counting cells that contained septa using calcofluor (Sigma) staining, the appearance of which correlates with S phase.

For DNA damage studies, Bleomycin (Merck) was added to cells arrested at the G2/M transition and further incubated at 36°C for 1,5h.

Colony formation assay

Fresh cultures were re-seeded on YES plates by micromanipulation and allowed to grow for 3 days at 32°C. At least 3 independent experiments were performed and averaged. Statistical significance (1 way ANOVA and Tuckey test) is displayed on each graph.

Yeast two-hybrid

Yeast strains were derived from EGY48 (*MAT α* , *ura3*, *his3*, *trp1*, and *LexA_{op(x6)}-LEU2*) containing the pSH18-34 (*LexA_{op(x8)}-LacZ*, *URA3*, and *amp^r*) plasmid. The fission yeast complementary DNA (cDNA) coding for the first 130 amino acid was cloned into the pJG4-5 (*B42-AD*, *TRP1*, and *amp^r*) and the pEG202 [*LexA₍₁₋₂₀₂₎DNA-BD*, *HIS3*, and *amp^r*] and cotransformed into EGY48 + pSH18-34 strain and plated onto -URA-TRP-HIS medium. To monitor protein interaction, clones were spotted onto 3% Gal-URA-TRP-HIS-LEU and 3% Gal-URA-TRP-HIS-Xgal (80 µg/ml) plates. Plates were incubated at 30°C for 2 to 4 days.

Protein extraction, Immunoprecipitation and immunoblotting

Cellular lysates were prepared from exponentially growing cell cultures treated with 40µM camptothecin (Sigma) or 5µg/ml bleomycin (Merck). Denatured cell lysates were prepared by TCA precipitation. Cells were suspended in 20% TCA and lysed mechanically using glass beads (Sigma). Following centrifugation, the TCA precipitate was suspended in SDS-PAGE loading buffer (Invitrogen) containing Tris-base. Protein extracts were directly resolved on Tris-acetate 3–8% polyacrylamide NuPAGE gels (Invitrogen). Proteins were transferred to a nitrocellulose Hybond-C membrane (Invitrogen). The membrane was blocked in PBS-T milk 5% and probed by using anti-Flag (Sigma F1804) antibody (1:5,000 dilution), anti Cdc2 (Santa-Cruz sc-53) antibody (1:1000 dilution), anti-tubulin alpha T5168 (Sigma).

Recombinant MBP-Eme1-Mus81-6-His production and purification

The cDNA of *eme1* and *mus81* were subcloned into the pMBP-parallel1 and pCDFDuet-1 plasmids respectively using in-fusion (Takara) cloning system. A 6-His tag was inserted in frame with *mus81* ORF for C-terminal of the protein. Plasmids were co-transformed in Rosetta™ (DE3)pLysS cells. The expression of

MBP-Eme1 and Mus81-6His was carried by growing the cells into auto-induced media (Formedium) at 37°C. Cells were harvest at 4°C, resuspended in PBS 1X and kept at -20°C. Lysis buffer 2X (100mM Tris-HCl, pH=8.0, 300mM NaCl, 20% glycerol, 0,2% NP-40, 2mM PMSF, 2mM β -Mercaptoethanol, protease inhibitor cocktail complete EDTA-free (Roche), 10 mg/mL lysozyme, 20mM imidazole) was added to lysed cells before incubation for 20 min at 4°C. The lysate was cleared by centrifugation before incubation on Ni²⁺ agarose beads (Qiagen) for 2h at 4°C. The beads were washed with 5 volumes of lysis buffer 1X and eluted with lysis buffer 1X supplemented with 250mM imidazole. Eluted complexes were incubated with amylose beads (NEB) for 2h at 4°C. The beads were washed 3 times in lysis buffer 1X and twice in kinase buffer (25mM HEPES-KOH, pH=7.5, 50mMKCl, 10mM MgCl₂, 10mM MnCl₂, 2% glycerol, 0,1% NP-40, 50mM NaF, 1mM Na₃VO₄, 50mM β -glycerophosphate, 1mM DTT). Complexes were eluted in kinase buffer supplemented with 10mM maltose. Proteins were aliquoted, snap-frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C for long term storage.

GFP-Rad3^{ATR} production and *in vitro* kinase assay.

GFP-Rad3^{ATR} was transiently expressed from the full-length nmt41 promoter from *cds1Δ chk1Δ rad3Δ* cells treated 2h with bleomycin. Cells pellets were disrupted using a Ball Mill (Retsch) in presence of liquid Nitrogen. Resulting powder was resuspended in 2 volumes/weight of lysis buffer (50mM Tris-HCl, pH=8.0, 500mM NaCl, 10% glycerol, 1% NP-40, 50mM NaF, 1mM Na₃VO₄, 50mM β -glycerophosphate (Sigma), 2mM PMSF, 1mM DTT, protease inhibitor cocktail complete EDTA free (Roche)). Lysates were cleared by centrifugation before incubation on GFP-TRAP agarose beads (Chromotek) at 4°C for 1h. Beads were washed three times with lysis buffer and twice with kinase buffer (25 mM HEPES-KOH, pH=7.5, 50mM KCl, 10mM MgCl₂, 10mM MnCl₂, 2% glycerol, 0,1% NP-40, 50mM NaF, 1mM Na₃VO₄, 50mM β -glycerophosphate, 1mM DTT). GFP-Rad3^{ATR} was kept attached on beads for the following kinase assays.

GFP-TRAP-bound GFP-Rad3^{ATR} was resuspended in kinase buffer supplemented 100 μ M of cold ATP before addition of 10 μ Ci γ ³²P-ATP and substrates. After 30 min at 30°C, reactions were stopped by the addition of 15 μ L of 4X SDS sample

buffer. Samples were denatured and resolved by SDS-PAGE electrophoresis. Following Coomassie staining, gel was dried and expose with phosphorimager.

In vitro nuclease assay

TAP-Eme1 (2xProtA-TEVsite-2xFlag-Eme1) was affinity purified and used in nuclease assays on X12 mobile HJ as previously described[28]. Briefly, cell pellets were resuspended in 1 volume to weight lysis buffer (50mM Tris-HCl, pH=8.0, 150 mM NaCl, 10% glycerol, 0,1% NP-40, 50mM NaF, 50mM β -glycerophosphate (Sigma), 2mM PMSF, protease inhibitor cocktail complete EDTA free (Roche)). Cells were subjected to mechanical lysis using a Ball Mill (MM400 Retsch). For this, usually, 4 to 5 ml of the cell suspension were poured into grinding chambers precooled in liquid nitrogen. The frozen cell pellet was disrupted by 2 agitation runs at 30hz. The resulting powder was resuspended in another 1 volume to weight of lysis buffer and centrifuged. Clear supernatant was loaded onto IgG sepharose beads (Cytiva) for 2h at 4°C (20 μ l packed beads used for 4 ml of lysate). After extensive washes, proteins were eluted in presence of 60 μ l of AcTEV protease for 1h at RT. In order to determine the relative amount of Mus81-Eme1 between different samples, 3 μ l of each TEV eluate was treated with phosphatase before SDS-PAGE and Western blot analysis in order to collapse the Eme1 signal into a single band of dephosphorylated Eme1. The relative intensity of the dephosphorylated Eme1 band was quantified for each sample using the ImageLab software. Dilution folds were calculated and used to bring the concentration of each sample down to that of the least concentrated sample. 3 μ l of each normalized sample was used in nuclease assays with 32 P-labelled DNA substrates as previously described[28].

TCA (Sigma T6399)

Glass beads (Sigma G8772)

Calcofluor (Sigma 18909)

S-(+)-Camptothecin (Sigma C9911)

Bleomycin (Calbiochem 9041-93-4)

Hydroxyurea (Sigma H8627)

Protease inhibitor Cocktail EDTA-free (Roche 11873580001)

Anti Flag (Sigma F1804)

Anti Cdc2 (Santa-Cruz sc-53)

Anti tubulin (Sigma T5168)

GFP-TRAP magnetic-agarose (Chromotek gtma-20)

Ni-NTA agarose beads (Qiagen 70666-3)

Amylose resin (NEB E8021S)

Phosphatase (NEB P0753S)

IgG Sepharose® 6 Fast Flow (Cytiva 17-0969-01)

AcTEV (Invitrogen 12575015)

Acknowledgements

Many thanks to Paul Russell, Nick Boddy and Jean-Hugues Guervilly for their critical and careful reading of the manuscript and for their encouragements. “Milles merci” to Charly Chahwan for hinting at the SUMO-related functions of Eme1 a long time ago and for his enthusiastic support. We thank our colleagues of the 3R community at CRCM for their support and stimulating discussions. We thank Samuel Granjeaud for help on statistical analyses. We are grateful to Nick Boddy, Katsunori Tanaka and Benoit Arcangioli for sharing the *nse2-SA*, *pmt3Δ* and *pli1Δ* mutant strains, respectively. This work was supported by grants from Agence Nationale de la Recherche (ANR-10BLAN-1512-01) and Institut National du Cancer (INCa-PLBio2016-159 and INCa-PLBio2019-152) awarded to PHLG and a Dotation Jeune Chercheur of the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale awarded to PMD. CG was a recipient of fellowships awarded by the Fondation pour la Recherche Médicale (FRM grant number ECO20170637468) and the Fondation ARC (grant ARCD0C42020010001276).

Author contributions

PMD, CG and PHLG conceived the experiments. PMD and CG designed and carried out all genetic analyses. PMD and CG undertook the *in silico* analyses of Eme1 primary sequence. PMD focused primarily on the SUMO-related functions of Eme1 whilst CG worked primarily on the phosphorylation of Eme1 by Rad3^{ATR}. CG designed and performed all *in vitro* nuclease assays with help from SS. The *in vitro* kinase assays were designed and set up by CG. SC and SS carried out Y2H assays. SS provided technical assistance for routine molecular biology and cloning techniques. PMD and PHLG wrote the paper and all authors read and corrected the manuscript.

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

References

1. Gallo-Fernandez M, Gallo-Fernández M, Saugar I, Saugar I, Ortiz-Bazan MA, Ortiz-Bazán MÁ, et al. Cell cycle-dependent regulation of the nuclease activity of Mus81-Eme1/Mms4. *Nucleic Acids Research*. 2012;40: 8325–8335. doi:10.1093/nar/gks599
2. Szakal B, Brnzei D. Premature Cdk1/Cdc5/Mus81 pathway activation induces aberrant replication and deleterious crossover. *The EMBO journal*. 2013;32: 1155–1167. doi:10.1038/emboj.2013.67
3. Gritenaite D, Gritenaite D, Princz LN, Princz LN, Szakal B, Szakal B, et al. A cell cycle-regulated Slx4-Dpb11 complex promotes the resolution of DNA repair intermediates linked to stalled replication. *Genes & Development*. 2014;28: 1604–1619. doi:10.1101/gad.240515.114
4. Matos J, Blanco MG, Maslen S, Skehel JM, West SC. Regulatory control of the resolution of DNA recombination intermediates during meiosis and mitosis. *Cell*. 2011;147: 158–72. doi:10.1016/j.cell.2011.08.032
5. Princz LN, Wild P, Bittmann J, Aguado FJ, Blanco MG, Matos J, et al. Dbf4-dependent kinase and the Rtt107 scaffold promote Mus81-Mms4 resolvase activation during mitosis. *The EMBO journal*. 2017;36: 664–678. doi:10.15252/embj.201694831
6. Svendsen JM, Smogorzewska A, Sowa ME, O’Connell BC, Gygi SP, Elledge SJ, et al. Mammalian BTBD12/SLX4 assembles a Holliday junction resolvase and is required for DNA repair. *Cell*. 2009;138: 63–77. doi:10.1016/j.cell.2009.06.030
7. Fekairi S, Scaglione S, Chahwan C, Taylor ER, Tissier A, Coulon S, et al. Human SLX4 is a Holliday junction resolvase subunit that binds multiple DNA repair/recombination endonucleases. *Cell*. 2009;138: 78–89. doi:10.1016/j.cell.2009.06.029
8. Munoz IM, Hain K, Déclais A-C, Gardiner M, Toh GW, Sanchez-Pulido L, et al. Coordination of structure-specific nucleases by human SLX4/BTBD12 is required for DNA repair. *Mol Cell*. 2009;35: 116–127. doi:10.1016/j.molcel.2009.06.020
9. Duda H, Arter M, Gloggnitzer J, Teloni F, Wild P, Blanco MG, et al. A Mechanism for Controlled Breakage of Under-replicated Chromosomes during Mitosis. *Developmental Cell*. 2016;39: 740–755. doi:10.1016/j.devcel.2016.11.017
10. Dehé P-M, Gaillard P-HL. Control of structure-specific endonucleases to maintain genome stability. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2017;18: 315–330. doi:10.1038/nrm.2016.177

11. Waizenegger A, Urulangodi M, Lehmann CP, Reyes TAC, Saugar I, Tercero JA, et al. Mus81-Mms4 endonuclease is an Esc2-STUbL-Cullin8 mitotic substrate impacting on genome integrity. *Nat Commun.* 2020;11: 5746. doi:10.1038/s41467-020-19503-4
12. Dehé P-M, Coulon S, Scaglione S, Shanahan P, Takedachi A, Wohlschlegel JA, et al. Regulation of Mus81-Eme1 Holliday junction resolvase in response to DNA damage. *Nat Struct Mol Biol.* 2013;20: 598–603. doi:10.1038/nsmb.2550
13. Kerscher O. SUMO junction-what's your function? New insights through SUMO-interacting motifs. *EMBO reports.* 2007;8: 550–555. doi:10.1038/sj.embor.7400980
14. Taylor ER, McGowan CH. Cleavage mechanism of human Mus81-Eme1 acting on Holliday-junction structures. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 2008;105: 3757–3762. doi:10.1073/pnas.0710291105
15. Wyatt HDM, Laister RC, Martin SR, Arrowsmith CH, West SC. The SMX DNA Repair Tri-nuclease. *Mol Cell.* 2017;65: 848-860.e11. doi:10.1016/j.molcel.2017.01.031
16. Jones M, Beuron F, Borg A, Nans A, Earl CP, Briggs DC, et al. Cryo-EM structures of the XPF-ERCC1 endonuclease reveal how DNA-junction engagement disrupts an auto-inhibited conformation. *Nat Commun.* 2020;11: 1120. doi:10.1038/s41467-020-14856-2
17. Kai M, Boddy MN, Russell P, Wang TS-F. Replication checkpoint kinase Cds1 regulates Mus81 to preserve genome integrity during replication stress. *Genes & Development.* 2005;19: 919–932. doi:10.1101/gad.1304305
18. Ohouo PY, Oliveira FMB de, Liu Y, Ma CJ, Smolka MB. DNA-repair scaffolds dampen checkpoint signalling by counteracting the adaptor Rad9. *Nature.* 2013;493: 120–124. doi:10.1038/nature11658
19. González-Prieto R, Cuijpers SA, Luijsterburg MS, Attikum H van, Vertegaal AC. SUMOylation and PARylation cooperate to recruit and stabilize SLX4 at DNA damage sites. *EMBO reports.* 2015;16: 512–519. doi:10.15252/embr.201440017
20. Guervilly J-H, Takedachi A, Naim V, Scaglione S, Chawhan C, Lovera Y, et al. The SLX4 Complex Is a SUMO E3 Ligase that Impacts on Replication Stress Outcome and Genome Stability. *Mol Cell.* 2015;57: 123–137. doi:10.1016/j.molcel.2014.11.014
21. Gao H, Chen X-B, McGowan CH. Mus81 endonuclease localizes to nucleoli and to regions of DNA damage in human S-phase cells. *Molecular biology of the cell.* 2003;14: 4826–4834. doi:10.1091/mbc.e03-05-0276
22. Xiao Z, Chang J-G, Hendriks IA, Sigurðsson JO, Olsen JV, Vertegaal ACO. System-wide Analysis of SUMOylation Dynamics in Response to Replication

Stress Reveals Novel Small Ubiquitin-like Modified Target Proteins and Acceptor Lysines Relevant for Genome Stability. *Molecular & cellular proteomics : MCP*. 2015;14: 1419–1434. doi:10.1074/mcp.o114.044792

23. Hu L, Yang F, Lu L, Dai W. Arsenic-induced sumoylation of Mus81 is involved in regulating genomic stability. *Cell cycle (Georgetown, Tex)*. 2017;16: 802–811. doi:10.1080/15384101.2017.1302628

24. Prudden J, Perry JJP, Arvai AS, Tainer JA, Boddy MN. Molecular mimicry of SUMO promotes DNA repair. *Nat Struct Mol Biol*. 2009;16: 509–516. doi:10.1038/nsmb.1582

25. Prudden J, Perry JJP, Nie M, Vashisht AA, Arvai AS, Hitomi C, et al. DNA repair and global sumoylation are regulated by distinct Ubc9 noncovalent complexes. *Molecular and Cellular Biology*. 2011;31: 2299–2310. doi:10.1128/mcb.05188-11

26. Sebesta M, Urulangodi M, Stefanovie B, Szakal B, Pacesa M, Lisby M, et al. Esc2 promotes Mus81 complex-activity via its SUMO-like and DNA binding domains. *Nucleic Acids Research*. 2016;45: 215–230. doi:10.1093/nar/gkw882

27. Moreno S, Klar A, Nurse P. [56] Molecular genetic analysis of fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Methods Enzymol*. 1991;194: 795–823. doi:10.1016/0076-6879(91)94059-l

28. Gaillard P-HL, Noguchi E, Shanahan P, Russell P. The endogenous Mus81-Eme1 complex resolves Holliday junctions by a nick and counternick mechanism. *Mol Cell*. 2003;12: 747–759.

Figures legends

Figure 1: Eme1 N-terminal part (1-117) is essential in absence of Rqh1^{BLM}

A- Tetrad analysis of an *eme1*^{Δ117} x *rqh1*Δ mating, germinated at 30 °C. Boxes below dissections indicate the genotypes of each spore.

B- Schematic of Eme1 protein. The yellow box depicts the first 117 amino-acid residues required for cell survival in absence of Rqh1^{BLM}. The serine and threonine residues responding to Rad3^{ATR}-consensus phosphorylation sites are depicted in red and the SUMO-Interacting Motifs are represented by blue squares. The serine residues targeted by Cdc2 are depicted in green.

Figure 2: Rad3^{ATR} directly phosphorylates Eme1 *in vitro*

A- Recombinant *mus81* was co-expressed with either wild-type *eme1*, *eme1*^{cluster1*}, *eme1*^{cluster2*} or *eme1*^{cluster3*} and purified from bacterial cultures (purification scheme is depicted on the left).

B- Rad3^{ATR} *in vitro* kinase assay on full-length recombinant Mu81-Eme1 complexes containing either wild-type Eme1 or Eme1 mutated for S₂₃/T₅₀ (cluster1*) or S₁₂₆/T₁₄₅/T₂₁₅ (cluster 2*) or S₃₁₃/T₃₈₄/S₄₅₈ (cluster 3*).

C- All clusters contribute to Eme1 Rad3^{ATR}-dependent phosphorylation with S₂₃/T₅₀ (cluster1*) being the most important.

D- Cultures from *cdc25-22 TAP-eme1* and *cdc25-22 TAP-eme1*^{8AQ} were synchronized at the G2/M transition and released for one cell cycle. Total proteins were extracted at each indicated time point of the time course and analyzed by Western blot using an antibody raised against the Flag tag of Eme1. Ponceau stained membranes are depicted as loading control.

E- Western blot on total lysates from untreated or 40 μM CPT-treated cells of the indicated background. Tubulin is used as a loading control.

Note: TAP- = 2xProtA-TEVsite-2xFlag-

Figure 3: Negative genetic interaction between *eme1*^{8AQ} and *rqh1*Δ

A- Tetrad analysis of an *eme1*^{8AQ} x *rqh1*Δ mating, germinated at 30 °C. Boxes below dissections indicate the genotypes of each spore.

B- Exponentially growing *eme1^{BAQ}*, *rqh1Δ* and *eme1^{BAQ} rqh1Δ* cells were seeded on YES plates by micromanipulation and allowed to grow for 3 days at 32°C.

C- Average percentage ($\pm$ s.d.) of viable colonies (n=3 independent experiments). Statistical significance is measured with one-way ANOVA followed by Tuckey post-test.

Figure 4: Rad3^{ATR} phosphorylation of Eme1 contributes to the catalytic stimulation of Mus81-Eme1 resolvase activity

A- Upper panel: Neutral PAGE showing ³²P-labeled (red dot) HJs incubated for the indicated times with Mus81-Eme1 complexes recovered from untreated or 40 μ M CPT-treated *TAP-eme1* (“wild type”) cells as described in Materials and Methods. Identical amounts of TEV eluates were used in each reaction after normalization of their relative concentration (see Materials and Methods).

Lower panel: Average ($\pm$ s.d.) fold stimulation of HJ resolution by Mus81-Eme1 following CPT-treatment (n=3 independent experiments, see S3). The histogram shows the ratio of the HJ-resolvase activity of Mus81-Eme1 from CPT-treated *TAP-eme1* (“wild type”) cells over that of Mus81-Eme1 from untreated *TAP-eme1* (“wild type”) cells (fold induction).

B- Upper panel: Same as Upper panel A- but with Mus81-Eme1 from *TAP-eme1 rad3Δ* cells.

Lower panel: Same as Lower panel A- but with Mus81-Eme1 from *TAP-eme1 rad3Δ* cells.

C- Upper panel: Same as Upper Panel A- but with Mus81-Eme1 from *TAP-eme1 eme1^{BAQ}* cells.

Lower panel: Same as Lower panel A- but with Mus81-Eme1 from *TAP-eme1 eme1^{BAQ}* cells.

D- Upper panel: Same as Upper panel A- but with Mus81-Eme1 from *TAP-eme1 chk1Δ* cells.

Lower panel: Same as Lower panel A- but with Mus81-Eme1 from *TAP-eme1 chk1Δ* cells.

E- Model for the Cdc2-, Rad3^{ATR}- and Rad3^{ATR}-Chk1-dependent phosphorylation of Eme1 and their respective contributions.

Note: TAP- = 2xProtA-TEVsite-2xFlag-

Figure 5: Eme1 contains *bona-fide* SIMs

- A- A fragment of Eme1 (eme1¹⁻¹³⁰) containing SIM1 and SIM2 was used as bait in a Yeast two-hybrid assay for interaction with SUMO^{PMT3}. The SIMs consensus sequences are indicated as well as the mutations introduced in each of them.
- B- Exponentially growing wild type, *eme1Δ*, *eme1^{SIM1*}*, *eme1^{SIM2*}* and *eme1^{SIM1*+SIM2*}* cells were seeded on YES plates by micromanipulation and allowed to grow for 3 days at 32°C.
- C- Average percentage (± s.d.) of viable colonies (n=3 independent experiments). Statistical significance is measured with one-way ANOVA followed by Tuckey post-test.
- D- Five-fold dilutions of wild-type, *rqh1Δ*, *eme1^{SIM1*}*, *eme1^{SIM2*}* and *eme1^{SIM1*+SIM2*}* cells were plated on medium supplemented or not with the indicated concentrations of CPT followed by incubation at 30 °C.
- E- Exponentially growing *rqh1Δ*, *eme1^{SIM1*}*, *eme1^{SIM2*}* and *eme1^{SIM1*+SIM2*}* as well as two independent clones of *eme1^{SIM1*} rqh1Δ*, *eme1^{SIM2*} rqh1Δ* and *eme1^{SIM1*+SIM2*} rqh1Δ* were seeded on YES plates by micromanipulation and allowed to grow for 3 days at 32°C.
- F- Average percentage (± s.d.) of viable colonies (n=3 independent experiments). Statistical significance is measured with one-way ANOVA followed by Tuckey post-test.

Figure 6: Mutations within the SIMs differently affect Eme1 phosphorylation

- A- Cultures from *cdc25-22 TAP-eme1* and *cdc25-22 TAP- eme1^{SIM1*+SIM2*}* were synchronized at the G2/M transition and released for one cell cycle. Total proteins were extracted at each indicated time point of the time course and analyzed by Western blot using an antibody raised against the Flag tag of Eme1. Cdc2 is used as a loading control.
- B- Same as A- for asynchronous cultures from untreated or 40 μM CPT-treated cells of the indicated genotypes.
- C- Same as A- for asynchronous cultures from untreated or 40 μM CPT-treated cells of the indicated genotypes.

D- Same as A- for asynchronous cultures from untreated or 40 μ M CPT-treated cells of the indicated genotypes.

E- Upper panel: Neutral PAGE showing 32 P-labeled (red dot) HJs incubated for the indicated times with Mus81–Eme1 complexes recovered from untreated or 40 μ M CPT-treated *TAP-eme1^{SIM1*+SIM2*}* cells as described in Materials and Methods. Identical amounts of TEV eluates were used in each reaction after normalization of their relative concentration (see Materials and Methods).

Lower panel: Average ($\pm$ s.d.) fold stimulation of HJ resolution by Mus81–Eme1 following CPT-treatment (n=3 independent experiments, see S5). The histogram shows the ratio of the HJ-resolvase activity of Mus81–Eme1 from CPT-treated *TAP-eme1^{SIM1*+SIM2*}* cells over that of Mus81–Eme1 from untreated *TAP-eme1^{SIM1*+SIM2*}* cells (fold induction).

F- Model for the Cdc2-, Rad3^{ATR}- and Rad3^{ATR}-Chk1-dependent phosphorylation of Eme1 and its SUMO binding properties. The interplay between Eme1 phosphorylation and SUMO-binding properties is detailed in text.

Note: TAP- = 2xProtA-TEVsite-2xFlag-

Figure 7: The combined loss of Eme1 phosphorylation and SUMO-binding properties is lethal in absence of Rqh1^{BLM}

A- Exponentially growing *eme1^{SIM1*+SIM2*}*, *eme1^{4SA}* and *eme1^{SIM1*+SIM2*+4SA}* cells were seeded on YES plates by micromanipulation and allowed to grow for 3 days at 32°C.

B- Average percentage ($\pm$ s.d.) of viable colonies (n=3 independent experiments). Statistical significance is measured with one-way ANOVA followed by Tuckey post-test.

C- Tetrad analysis of an *eme1^{SIM1*+SIM2*+4SA}* x *rqh1 Δ* mating, germinated at 30 °C. Boxes below dissections indicate the genotypes of each spore.

D- Model depicting the respective contributions of Eme1 phosphorylation and SUMO-binding properties in the phenotype observed in absence of Rqh1^{BLM}.

Supplementary Figure legends

Figure S1:

The Rad3^{ATR}-consensus sites are widespread throughout Eme1 sequence and were subdivided in three clusters (Upper panel). All Rad3^{ATR}-consensus sites are mutated in Alanine to generate *eme1*^{8AQ} mutant (Lower panel).

Figure S2:

A- Exponentially growing cultures of *eme1*^{8AQ}, *rqh1*Δ and *eme1*^{8AQ} *rqh1*Δ cells were heated-fixed and observed by fluorescent-microscopy using DAPI staining. Cells were classified based on their morphologies. Small G2 cells (Type 1), elongated binucleated and/or septated cells (Type 2) and sick cells (Type 3).

B- Five-fold dilutions of cells with the indicated genotype were plated on medium supplemented or not with the indicated concentrations of CPT, HU and MMS followed by incubation at 30 °C.

Figure S3:

A- Neutral PAGE showing ³²P-labeled (red dot) HJs incubated for the indicated times with Mus81–Eme1 complexes recovered from untreated or 40 μM CPT-treated *TAP-eme1* (“wild type”) cells as described in Materials and Methods. Identical amounts of TEV eluates were used in each reaction after normalization of their relative concentration (see Materials and Methods).

B- Same as A- but with Mus81–Eme1 from untreated or 40 μM CPT-treated *TAP-eme1 rad3*Δ cells.

C- Same as A- but with Mus81–Eme1 from untreated or 40 μM CPT-treated *TAP-eme1 eme1*^{8AQ} cells.

D- Same as A- but with Mus81–Eme1 from untreated or 40 μM CPT-treated *TAP-eme1 chk1*Δ cells.

Note: TAP- = 2xProtA-TEVsite-2xFlag-

Figure S4:

A- Cells from exponentially growing cultures of the indicated genotypes were heated-fixed and observed by fluorescent-microscopy using DAPI staining (same as S2), counted and sorted depending on their morphologies.

B- Five-fold dilutions of cells with the indicated genotype were plated on medium supplemented or not with the indicated concentrations of CPT followed by incubation at 30 °C.

Figure S5:

Neutral PAGE showing ³²P-labeled (red dot) HJs incubated for the indicated times with Mus81–Eme1 complexes recovered from untreated or 40 μM CPT-treated *TAP-eme1^{SIM1*+SIM2*}* cells as described in Materials and Methods. Identical amounts of TEV eluates were used in each reaction after normalization of their relative concentration (see Materials and Methods).

Note: TAP- = 2xProtA-TEVsite-2xFlag-

Strain	Mating type	Genotype
PH 41	h-	<i>leu1-32 ura4-D18 eme1::ura4</i>
PH 81	h+	<i>leu1-32 ura4-D18 TAP:eme1 mus81:13myc-KanMX6</i>
PH 84	h?	<i>leu1-32 ura4-D18 chk1::ura4</i>
PH 171	h-	<i>leu1-32 ura4-D18 cdc25-22 TAP:eme1</i>
PH 454	h-	<i>leu1-32 ura4-D18 TAP:eme1 rqh1::ura4</i>
PH 466	h-	<i>leu1-32 ura4-D18 TAP:eme1</i>
PH 735	h?	<i>leu1-32 ura4-D18 TAP:eme1(Δ117)</i>
PH 918	h-	<i>leu1-32 ura4-D18 TAP:eme1(SIM1*)</i>
PH 920	h-	<i>leu1-32 ura4-D18 TAP:eme1(SIM2*)</i>
PH 922	h-	<i>leu1-32 ura4-D18 TAP:eme1(SIM1*+SIM2*)</i>
PH 1020	h?	<i>leu1-32 ura4-D18 cdc25-22 TAP:eme1(SIM1*+SIM2*)</i>
PH 1085	h?	<i>leu1-32 ura4-D18 TAP:eme1 rad3::KanMX6</i>
PH 1104	h?	<i>leu1-32 ura4-D18 TAP:eme1 nse2-SA</i>
PH 1203	h-	<i>leu1-32 ura4-D18 TAP:eme1(8AQ)</i>
PH 1211	h?	<i>leu1-32 ura4-D18 cdc25-22 TAP:eme1(8AQ) mus81:13myc-KanMX6</i>
PH 1229	h?	<i>leu1-32 ura4-D18 chk1::ura4 cds1::ura4 rad3 ::KanMX6 pREP41-GFP:Rad3</i>
PH 1249	h?	<i>leu1-32 ura4-D18 chk1::ura4 TAP:eme1(8AQ)</i>
PH 1255	h?	<i>leu1-32 ura4-D18 TAP:eme1 pli1::KanMX6</i>
PH 1263	h?	<i>leu1-32 ura4-D18 TAP:eme1 pli1::KanMX6 nse2-SA</i>
PH 1298	h+	<i>leu1-32 ura4-D18 rqh1::KanMX6</i>
PH 1299	h?	<i>leu1-32 ura4-D18 rqh1::KanMX6 TAP:eme1(8AQ)</i>
PH 1300	h?	<i>leu1-32 ura4-D18 rqh1::KanMX6 TAP:eme1(8AQ)</i>
PH 1331	h-	<i>leu1-32 ura4-D18 TAP:eme1(SIM1*+SIM2*+4SA)</i>
PH 1332	h-	<i>leu1-32 ura4-D18 TAP:eme1(SIM1*+SIM2*+4SA)</i>
PH 1430	h?	<i>leu1-32 ura4-D18 TAP:eme1(SIM1*) rqh1::KanMX6</i>
PH 1431	h?	<i>leu1-32 ura4-D18 TAP:eme1(SIM1*) rqh1::KanMX6</i>
PH 1432	h?	<i>leu1-32 ura4-D18 TAP:eme1(SIM2*) rqh1::KanMX6</i>
PH 1433	h?	<i>leu1-32 ura4-D18 TAP:eme1(SIM2*) rqh1::KanMX6</i>
PH 1434	h?	<i>leu1-32 ura4-D18 TAP:eme1(SIM1*+SIM2*) rqh1::KanMX6</i>
PH 1435	h?	<i>leu1-32 ura4-D18 TAP:eme1(SIM1*+SIM2*) rqh1::KanMX6</i>
PH 1436	h?	<i>leu1-32 ura4-D18 TAP:eme1 pmt3::ura4</i>

Figure 1

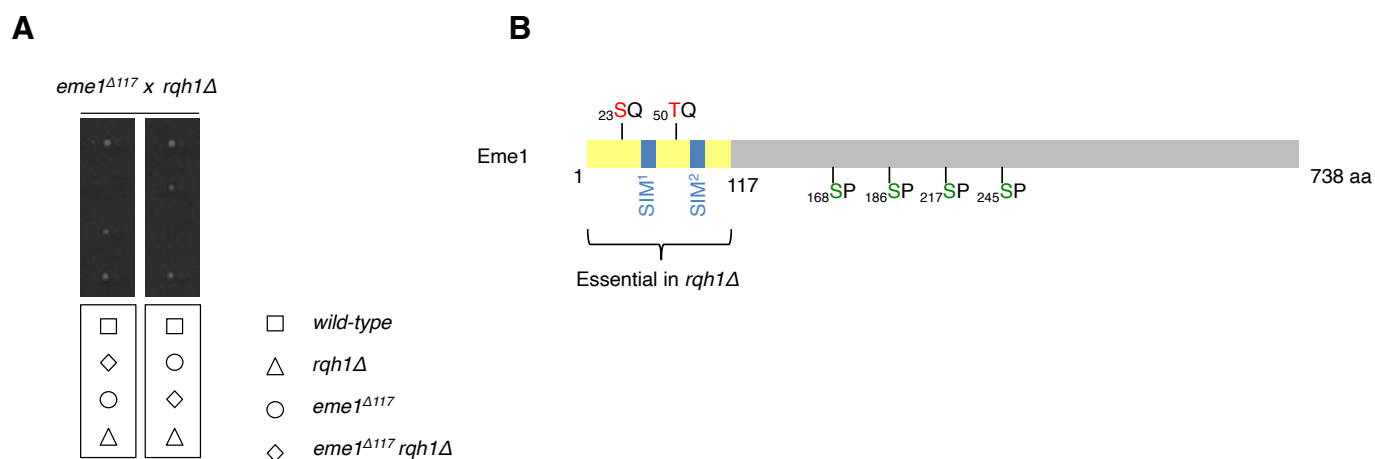


Figure 2

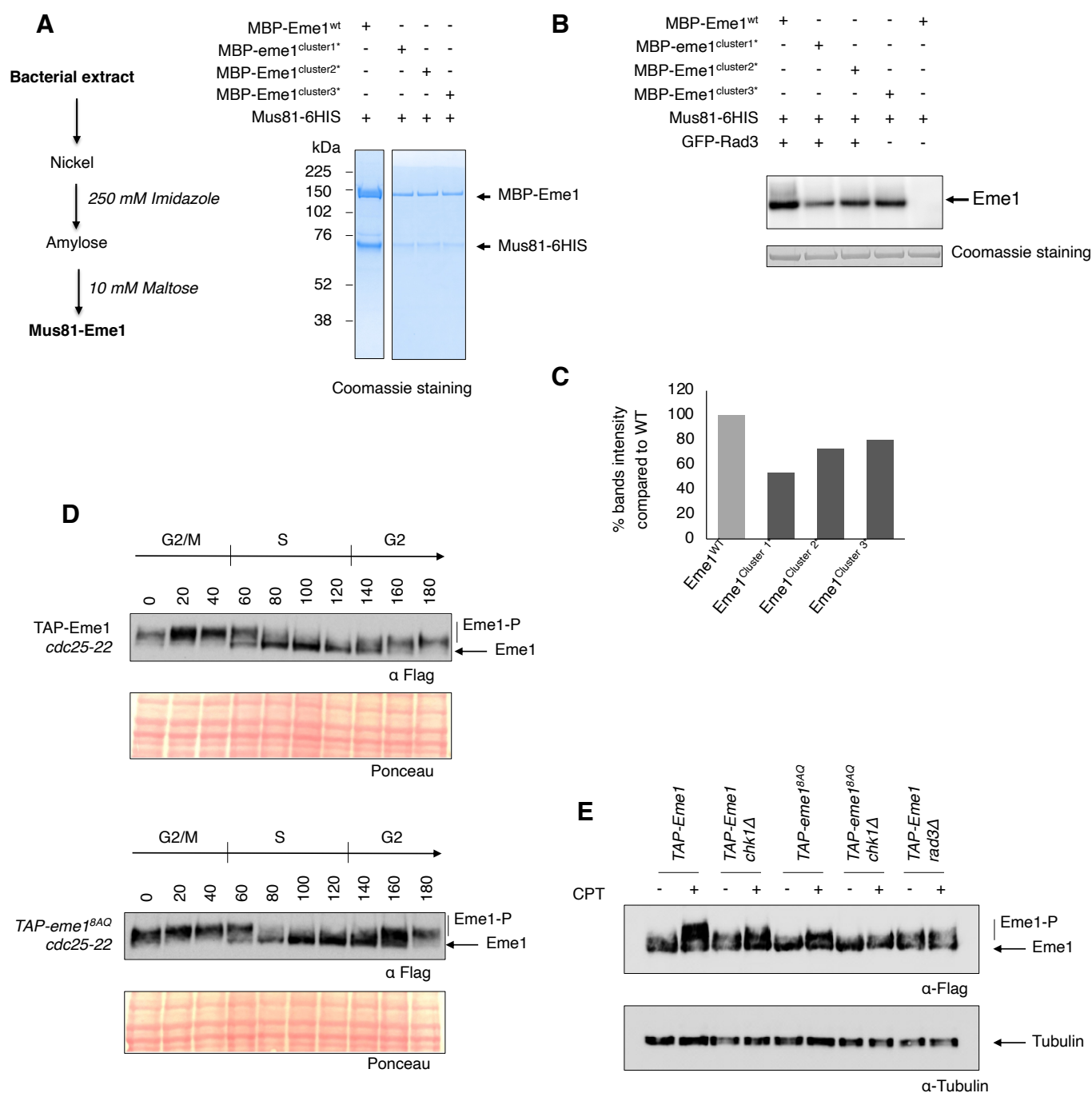
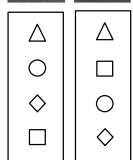
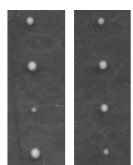


Figure 3

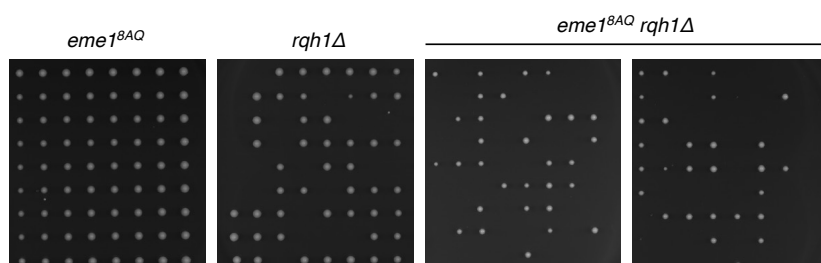
A

eme1^{8AQ} x *rqh1Δ*



- wild-type
- △ *rqh1Δ*
- *eme1^{8AQ}*
- ◇ *eme1^{8AQ} rqh1Δ*

B



C

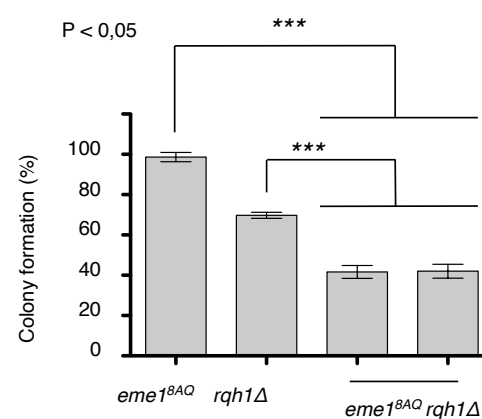


Figure 4

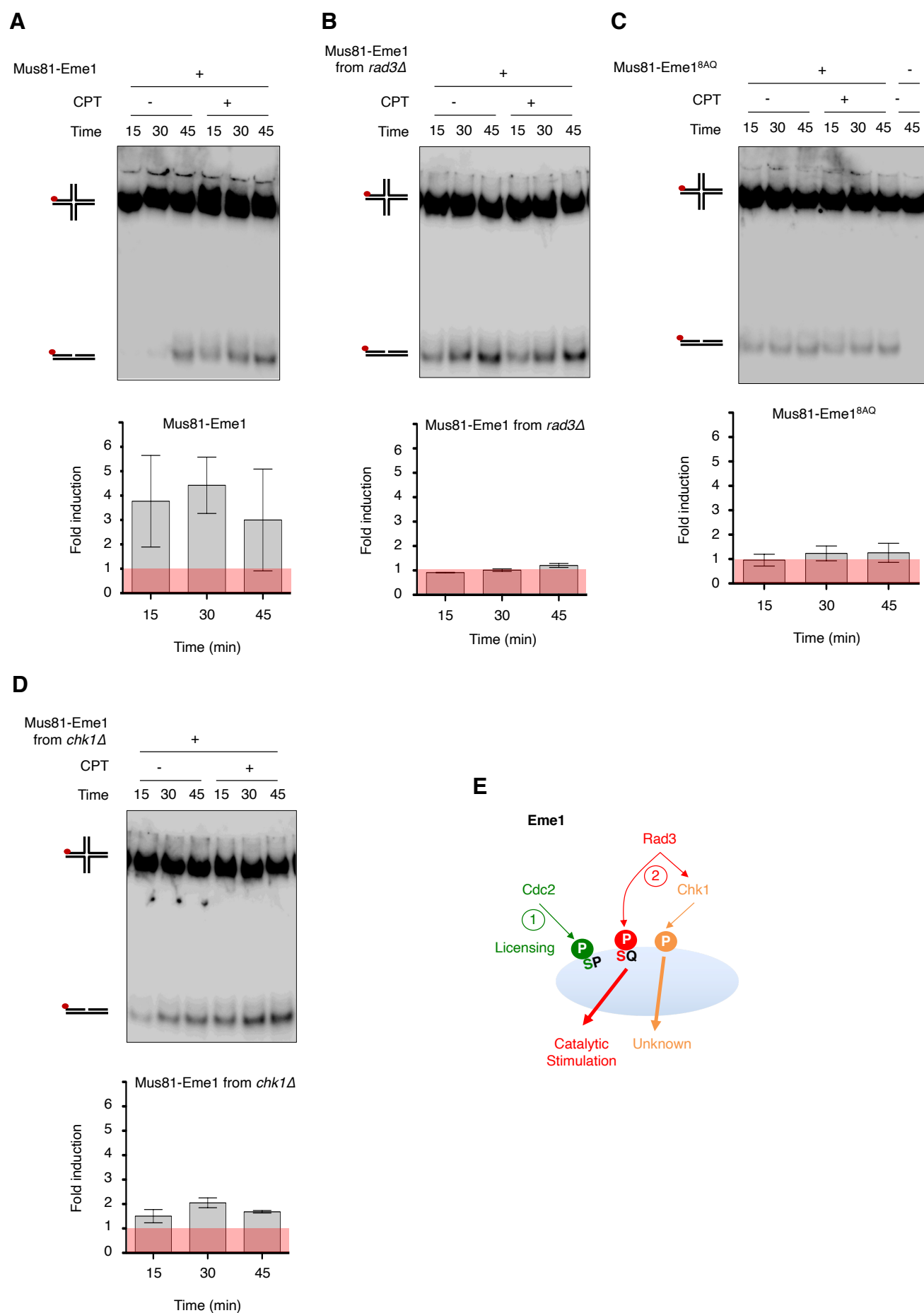


Figure 5

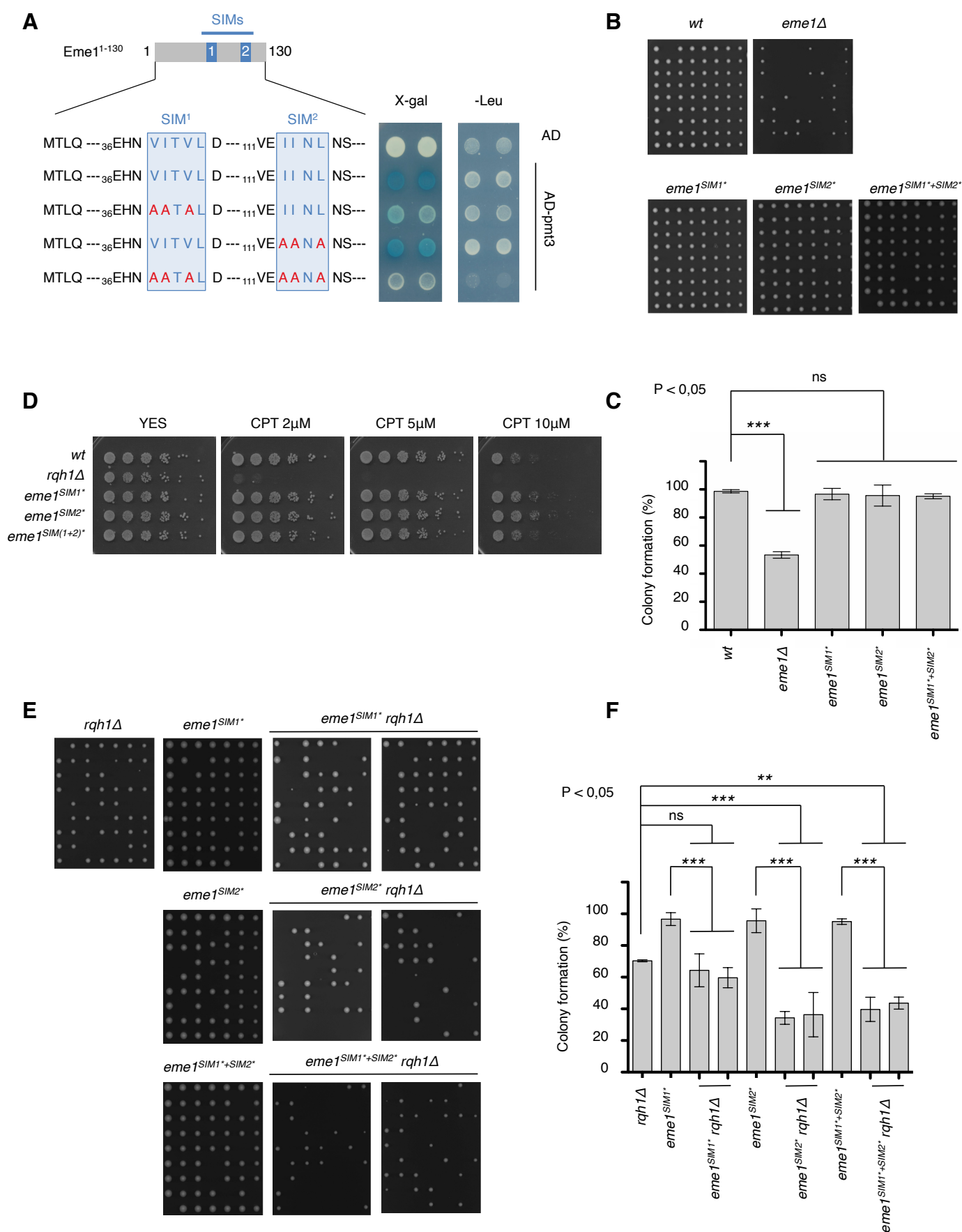


Figure 6

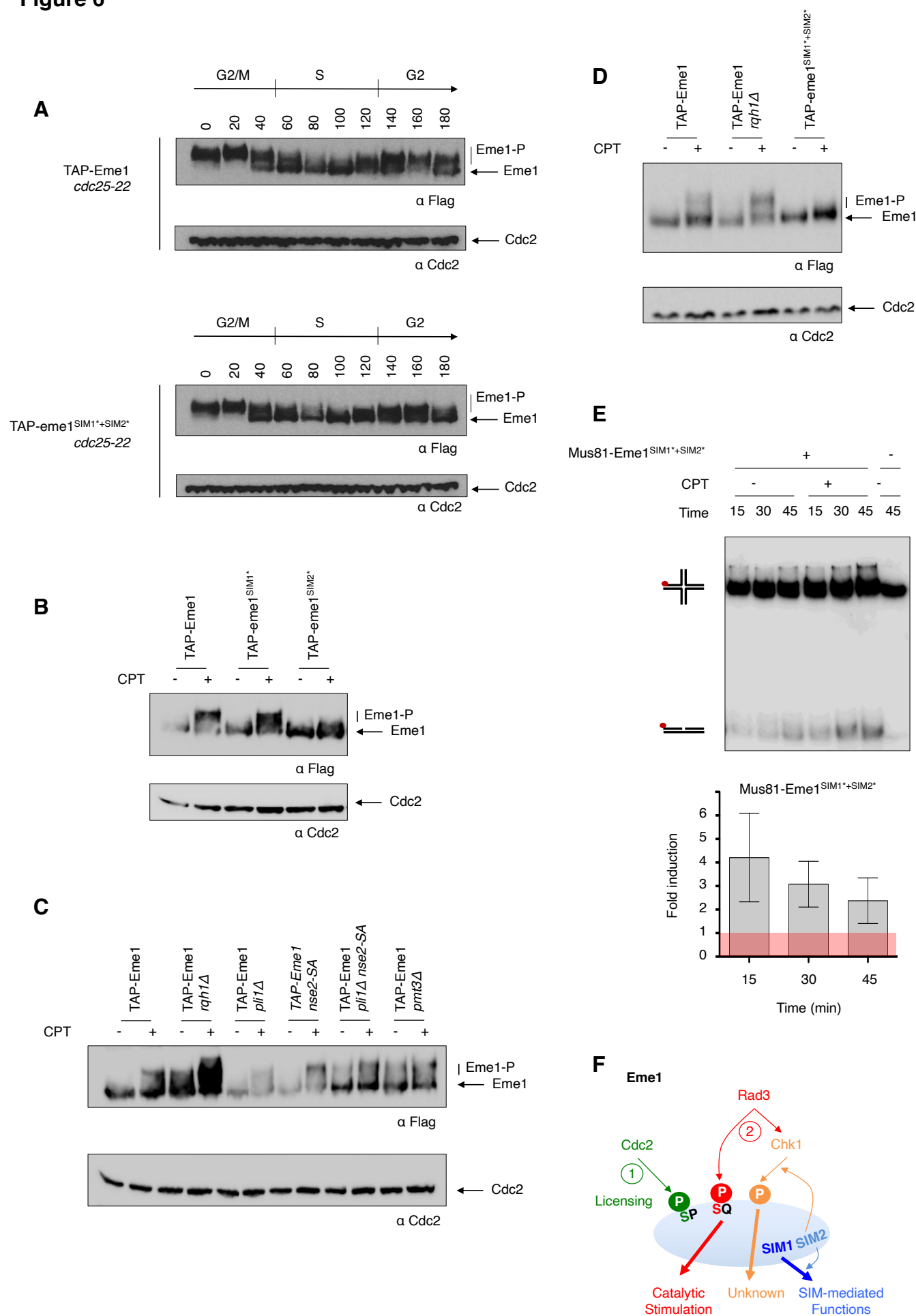


Figure 7

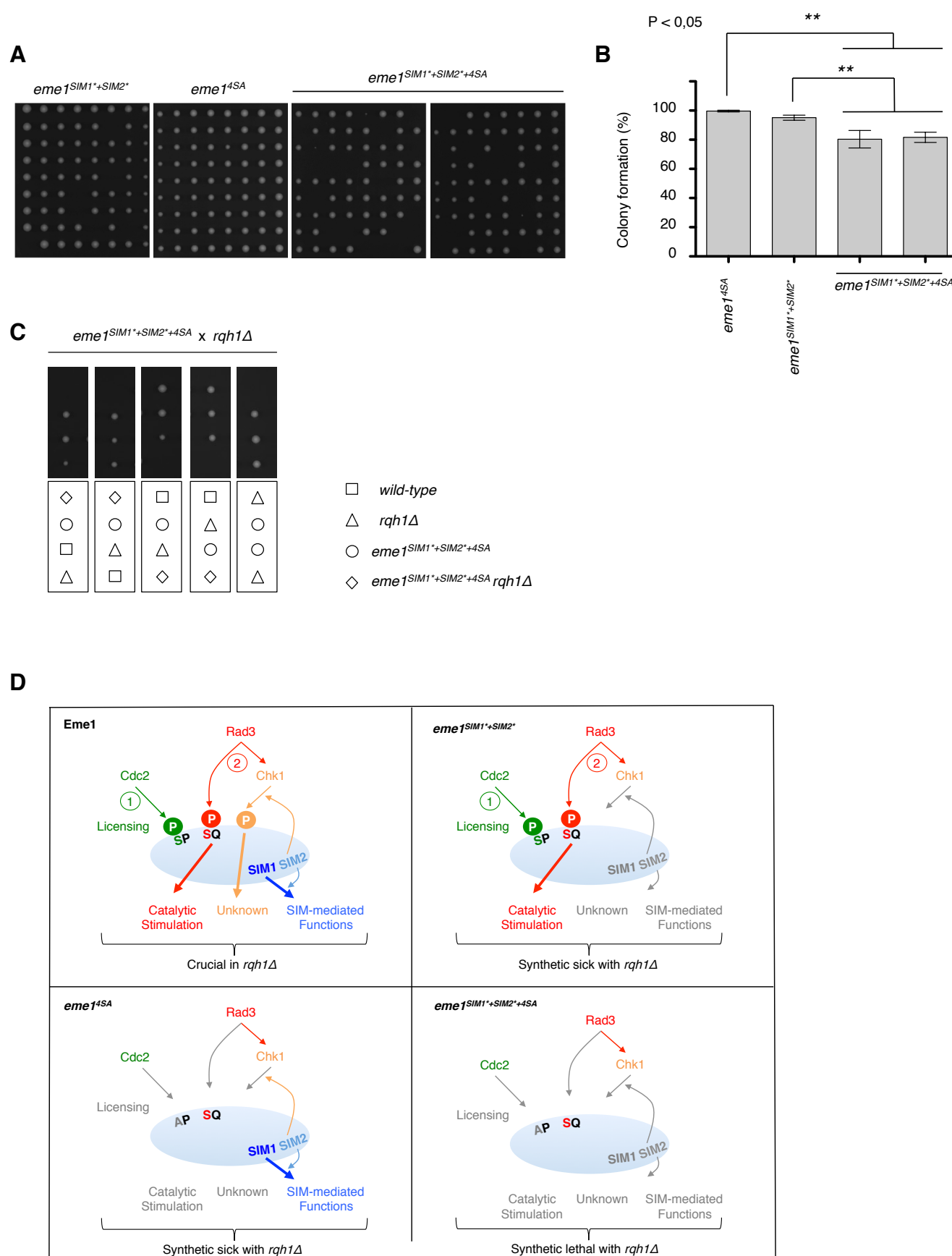


Figure S1

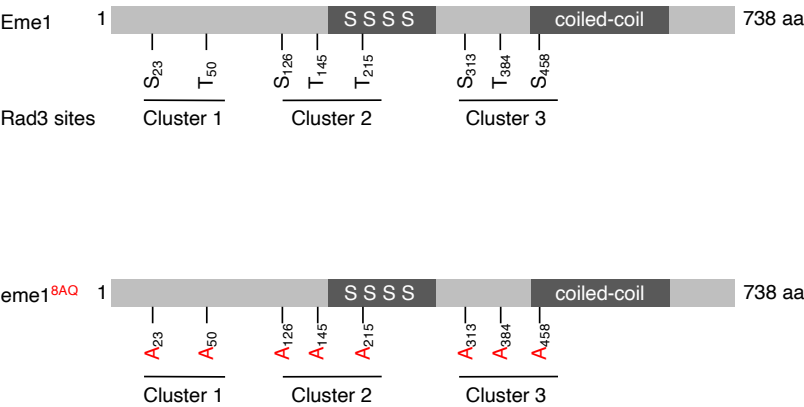


Figure S2

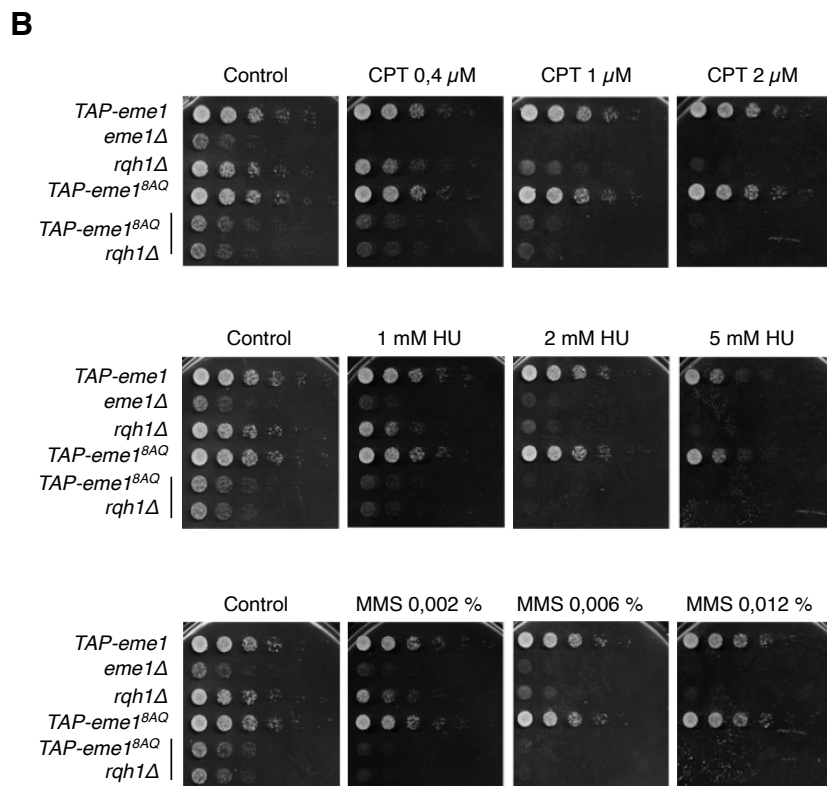
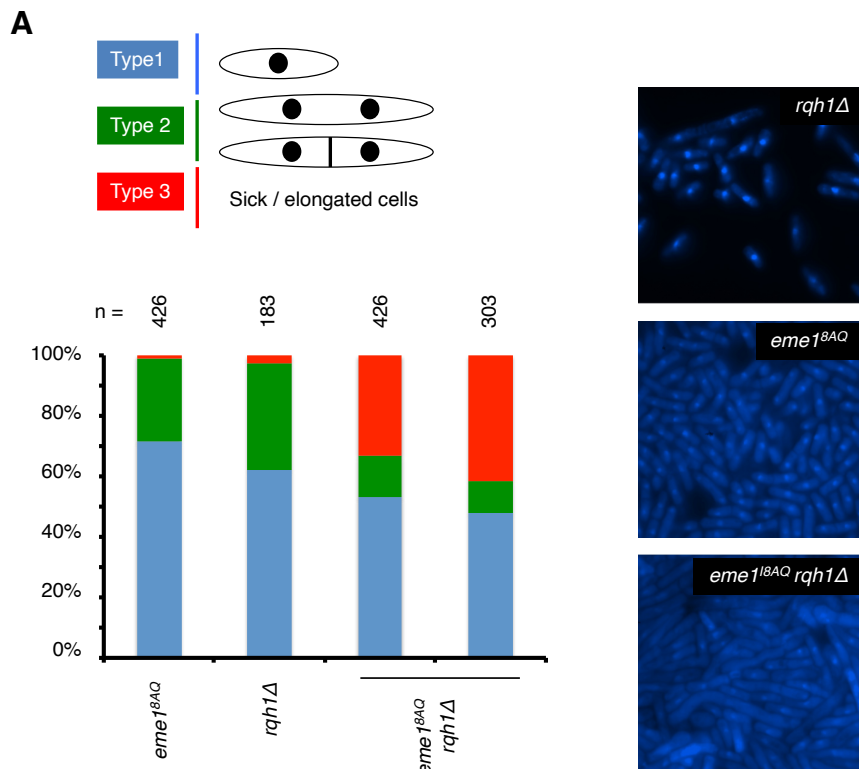
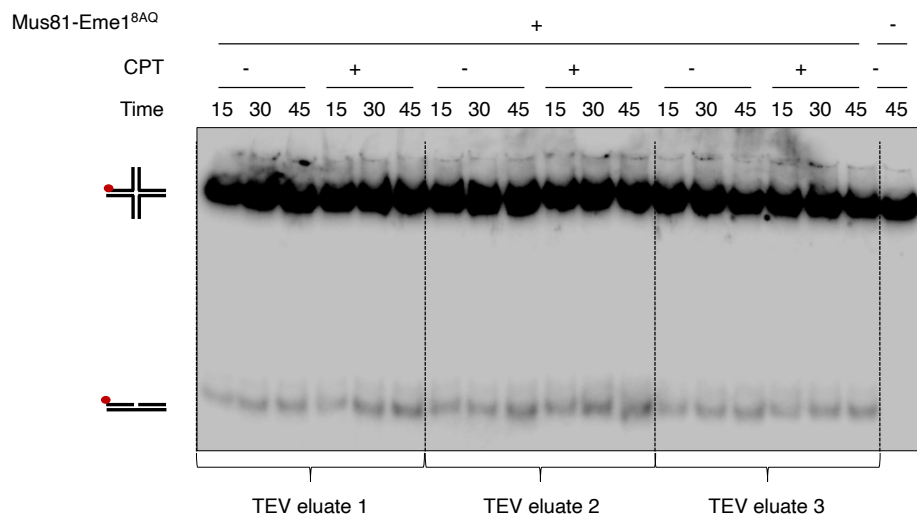


Figure S3

C



D

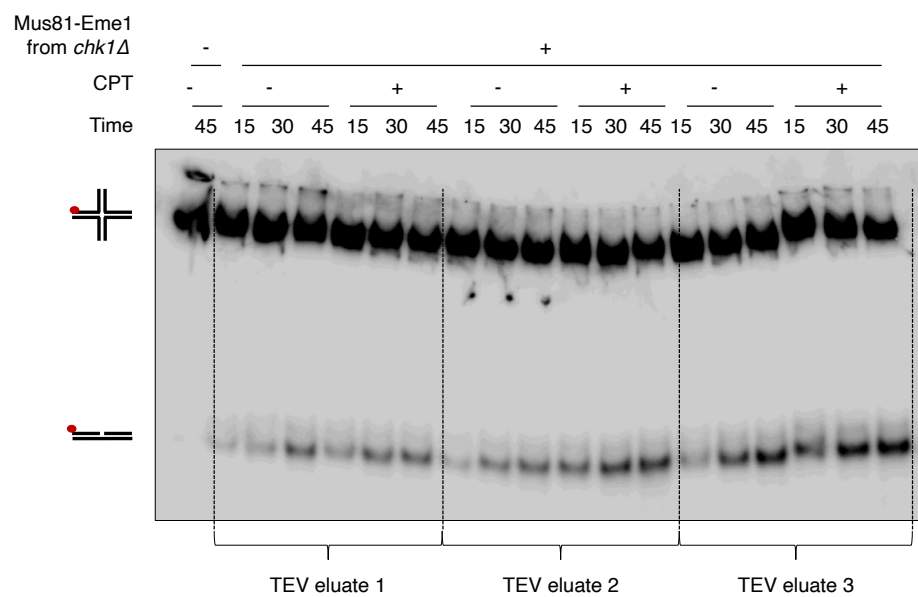


Figure S4

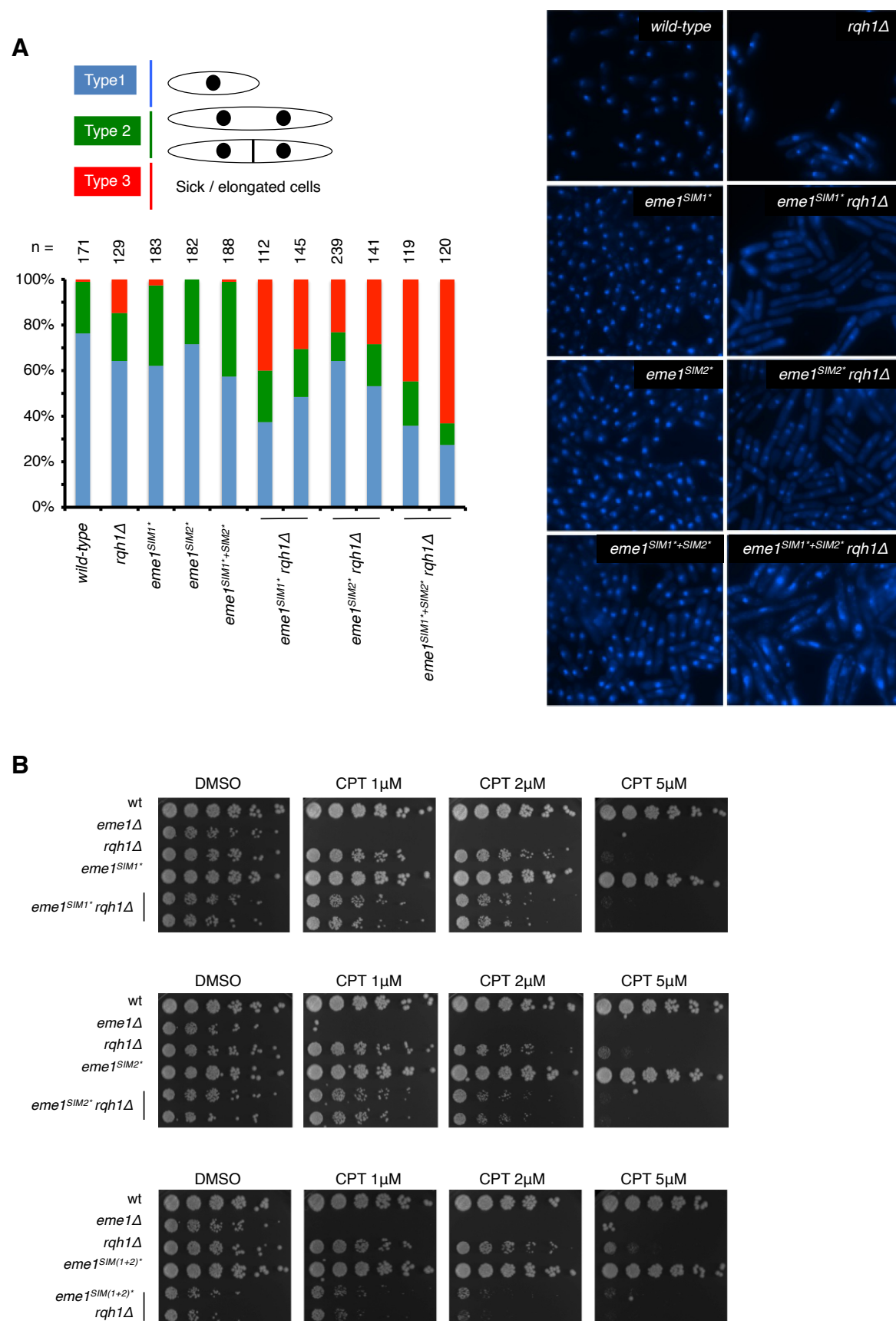
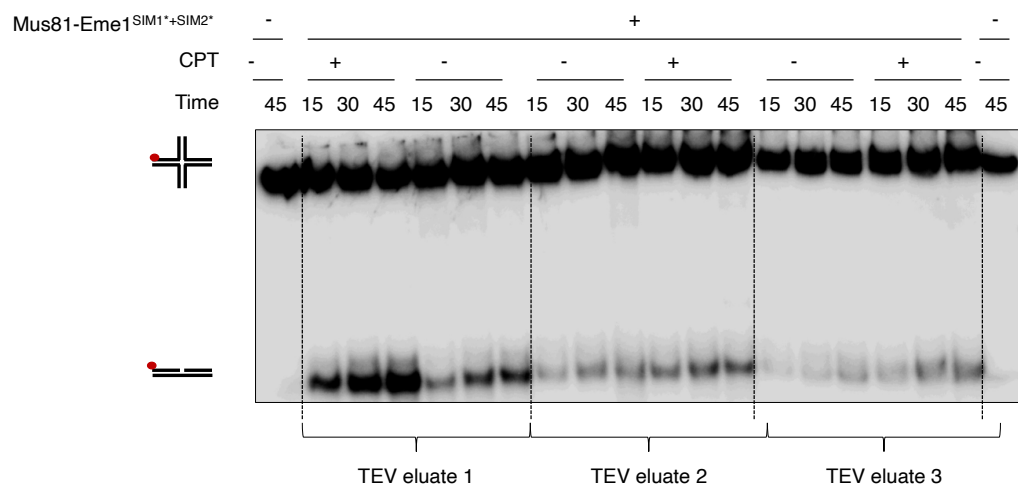


Figure S5



RESULTAT 2

NON PUBLIE

II. LES NIVEAUX INTRACELLULAIRES DE MUS81-EME1 SONT REGULES PAR LE COMPLEXE E3 UBIQUITINE LIGASE APC/C

La quantité d'Eme1 est strictement contrôlée au cours du cycle cellulaire

Il a été montré au laboratoire que la sous-unité Eme1 est phosphorylée par la kinase Cdc2^{CDK1} lors des phases G2 et M (Dehé et al. 2013). Nous avons synchronisé une population de cellules en G2 et analysé par Western blot le profil de migration d'une version étiquetée d'Eme1 (TAP-2xFLAG- Eme1) à différents stades du cycle cellulaire (Fig. 1A,B). Nous confirmons la présence de formes phosphorylée d'Eme1, caractérisées par un retard de migration sur gel, lors de l'arrêt des cellules en phase G2 ainsi qu'en mitose après relâche dans le cycle (Fig. 1A,B). De manière remarquable, nous observons en sortie de mitose une corrélation entre la diminution de la proportion relative des formes phosphorylées d'Eme1 (Fig. 1A,B) et une baisse de la quantité totale d'Eme1 (Fig. 1A,B). Ces observations suggéraient l'existence possible d'un mécanisme de dégradation d'Eme1 en sortie de mitose qui ciblerait préférentiellement les formes phosphorylées.

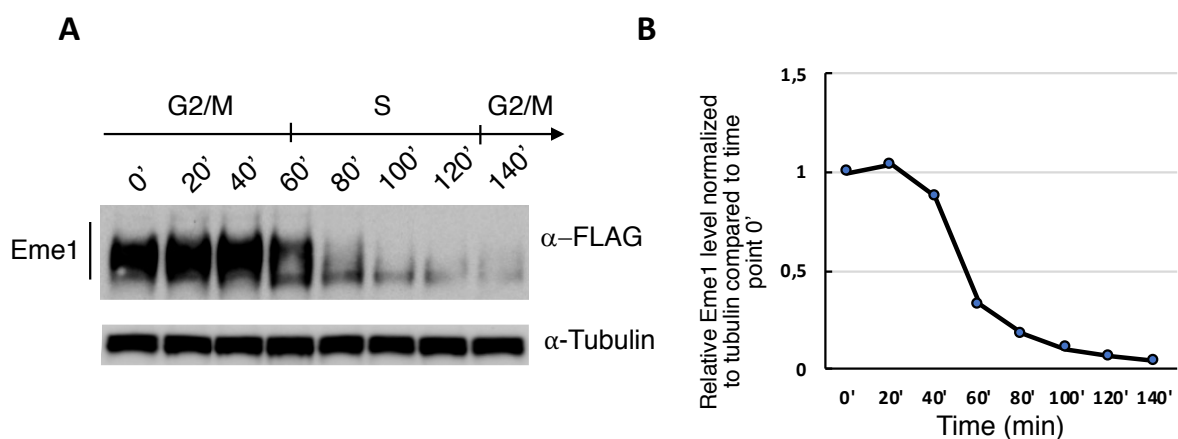


Figure 1. La quantité d'Eme1 varie au cours du cycle cellulaire. (A) La phosphorylation et la quantité d'Eme1 sont analysées par Western blot sur une population synchronisée de cellules mutantes *cdc25-22* contenant un allèle thermosensible de la phosphatase *cdc25* (*cdc25-22*) et produisant une version étiquetée d'Eme1 (TAP-2xFLAG). **(B)** Quantité relative d'Eme1 estimée au cours du cycle cellulaire. Les intensités du signal Eme1 sur le WB (Panel de gauche) sont rapportées à celles de la tubuline (utilisée comme contrôle interne de charge) au cours d'une cinétique. Tous les rapports (Signal Eme1/tubuline) sont normalisés à celui du temps 0 minute.

Eme1 est une cible du protéasome

Le protéasome est un complexe enzymatique multifactoriel impliqué dans la dégradation des protéines. Afin de déterminer si les niveaux de Mus81-Eme1 sont régulés par le protéasome, nous avons utilisé une souche mutante (*mts3-1*) contenant une forme thermolabile de la sous-unité Mts3 du protéasome, nous permettant d'inhiber de manière conditionnelle la dégradation protéasome-dépendante des protéines. A partir d'extraits protéiques, nous avons observé une augmentation de la quantité d'Eme1 dans la souche *mts3-1* incubée à la température restrictive de 36°C (Fig. 2A) ainsi qu'un retard de migration sur gel prononcé (Fig. 2A). Ce dernier étant aboli par un traitement des échantillons avec de la lambda phosphatase nous pouvons conclure que l'inhibition du protéasome entraîne une accumulation d'Eme1 phosphorylée et que cette forme modifiée pourrait représenter une cible préférentielle du protéasome (Fig. 2B).

Les protéines sont ciblées pour dégradation par le protéasome par ubiquitylation ([Glickman and Ciechanover, 2002](#)). L'ubiquitylation des protéines implique la formation d'une liaison covalente entre l'ubiquitine et la protéine cible. Ainsi, pour tester si Eme1 est ubiquitylée nous avons induit de manière ectopique la production d'une forme de l'ubiquitine comportant une étiquette 6-histidines (6-His) dans des cellules *mts3-1* afin de pouvoir retenir spécifiquement en conditions dénaturantes les protéines ubiquitylées sur une résine de nickel (Ni^{2+}). En effet, la chélation du Ni^{2+} par les histidines de l'étiquette 6His est suffisamment stable pour résister à une lyse dénaturante (en présence d'urée) des cellules. Cela permet de ne retenir que les protéines liées de manière covalente à la 6-His-Ub au détriment des protéines associées de manière non-covalente à une protéine ubiquitylée. La détection d'une protéine donnée par Western Blot parmi les protéines retenues en conditions dénaturantes sur la résine de Ni^{2+} permet de conclure que cette dernière est ubiquitylée. Comme indiqué en Figure 2C, un signal anti-Flag est détectable parmi les protéines retenues sur la résine Ni^{2+} , indiquant ainsi que la protéine TAP-Eme1 est ubiquitylée dans les cellules *mts3-1 TAP-eme1* cultivées à température restrictive.

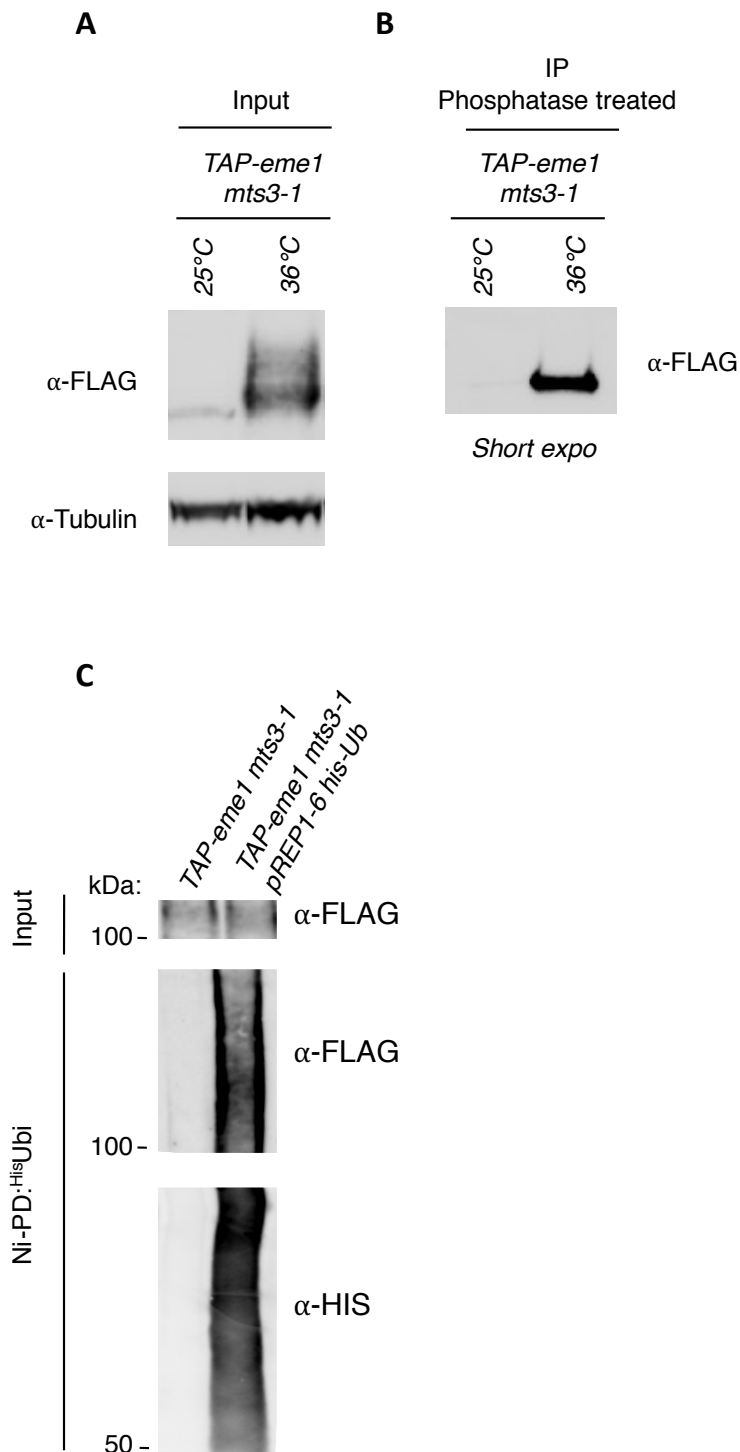


Figure 2 : Eme1 est une cible du protéasome. (A) Western blot sur des lysats de cellules asynchrones incubées pendant 6 heures à 25 ou 36°C produisant Eme1 étiquetée TAP-2xFLAG et exprimant un allèle thermosensible soit pour une sous-unité du protéasome (*mts3-1*). **(B)** Western blot sur immunoprécipitat d'Eme1 provenant de cellules *mts3-1*. Les éluats ont été traités avec la lambda phosphatase. **(C)** Rétention des protéines en conditions dénaturantes (en urée) à partir de cellules transformées avec un plasmide vide ou avec un plasmide qui permet la surexpression d'une version étiquetée 6-His de l'ubiquitine à température restrictive. Note : le traitement phosphatase est réalisé sur un immunoprécipitat dû à une efficacité amoindrie du traitement phosphatase sur un lysat total.

La stabilité d'Eme1 repose sur le complexe E3 ligase APC/C

L'ubiquitylation d'Eme1 nous a amené à rechercher par quelle ligase elle est ubiquitylée et ciblée pour dégradation par le protéasome. Un complexe conservé E3 ubiquitine ligase orchestre la progression en mitose, il s'agit du complexe de promotion de l'anaphase ou cyclosome (APC/C), or la dégradation d'Eme1 coïncide temporellement avec l'activité d'APC/C, en sortie de mitose. Cette coïncidence nous a amenés à rechercher une éventuelle participation du complexe APC/C dans la dégradation d'Eme1 en étudiant les niveaux d'Eme1 dans des mutants thermosensibles de l'APC/C (*cut9-665*). De manière comparable à ce que nous avons observé dans le mutant thermosensible *mts3-1* du protéasome, l'inactivation de l'APC/C à la température restrictive de 36°C s'accompagne à la fois d'une augmentation marquée de la quantité et d'un retard de migration d'Eme1 (Fig. 3A). Un traitement des échantillons à la lambda phosphatase avant électrophorèse en gel d'acrylamide contenant du SDS abolit là aussi le retard de migration, indiquant qu'une forme phosphorylée d'Eme1 s'accumule lorsque que le complexe APC/C est inactivé (Fig. 3B). Ces résultats suggèrent donc qu'Eme1 est bien un substrat du complexe APC/C et que ce dernier ciblerait préférentiellement des formes phosphorylées d'Eme1.

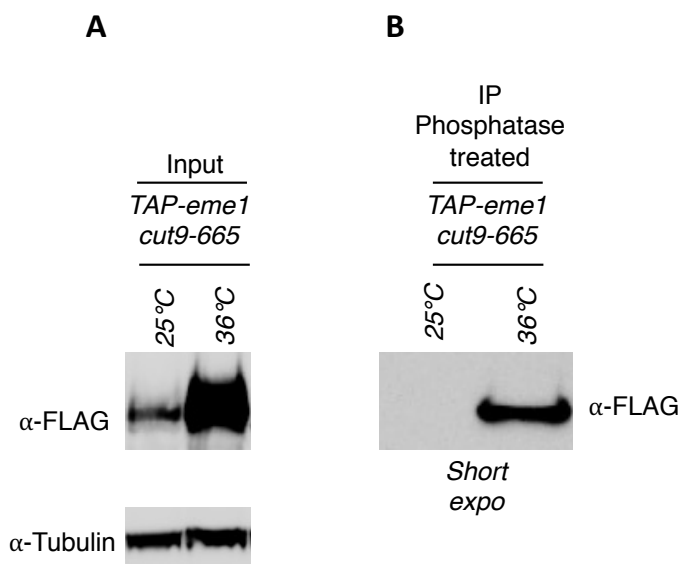


Figure 3 : Eme1 est une cible d'APC/C. (A) Western blot sur des lysats de cellules asynchrones incubées pendant 6 heures à 25 ou 36°C produisant Eme1 étiquetée TAP-2xFLAG et exprimant un allèle thermosensible soit pour une sous-unité du complexe APC/C (*cut9-665*). (B) Western blot sur immunoprécipitat d'Eme1 provenant de cellules *cut9-665*. Les éluats ont été traités avec la lambda phosphatase. Note : le traitement phosphatase est réalisé sur un immunoprécipitat dû à une efficacité amoindrie du traitement phosphatase sur un lysat total.

La délétion des motifs « dégrons » présents sur Eme1 contribue à sa stabilisation

Au cours de la mitose, la reconnaissance des substrats d'APC/C se fait par l'intermédiaire de co-adaptateurs d'APC/C : Cdc20 et Cdh1 (Ste9 chez *S. pombe*). Le complexe APC/C-Cdc20 a des fonctions dans les phases précoces de la mitose alors que le complexe APC/C-Cdh1 exerce les siennes dans les phases tardives de la mitose, jusqu'en G1. Le complexe APC/C-Cdh1 possède des poches de liaison capables de reconnaître des motifs particuliers appelés « dégrons » sur ses substrats. Trois motifs « dégrons » ont été décrits à ce jour : D-box (Destruction box), KEN-box et motif ABBA. Par des analyses *in silico* nous avons identifié au sein d'Eme1 la présence de ces trois motifs (Fig. 4A). Seul le motif D-box d'Eme1 (R⁷⁵XXL⁷⁸) répond exactement au consensus décrit dans la littérature (RXXL). La KEN-box diffère par la présence d'un acide aspartique (K²⁹DN³¹) en lieu et place d'un acide glutamique (KEN), néanmoins, des variations du consensus ont été décrites, sans pour autant altérer la fonctionnalité du motif. Enfin, le consensus du motif ABBA (Fx[ILV][FHY]x[DE]) d'Eme1 est caractérisé par l'absence d'un acide aminé chargé en position +6 où Eme1 présente un résidu thréonine (F¹³³XLFX¹³⁸). Or, des analyses de phosphoprotéomiques réalisées au laboratoire ont montré que ce résidu thréonine est phosphorylé, conservant ainsi la nature chargée de ce site. De manière intéressante, ce résidu phosphorylé (T¹³⁸P) correspond à un site consensus pour Cdc2^{CDK1} ([ST]P) (Fig. 4A).

Afin d'analyser la relevance de ces motifs sur la stabilité d'Eme1, nous avons d'abord étudié la stabilité de mutants d'Eme1 présentant des délétions incrémentales de la partie N-terminale. Pour ce faire, nous avons généré des souches produisant les protéines Eme1 dépourvues de leur 48 (eme1^{Δ48}), 117 (eme1^{Δ117}) ou 143 (eme1^{Δ143}) premiers acides aminés. La KEN-box seule est perdue dans le mutant eme1^{Δ48}, la KEN-box ainsi que la D-box sont perdues dans le mutant eme1^{Δ117} et les trois dégrons putatifs sont perdus dans le mutant eme1^{Δ143} (Fig 4A). Alors que la délétion des 48 premiers acides aminés n'a pas d'impact majeur sur la stabilité de la protéine, la délétion des 117 et 143 premiers acides aminés entraîne une stabilisation d'Eme1 (respectivement d'un facteur 5 et 7) (Fig. 4B,C). Ces données semblent indiquer que la KEN-box n'a pas de rôle déterminant dans la stabilité de la protéine. Au contraire, la D-box et le motif ABBA participent à la stabilité d'Eme1 avec un rôle prépondérant de la D-box. Cependant, nous ne pouvons pas exclure à ce stade un effet additif de la perte

simultanée de la KDN-box et de la D-box, et qu’une perte de la D-box seule n’ait pas un impact comparable à la perte de la KDN-box seule.

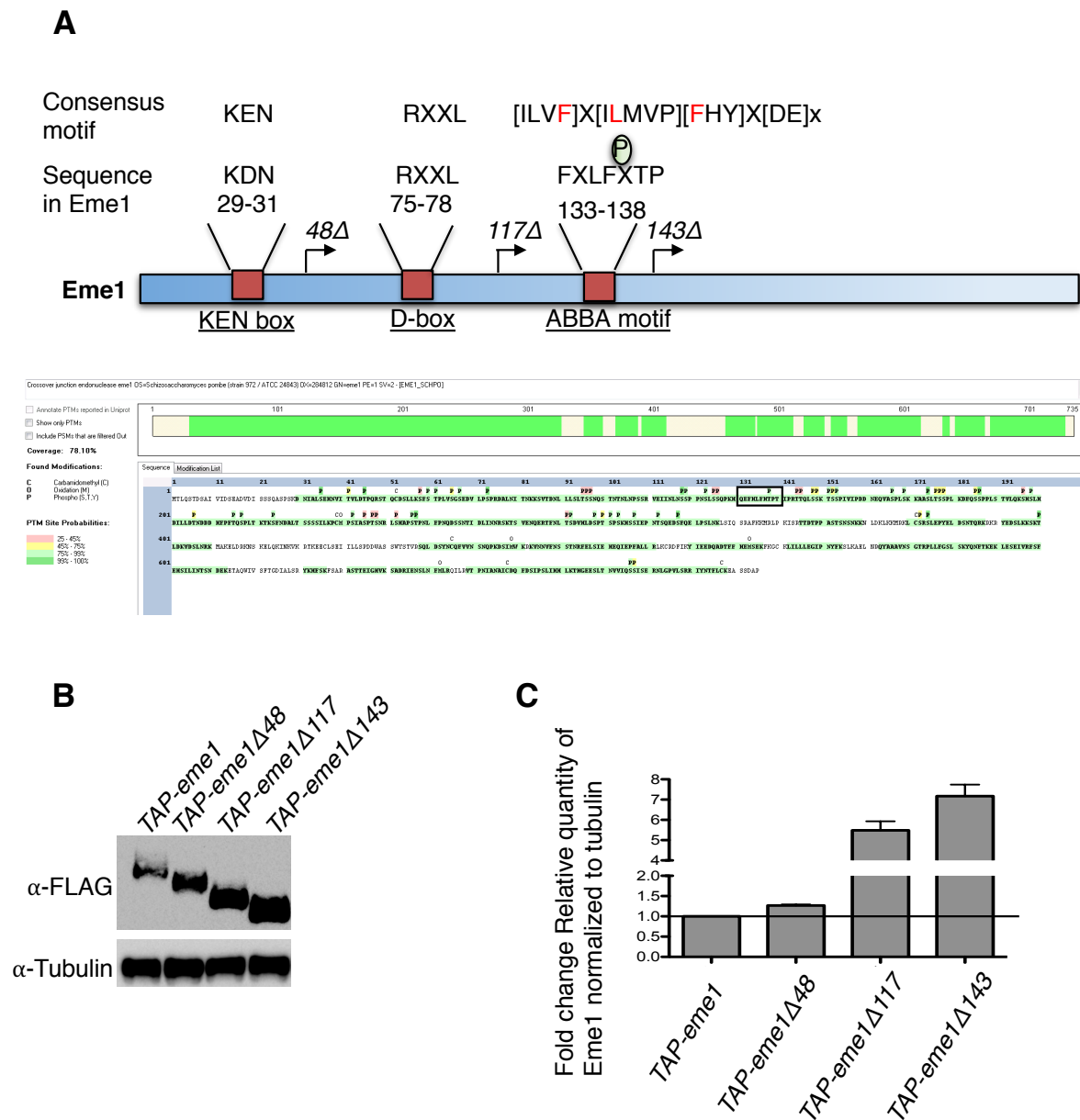


Figure 4 : Analyse de la stabilité de mutants d’Eme1 impactant les motifs dégrons. (A) Partie du haut : Schéma de la sous-unité Eme1. Les motifs dégrons sont représentés ainsi que leurs séquences et positions. Les sites d’initiation de la transcription dans les mutants de délétion d’eme1 sont indiqués par des flèches. Partie du bas : Analyse phosphoprotéomique en spectrométrie de masse de la sous-unité Eme1 à partir de cellules asynchrones, révélant que la T138 est phosphorylée (encadré noir). **(B)** Les niveaux de protéines d’Eme1 étiquetées TAP-2xFLAG sont analysés par Western blot sur des extraits protéiques réalisés à partir des mutants de délétions, schématisés dans la figure 5A. **(C)** Analyse du rapport de la quantité totale de TAP-2xFLAG -Eme1 et des mutants de délétions normalisé sur la tubuline.

La mutation des résidus de la D-box d'Eme1 impacte sa stabilité

Puisque la délétion de la D-box au sein d'Eme1 semble avoir l'impact le plus proéminent, nous avons décidé dans un premier temps d'étudier de manière plus précise sa contribution dans la stabilité de la protéine. Ainsi, nous avons muté les résidus conservés de ce motif (A⁷⁵XXA⁷⁸) dans la protéine endogène que nous appellerons Eme1^{R75A/L78A}.

A partir de cellules asynchrones, nous avons analysé la quantité d'Eme1 provenant de cellules sauvages ou de cellules exprimant une version mutée de la D-box d'Eme1. La mutation de la D-box amène à la stabilisation d'Eme1. Nous avons également noté que la protéine Eme1 mutée au niveau des résidus de la D-box semble présenter un retard sur gel plus important comparé à la protéine sauvage (Fig. 5A).

Comme nous l'avons montré dans la figure 1, la phosphorylation d'Eme1 est scrupuleusement contrôlée au cours du cycle cellulaire. Ainsi, nous avons introduit l'allèle thermosensible *cdc25-22* dans des cellules exprimant *eme1*^{R75A/L78A} afin d'étudier l'impact de la mutation de la D-box sur la stabilité et la phosphorylation d'Eme1 au cours du cycle cellulaire (Fig. 5B,C). Alors que pour la forme sauvage d'Eme1 nous retrouvons la même fluctuation dans la quantité de protéine au cours du cycle cellulaire, la mutation de la D-box entraîne une stabilisation d'Eme1 tout au long du cycle cellulaire avec un effet plus marqué en phase S (Fig. 5B,C). De plus, il apparaît qu'Eme1^{R75A/L78A} présente un retard de migration sur gel plus marqué que le sauvage dès l'entrée en phase S, qui persiste jusqu'en début de phase G2 (Fig. 5B). Ainsi, une mutation des résidus de la D-box d'Eme1 semble affecter la stabilité globale d'Eme1 au cours du cycle cellulaire ainsi que la persistance de la forme phosphorylée.

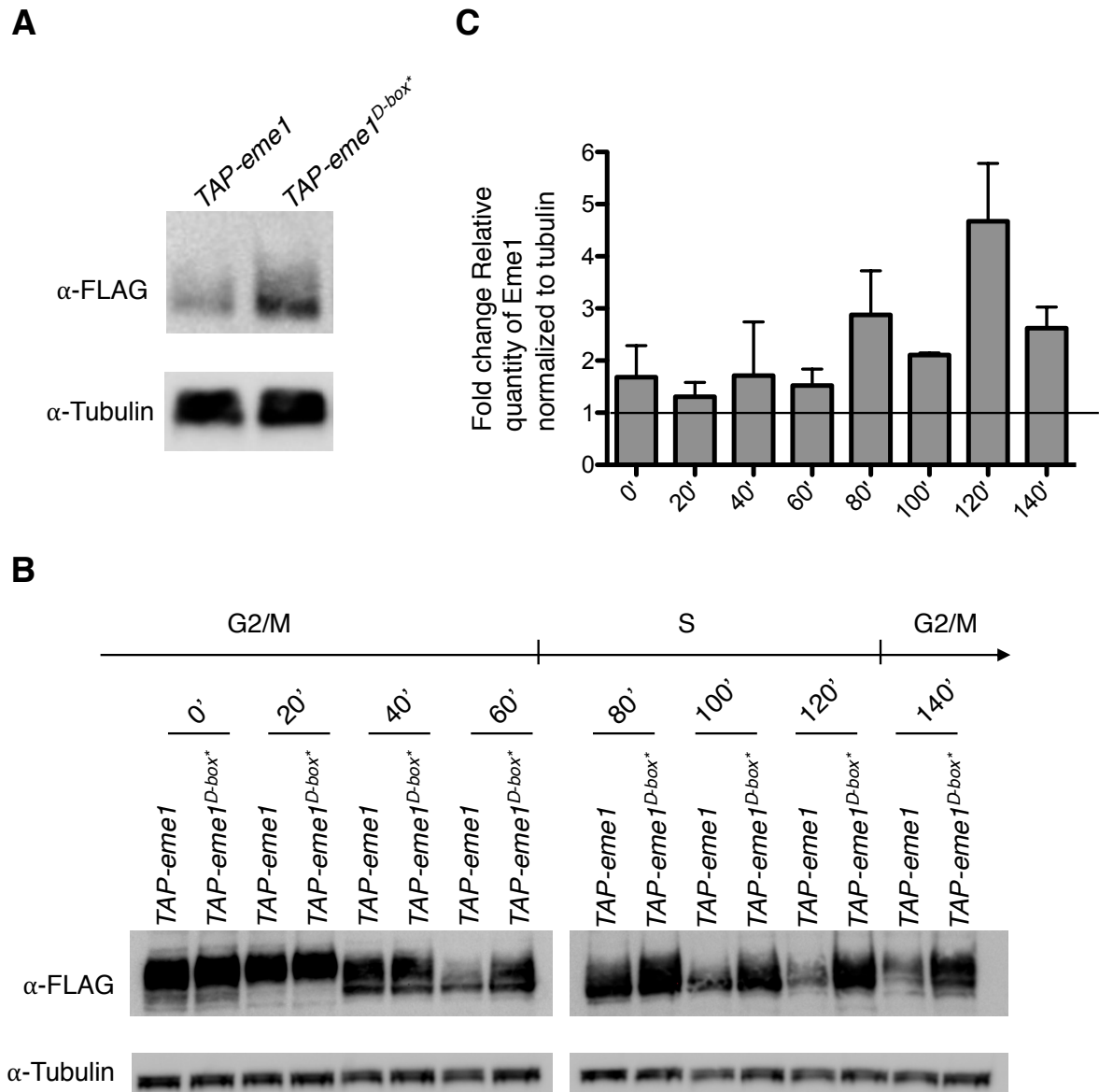


Figure 5 : La mutation de la D-box stabilise la forme phosphorylée d'Eme1 en sortie de mitose. (A)

Western blots réalisés sur des extraits protéiques totaux de cellules asynchrones produisant ou Eme1 étiquetées TAP-2xFLAG sauvage ou Eme1^{D-box*} (Eme1^{R75A/L78A}).

(B) Western blot réalisés sur des extraits protéiques totaux de cellules *cdc25-22* synchronisées à la transition G2/M produisant soit une version sauvage étiquetée TAP-2xFLAG soit TAP-2xFLAG-Eme1^{D-box*}

(C) Analyse du rapport de la quantité totale de TAP-2xFLAG -Eme1 et de TAP-2xFLAG-Eme1^{D-box*} normalisé sur la tubuline.

La mutation des résidus du motif D-box d'Eme1 affecte la stabilité du génome en absence de Rqh1^{BLM}

Nous nous sommes demandé dans un premier temps si l'impact des mutations des résidus de la D-box d'Eme1 affectait la fonction de Mus81-Eme1 dans la réponse générale aux agents génotoxiques et en particulier à la CPT. Des dilutions sériées de cultures de cellules exprimant l'allèle sauvage d'*eme1* ou l'allèle *eme1*^{R75A/L78A} ont été déposées sur des milieux contenant des concentrations croissantes de CPT (Fig. 6A). Aucune des concentrations testées n'affectent la viabilité des cellules exprimant *eme1*^{R75A/L78A} comparée à celle du sauvage. Globalement, un défaut de dégradation d'Eme1 médié par des mutations de sa D-box n'affecte pas la viabilité des cellules en réponse à la CPT.

Au cours de mes travaux présentés dans la partie 1 des résultats, nous avons disséqué les mécanismes de régulations essentiels aux fonctions vitales que remplit la SSE Mus81-Eme1 en absence de Rqh1^{BLM}. Dans le but de savoir si la D-box a une quelconque fonction en absence de Rqh1^{BLM}, nous avons généré des souches *eme1*^{R75A/L78A} *rqh1*Δ. Les doubles mutants *eme1*^{R75A/L78A} *rqh1*Δ sont viables et ne présentent pas de perte de viabilité en comparaison aux souches parentales en absence de stress exogène (Fig. 6A DMSO). En revanche, les doubles mutants *eme1*^{R75A/L78A} *rqh1*Δ souffrent d'une hypersensibilité nettement plus marquée à la CPT que les simples mutants (Fig. 6A). Ces résultats suggèrent que le contrôle de la quantité protéique d'Eme1 et de ses formes modifiées est important en absence de Rqh1^{BLM} en réponse à la CPT.

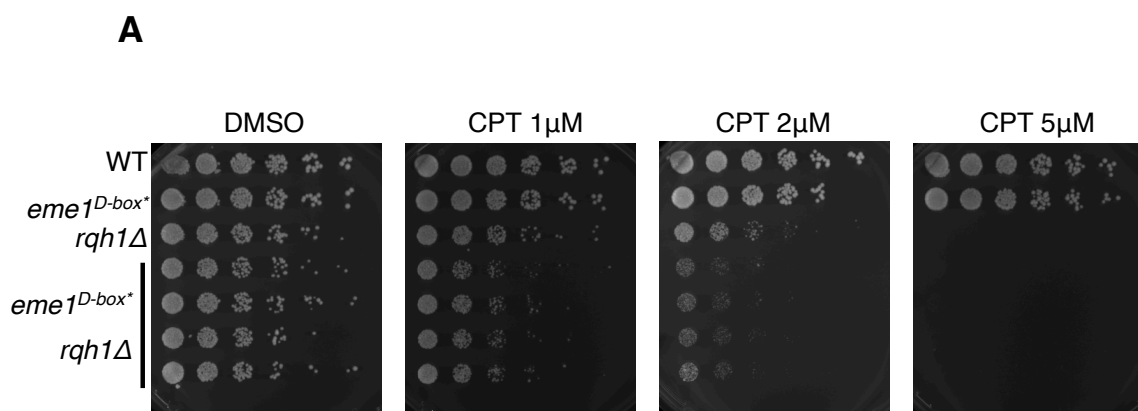


Figure 6 : La D-box d'Eme1 est requise pour la survie des cellules en absence de Rqh1^{BLM} après un traitement CPT (A) Dilutions sériées des souches indiquées et déposées sur des boîtes contenant des concentrations croissantes de CPT.

La phosphorylation Cdc2 dépendante d'Eme1 est exclusivement requise pour la dégradation d'Eme1 médiée par le protéasome

En accord avec nos données où l'inhibition du protéasome ainsi que la mutation de la D-box d'Eme1 entraînaient la persistance d'une forme phosphorylée, nous avons émis l'hypothèse que la dégradation d'Eme1 est initiée par sa phosphorylation *via* Cdc2 (Fig. 7A). Confirmant cette hypothèse, nous avons observé une stabilisation importante de la protéine mutante Eme1^{4SA} dont les 4 sites consensus de phosphorylation par Cdc2 ont été mutés (Fig. 7B). De manière intéressante, nous avons précédemment observé qu'une délétion des 143 premiers acides aminés ou la présence d'une D-box mutée entraînent une stabilisation d'Eme1, bien que n'affectant pas l'intégrité des 4 sites de phosphorylation par Cdc2. Ainsi, nous avons cherché à comprendre s'il existait un lien fonctionnel entre la phosphorylation d'Eme1 par Cdc2 et la reconnaissance des motifs dégrons par APC/C. Notre hypothèse est que la phosphorylation d'Eme1 par Cdc2 agit comme un pré-requis pour la reconnaissance de la D-box d'Eme1 par le complexe APC/C. Cette reconnaissance spécifique de la forme phosphorylée permettrait d'éviter la persistance en phase S d'une forme activée/activable de Mus81-Eme1. En accord avec cette hypothèse, la protéine Eme1^{4SA} n'est pas stabilisée dans un contexte *mts3-1* en condition de température restrictive (Fig. 7C). L'ensemble de ces éléments nous amène à proposer que la phosphorylation d'Eme1 par Cdc2 se situe en amont de la reconnaissance des motifs dégrons par APC/C et de son adressage au protéasome. Nous sommes en train de réaliser des expériences permettant de consolider notre modèle (voir la discussion pour davantage d'informations) (Fig. 7D).

Dans l'ensemble, ces travaux sont les prémices de nouveaux mécanismes de contrôles de la quantité intracellulaire d'Eme1, reposant à la fois sur un contrôle APC/C dépendant et Cdc2-dépendant.

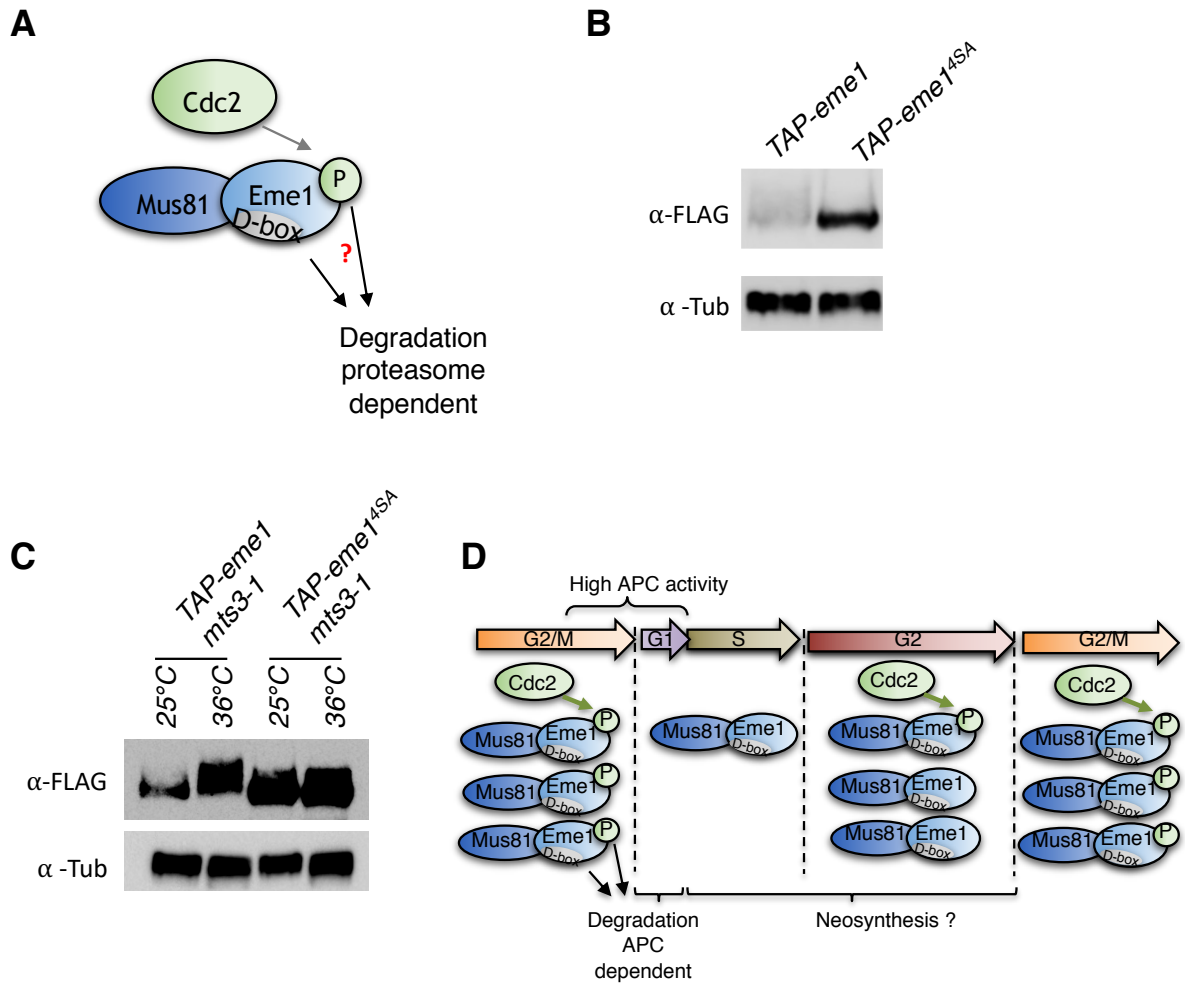


Figure 7 : La phosphorylation Cdc2 dépendante d'Eme1 est requise pour sa dégradation. (A) Schéma illustrant l'hypothèse de travail. **(B)** Western blots réalisés sur des extraits protéiques totaux de cellules asynchrones produisant soit Eme1 étiquetées TAP-2xFLAG sauvage soit une version d'Eme1 où 4 sites de phosphorylation par Cdc2 ont été mutés en Alanine (Eme1^{4SA}). **(C)** Western blot sur des extraits protéiques totaux à partir de cellules asynchrones *mts3-1* incubées pendant 6 heures à 25 ou 36°C et produisant Eme1 sauvage ou Eme1^{4SA} étiquetée TAP-2xFLAG. **(D)** Modèle de travail, explicité dans la section discussion.

CONCLUSION ET DISCUSSION

I. CONCLUSION

Notre ADN est continuellement soumis à des dommages provenant de sources exogènes comme endogènes. Ces dommages contribuent à l'instabilité du génome, à la racine même de la tumorigenèse. Au cours de l'évolution, de multiples voies de réparations qui permettent de palier aux effets délétères de ces dommages ont été sélectionnées. Une pléthore de protéines est impliquée dans ces voies de réparation de l'ADN. Nos travaux se sont concentrés sur une classe particulière d'enzyme, les endonucléases à spécificité de structure (SSE).

Les SSE sont capables d'inciser des structures secondaires d'ADN générées au cours des mécanismes de réplication, réparation et/ou recombinaison de l'ADN. Elles sont des pivots du maintien de la stabilité du génome et de nombreuses pathologies résultent de mutations dans les gènes codant les composants de ces enzymes. Leurs actions doivent être contrôlées spatialement et temporellement afin d'assurer une prise en charge efficace des bons substrats et de prévenir toute intervention opportuniste sur d'autres structures secondaires d'ADN.

Mon travail de thèse a consisté en l'étude des mécanismes impliqués dans le contrôle de l'endonucléase à spécificité de structure Mus81-Eme1 dans la levure fissipare (Fig.8).

J'ai pu mettre en évidence que la phosphorylation directe de la sous-unité Eme1 par la kinase Rad3^{ATR} est essentielle à la stimulation de l'activité catalytique de Mus81-Eme1. J'ai de plus identifié deux domaines d'interaction avec SUMO au sein d'Eme1 et démontré leur importance pour la survie des cellules en absence de l'hélicase Rqh1^{BLM}. Mes travaux montrent que les mécanismes de contrôle de Mus81-Eme1 sont bien plus élaborés et complexes qu'initialement décrit allant au-delà du simple contrôle de l'activité catalytique.

De plus, j'ai montré que la sous-unité Eme1 était dégradée en sortie de mitose, dans un processus protéolytique dépendant du complexe ubiquitine ligase APC/C et de l'adressage au protéasome. De manière remarquable, il semblerait que ce soit la forme phosphorylée d'Eme1 qui soit principalement ciblée pour dégradation.

L'ensemble de mes travaux a ainsi mis en lumière la collaboration de modifications post-traductionnelles d'Eme1 dans le contrôle de l'activité et de la stabilité du complexe Mus81-Eme1. L'absence de ces mécanismes de contrôle impacte la viabilité des cellules dépourvues de l'activité hélicase Rqh1^{BLM}, orthologue de l'hélicase humaine BLM, mutée chez les patients atteints du syndrome de Bloom.

Un nombre croissant de travaux suggère que l'endonucléase Mus81-Eme1 possède un rôle dans la survie de certains types de cellules cancéreuses. Par exemple, Mus81-Eme1 est requise pour la survie de cellules cancéreuses BRCA2 déficientes (Lai et al., 2017). *A contrario*, Mus81-Eme1 est responsable de la fragmentation des chromosomes dans les cellules n'exprimant pas WRN (Wietmarschen et al., 2020). Cette dichotomie souligne la nécessité de mieux comprendre les mécanismes moléculaires du contrôle de l'endonucléase Mus81-Eme1 et leur importance en termes de stabilité du génome et, par extrapolation, de prévention de pathologies comme le cancer.

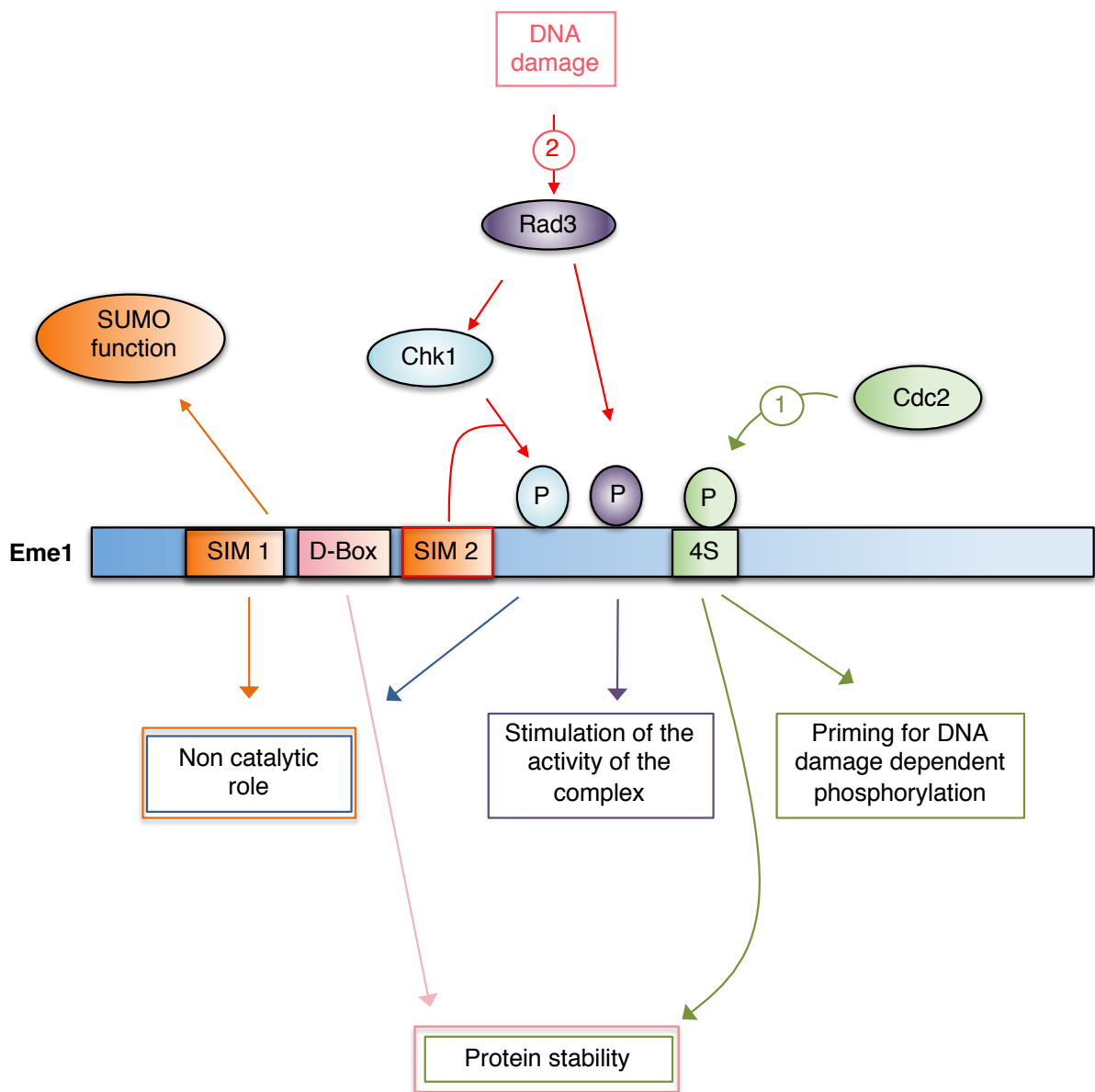


Figure 8. Récapitulatif des mécanismes de contrôle de Mus81-Eme1 chez *S. pombe* mis en évidence lors de ces travaux de thèses.

II. DISCUSSION

Le laboratoire a mis en évidence un mécanisme bimodal de contrôle de l'activité catalytique de Mus81-Eme1. Une phosphorylation d'Eme1 par Cdc2^{CDK1} autorise une deuxième phosphorylation par la voie Rad3^{ATR}-Chk1, en réponse à l'activation du checkpoint. Cette phosphorylation dépendante de la réponse aux dommages contribue à stimuler l'activité catalytique de Mus81-Eme1 et revêt un caractère essentiel pour le maintien de la stabilité du génome en absence de l'hélicase Rqh1^{BLM}.

Au cours de mon travail de thèse, j'ai mis en évidence une nouvelle complexité dans la régulation de Mus81-Eme1. En disséquant les mécanismes de phosphorylation d'Eme1 en réponse aux dommages, j'ai montré que la kinase Rad3^{ATR} est capable de phosphoryler directement Eme1, en plus de la phosphorylation attribuable à l'activation de Chk1. De plus, j'ai montré que c'est cette phosphorylation dépendante de Rad3^{ATR}, et non celle dépendante de Chk1, qui est essentielle à la stimulation catalytique de Mus81-Eme1. J'ai également identifié deux nouveaux domaines d'interaction avec SUMO (SIM1 et SIM2) au sein de l'extrémité N-terminale d'Eme1. Ces SIMs exercent un contrôle de Mus81-Eme1 indépendant de la stimulation catalytique du complexe, avec un rôle intrigant du SIM2 dans la phosphorylation dépendante de Chk1. J'ai enfin pu montrer que la perte simultanée de ces différents niveaux de régulation entraîne une perte de viabilité des cellules en absence de Rqh1^{BLM}.

Lors de nos analyses de dissection de la phosphorylation d'Eme1, nous avons initialement exclu toute contribution de Chk1 à la stimulation catalytique de Mus81-Eme1 à la vue de l'absence de stimulation catalytique du complexe Mus81-Eme1^{8AQ} (Fig 4C, résultat 1), non phosphorylable par Rad3 mais toujours phosphorylable par Chk1 ou une kinase activée par Chk1. Or, nos données quantitatives indiquent qu'un complexe Mus81-Eme1 partiellement purifié à partir d'un mutant *chk1Δ* est légèrement stimulé en réponse aux dommages (Fig 4D, résultat 1). Ainsi, il se pourrait que la phosphorylation par Rad3^{ATR} d'Eme1 constitue un premier niveau de stimulation catalytique ainsi qu'un prérequis pour une amplification de cette stimulation de manière dépendante de Chk1. Des expériences de reconstitution des différentes phosphorylations d'Eme1 *in vitro* permettront sans doute d'éclaircir cette

question. De plus, ces approches permettront de répondre à une question fondamentale du domaine, à savoir : la phosphorylation d'Eme1 contribue-t-elle directement à la stimulation catalytique du complexe sans l'intervention de cofacteurs ou permet-elle l'interaction de Mus81-Eme1 avec un ou des co-activateurs ?

Nous avons remarqué que les huit sites consensus de phosphorylation par Rad3^{ATR} se situent en amont du domaine coiled-coiled d'Eme1, dans la portion de la protéine définie comme intrinsèquement désordonnée. Il serait important d'étudier l'impact de la phosphorylation de ces résidus sur la structuration de l'extrémité N-terminale d'Eme1. La phosphorylation pourrait entraîner des changements de conformation d'Eme1 et favoriser son association avec un co-activateur ou influencer directement sur l'activité catalytique de Mus81-Eme1.

La notion de régulation par la présence de domaines non-structurés au sein des sous-unités MUS81 et EME1 est étayée par des observations du groupe de C. McGowan montrant que l'ablation des domaines non structurés de MUS81 et d'EME1 contribue à augmenter l'activité catalytique du complexe *in vitro* (Taylor and McGowan, 2008). Il a de plus été récemment montré que le domaine N-terminal HhH de la protéine humaine MUS81 jouerait le rôle d'inhibiteur de MUS81-EME1, et que cette inhibition serait levée par de MUS81 avec SLX4. Des études cryo-EM ont également révélé comment les changements conformationnels imposés par la liaison à l'ADN de XPF-ERCC1 lèvent l'auto-inhibition du domaine hélicase N-terminal de XPF (Jones et al., 2020). De manière intéressante, les SSEs membres de la famille XPF ont une structuration commune avec une extrémité C-terminale contenant le domaine catalytique et des domaines N-terminaux non-structurés à même de servir de plateforme pour des modifications post-traductionnelles, des interactions protéine-protéines, pouvant mener à des changements conformationnels et/ou des modifications de fonctions. Sur la base de nos résultats, il serait intéressant d'investiguer si de tels changements conformationnels, induits par la phosphorylation, pourraient contribuer directement au contrôle de Mus81-Eme1.

Il est important de noter que la phosphorylation d'Eme1 par Rad3^{ATR} est circonscrite à la phosphorylation dépendante de Cdc2^{CDK1}, ce qui restreint la contribution de Rad3^{ATR} à des phases précises du cycle cellulaire et plus particulièrement hors de la juridiction du point de contrôle intra-S activé au cours de la réplication. Il sera également intéressant d'approfondir l'étude du « timing » de la stimulation de Mus81-Eme1 par Rad3^{ATR} en réponse aux dommages

à l'ADN. Mus81-Eme1 est-il stimulé par Rad3^{ATR} avant l'activation de la kinase Chk1 ? Dans cette hypothèse, nous nous rapprochons des observations faites par Smolka et ses collègues, chez *S. cerevisiae*, où la signalisation Mec1^{ATR} est découplée de l'activation de Rad53 (Ohouo et al., 2013). Ce mode d'action de Mec1^{ATR} dit réplcatif permettrait un contrôle direct de facteurs de réparation sans nécessiter un arrêt prolongé du cycle cellulaire. Ce mode de contrôle, bien que mis en évidence pour la régulation de la phase S, pourrait tout aussi bien être opérant dans d'autres phases du cycle cellulaire et ainsi participer à la gestion de zones d'ADN non répliquées en G2. De plus, il est à noter que des travaux du laboratoire de Paul Russell au Scripps Institute ont montré que Rad3^{ATR} « décore » des loci qualifiés de difficiles à répliquer dans le génome (Rozenzhak et al., 2010). Un enrichissement de Mus81-Eme1 au niveau de tels sites permettrait sa stimulation localisée afin d'optimiser la gestion de la prise en charge de structures secondaires résultant d'une réplcation perturbée.

Il est intéressant de noter sur ce point que MUS81-EME1 et XPF-ERCC1 ont été impliquées dans le processus d'expression des sites fragiles communs dans les cellules humaines (CFS) (Naim et al., 2013; Ying et al., 2013). Les CFS sont des régions génomiques comportant souvent de longs gènes et caractérisées par une pauvreté en origines de réplcation, une occurrence de conflits entre les machineries de transcription et de réplcation. Ainsi, ces CFS peuvent atteindre les phases G2 et la mitose avec de l'ADN non-répliqué. Les SSEs contribueraient au clivage de structures secondaires d'ADN au niveau de la transition ADN répliqué-ADN non-répliqué afin d'introduire une cassure permettant l'établissement d'une voie de sauvetage post-réplcative nommée MiDAS (Mitotic DNA Synthesis) (Bhowmick et al., 2016; Minocherhomji et al., 2015). Ce processus de synthèse d'ADN post-réplcatif permet d'éviter la formation de ponts anaphasiques (Ultra Fine Bridge) lors de la mitose, eux-mêmes à l'origine de défauts mitotiques caractérisés par une ségrégation anormale des chromosomes et une importante instabilité génomique. Il se pourrait donc que Rad3^{ATR} joue un rôle important en présence de dommage à l'ADN mais également dans la gestion de régions compliquées à répliquer.

Une part importante de mon travail de thèse a également consisté en l'identification et en la caractérisation de deux domaines de fixation à SUMO (SIM1 et SIM2) dans le domaine N-terminal Eme1. Ces domaines coopérèrent pour l'interaction avec SUMO mais le SIM1 s'avère être un meilleur interacteur avec SUMO que le SIM2 (Fig 5A, résultat 1).

Si des cellules *mus81Δ* et *eme1Δ* sont caractérisées par une hypersensibilité au CPT, la perte des fonctions d'interaction avec SUMO n'impacte pas la viabilité des cellules en réponse à ce type de stress. Or, les fonctions d'interactions avec SUMO semblent intimement liées au contrôle de Mus81-Eme1 en absence de l'activité de l'hélicase Rqh1^{BLM}. Ces données ne sont pas sans rappeler les interactions génétiques avec Rqh1^{BLM} observées chez les mutants *eme1^{4SA}* et *eme1^{8AQ}*, respectivement non-phosphorylables par Cdc2^{CDK1} ou Rad3^{ATR}. Cependant, nous avons établi que les fonctions dépendantes des SIMs ne sont pas liées à la stimulation catalytique de Mus81-Eme1 en réponse à des dommages à l'ADN (Fig 6E, résultat 1). Quelle(s) est/sont le(s) rôle(s) des fonctions d'interaction avec SUMO dans le contrôle de Mus81-Eme1 pour le maintien de la stabilité du génome en absence de Rqh1^{BLM} ?

Une hypothèse est que les capacités d'interaction avec SUMO puissent contribuer au recrutement de Mus81-Eme1 au niveau de structures d'ADN secondaires s'accumulant en l'absence de Rqh1^{BLM}. Dans cette optique, il a été proposé que les domaines SIMs de la protéine SLX4 humaine participent à son recrutement aux régions télomériques, au sein des PML ou aux sites de dommage à l'ADN ([Guervilly et al., 2015](#); [Ouyang et al., 2015](#)). Récemment, il a également été montré chez *S. cerevisiae* que les domaines SIMs de Yen1 sont importants pour sa localisation en absence de dommages à l'ADN ou en présence de MMS ([Dorison et al., 2021](#)).

Une alternative radicalement opposée au modèle de recrutement via les domaines SIMs pourrait être que les SIMs d'Eme1 sont impliqués dans un processus de contrôle négatif de Mus81-Eme1 basé sur sa séquestration afin de limiter son action opportuniste sur des structures secondaires de l'ADN telles que les intermédiaires de réplication. La mutation des domaines SIMs d'Eme1 n'impacte pas la viabilité des cellules en réponse à la CPT, ce qui implique qu'une telle séquestration ne serait requis pour les fonctions essentielles du complexe Mus81-Eme1 dans la gestion du stress génotoxique induit par la CPT (Fig 5D, résultat 1). Par contre, cette séquestration pourrait être importante en l'absence de Rqh1^{BLM} pour limiter une prise en charge incontrôlée par Mus81-Eme1 de certaines structures secondaires d'ADN habituellement prise en charge par Rqh1^{BLM}, en particulier lors de la réplication.

Un exemple de compartimentation et de dynamique intranucléaire a été observée dans les cellules humaines où MUS81-EME1 s'accumule au sein du nucléole lors de la phase S et en est délocalisé au profit de sites de lésions de l'ADN suite à une irradiation UV ([Gao et al., 2003](#)).

Ayant caractérisé les propriétés de fixation à SUMO des SIM1 et SIM2, notre hypothèse la plus directe est que ces propriétés d'interaction avec un ou plusieurs facteurs SUMOylés contribueraient au contrôle de Mus81-Eme1. Ainsi, au cours de ma thèse, j'ai exploité la technique de purification en tandem (TAP) du complexe endogène de levure Mus81-Eme1 en utilisant Eme1 comme cible dans le but d'identifier des partenaires d'Eme1 dépendants des SIMs. Malheureusement, aucunes des analyses en spectrométrie de masse n'ont clairement permis d'identifier des partenaires spécifiques dépendants des domaines SIMs d'Eme1. Plusieurs raisons pourraient expliquer ces observations : **1)** l'interaction entre les partenaires SUMOylés et les SIMs d'Eme1 serait transitoire et limiterait de ce fait leur détection. **2)** Les sous-unités Mus81 et Eme1 pourraient être elles-mêmes SUMOylées et l'interaction intra- ou inter-moléculaires (entre Eme1 et Mus81) avec les domaines SIMs contribuerait à des changements conformationnels ou à des multimérisations, sans nécessiter d'autres interacteurs. En lien avec cette dernière hypothèse, il est important de souligner que la SUMOylation de MUS81 et de EME1 (Mms4 chez *S. cerevisiae*.) a été identifiée dans les cellules humaines et chez *S. cerevisiae* ([Hu et al., 2017](#); [Waizenegger et al., 2020](#)).

Lors de nos études de caractérisation des domaines SIMs, nous avons montré que SIM1 et SIM2 coopèrent pour interagir avec SUMO avec un rôle prépondérant du SIM1 sur celui du SIM2 (Fig 5A, résultat 1). De plus, nous avons montré qu'en absence de Rqh1 des mutations invalidant les capacités de fixation à SUMO du SIM1 n'impactent pas la capacité des cellules à former des colonies comparées à des cellules *rqh1Δ* seules, par contre, la viabilité de ces cellules est bien plus affectée que celle de mutants *rqh1Δ* (Fig 5E, résultat 1). Des mutations invalidant les fonctions du SIM2 réduisent considérablement la capacité à former des colonies en plus d'impacter la viabilité des cellules en absence de Rqh1^{BLM}. Des mutations au sein des deux SIMs augmentent de manière synergique la proportion de cellules malades.

Il semble déjà à ce stade que les fonctions remplies par SIM1 et SIM2 ne soient pas équivalentes. En outre, nous avons également constaté que le SIM2 serait nécessaire à la

phosphorylation d'Eme1 dépendante de Chk1 en réponse aux dommages. Ces résultats montrent que les fonctions du SIM2 s'étendent au-delà de la seule liaison à SUMO en mettent en perspective les différences phénotypiques entre mutants du SIM1 et du SIM2 dans la capacité à former des colonies et la viabilité des cellules en absence de Rqh1^{BLM}. Il est intrigant de noter que les mutations du SIM2, le moins efficace dans l'interaction avec SUMO, aient l'effet le plus prononcé sur la viabilité des cellules en absence de Rqh1 (Fig 5E, résultat 1). Cette dichotomie peut être réconciliée en faisant intervenir une phosphorylation du SIM2 qui modulerait sa capacité d'interaction avec SUMO. Ce mode de régulation a déjà été proposé pour la protéine RAP80, impliquée dans le recrutement de BRCA1, où la phosphorylation par CK2 dans le domaine SIM de RAP80 augmente son affinité pour SUMO ([Anamika and Spyrapoulos, 2016](#)). Nous avons d'ailleurs identifié *in silico* des sites de phosphorylations par les kinases Cdc2 et DDK dans la vicinity du SIM2. Nous sommes actuellement en train de tester cette hypothèse. De plus, bien que nous ne puissions pas exclure que les mutations introduites dans le SIM2 induisent des changements de structures impactant plus que la liaison à SUMO, il reste la possibilité que le SIM2 participe à l'association d'Eme1 avec un partenaire qui contient un domaine de type SUMO (SUMO-Like Domain ou SLD).

La seule protéine contenant des SLDs décrite à ce jour chez *S. pombe* est le facteur de stabilité du génome Rad60 qui contient deux SLD, dont chacun interagit avec différents acteurs de la voie SUMO ([Prudden et al., 2009](#)). Fait intéressant, il a été rapporté que l'orthologue de Rad60 chez *S. cerevisiae*, Esc2, interagit avec Mus81 via ses SLD et stimule le complexe Mus81-Mms4 ([Sebesta et al., 2017](#)). De plus, Esc2 a récemment été impliqué dans un mécanisme de dégradation de Mms4 phosphorylé ([Hu et al., 2017](#); [Waizenegger et al., 2020](#)). Nous pouvons exclure des scénarios similaires impliquant Rad60 chez *S. pombe* car un complexe Mus81-Eme1^{SIM1*+SIM2*} est toujours stimulé suite à l'activation de la voie de réponse aux dommages et, les mutations introduites au sein des domaines SIMs n'influent pas sur la stabilité d'Eme1 (Fig 5D-E, résultat 1). Cependant, il est tentant de voir Rad60 comme le candidat idéal pour remplir la fonction de partenaire d'Eme1, en interaction avec le SIM2, afin de favoriser la phosphorylation d'Eme1 dépendante de Chk1 en réponse à des dommages à l'ADN. De manière remarquable, lors de notre recherche de partenaires SUMOylés d'Eme1, nous avons identifié Rad60 comme interacteur spécifique d'un fragment recombinant N-terminal d'Eme1

(1-340). Nous allons tester la robustesse de cette interaction *in vivo* et sa dépendance vis à vis des domaines SIMs.

Ainsi, le contrôle de Mus81-Eme1 s'avère plus élaboré qu'initialement décrit. Avec la démonstration qu'il repose sur trois niveaux indépendants contribuant conjointement aux fonctions vitales dans des cellules dépourvues de Rqh1^{BLM}. Ce travail pose les bases de nouvelles pistes d'investigation qui devraient contribuer à une meilleure compréhension du contrôle du complexe Mus81-Eme1 dans le maintien de la stabilité du génome.

Les travaux effectués au cours de ma thèse ont également permis de mettre en évidence un nouveau mode de contrôle de Mus81-Eme1, basé sur la dégradation de la sous-unité Eme1. Nos données suggèrent qu'Eme1 est adressée au protéasome en sortie de mitose par le complexe E3 ligase APC/C. En effet, une analyse *in silico* a permis l'identification des trois motifs dégrons (KEN-box, Dégradation-box et motif ABBA) actuellement documentés comme participant à une reconnaissance de substrat par le complexe APC/C (Fig 4A, résultat 2) ([Zhou et al., 2016](#)). De plus, il semblerait que ce soit la forme phosphorylée par Cdc2^{CDK1} d'Eme1 qui soit ciblée pour une dégradation protéolytique (Fig 7D, résultat 2).

Nos analyses de la stabilité d'Eme1 ont montré qu'une délétion des 117 premiers résidus d'acides aminés entraîne une forte stabilisation (Fig 4B, résultat 2). Dans cette région N-terminale (1-117) se concentrent : KDN-box, D-Box, SIMs ainsi que les sites Ser23 et Thr50. N'ayant pas observé de stabilisation d'Eme1^{SIM1*+SIM2*} ni d'Eme1^{8AQ}, il semble que la stabilité de la sous-unité soit uniquement sous le contrôle des motifs dégrons de reconnaissance d'APC/C. Nos résultats suggèrent un rôle prépondérant de la D-box dans la dégradation d'Eme1 bien que sa mutation seule ne soit pas suffisante pour stabiliser la sous-unité de manière similaire à la délétion des 117 premiers acides aminés. Ainsi, la KDN-box pourrait elle-aussi jouer un rôle pour cibler Eme1 vers la dégradation.

Néanmoins, ces deux motifs seuls ne permettent pas d'expliquer la stabilisation plus importante d'Eme1 dans un mutant où les 143 premiers acides aminés ont été enlevés comparés à l'élimination des 117 premiers. Actuellement, nos données *in silico* tendent à suggérer que le motif ABBA pourrait être impliqué dans la différence de stabilité d'Eme1 dans ces deux mutants. Ainsi, la génération de mutants ponctuelles KDN-box, D-box et du motif

ABBA pourraient être nécessaire pour déterminer leur contribution respective ou commune pour le ciblage d'Eme1 pour sa dégradation. En outre, il a été montré que l'ensemble de ces motifs pouvaient collaborer pour l'interaction entre le substrat et APC/C (Zhou et al., 2016).

Un facteur important de la régulation de la stabilité d'Eme1 repose sur sa phosphorylation par Cdc2^{CDK1}. Nous avons émis l'hypothèse que la phosphorylation d'Eme1 par Cdc2^{CDK1} suivie de la reconnaissance des motifs dégrons par APC/C soient les deux éléments d'une même voie aboutissant à l'adressage d'Eme1 vers le protéasome. Afin de tester ce modèle, nous sommes en train de générer une souche *eme1*^{4SA-R75A/L78A} (Eme1 non phosphorylable par Cdc2 et la D-box mutée) et allons étudier la stabilité de la protéine Eme1^{4SA-R75A/L78A}. En revanche, les mécanismes moléculaires par lesquels la phosphorylation d'Eme1 par Cdc2^{CDK1} entraîne directement ou indirectement la reconnaissance des motifs dégrons d'Eme1 par APC/C reste une question ouverte.

Comme nous l'avons abordé au sujet du contrôle de l'activité catalytique de Mus81-Eme1, nous nous interrogeons sur l'impact que pourrait avoir la phosphorylation d'Eme1 sur la structuration de son extrémité N-terminale. Est-ce que la partie N-terminale d'Eme1 serait dans une structure « fermée », qui masquerait les motifs dégrons, et que la phosphorylation par Cdc2 « ouvrirait » la structure pour les démasquer ? Cette ouverture pourrait-elle être stabilisée par des co-facteurs ? Ou au contraire, est-ce qu'un co-facteur pourrait masquer les dégrons en absence de la phosphorylation, et la phosphorylation par Cdc2 permettrait de lever l'interaction avec ce co-facteur ? Autant de questions qui nécessitent d'autres expériences pour y répondre. De plus, ces données sont à mettre en perspective avec l'identité du motif ABBA d'Eme1, dont la séquence diverge du motif consensus décrit dans la littérature. Les motifs ABBA répondent au consensus Fx[ILV][FHY]x[DE], or le motif présent au sein d'Eme1 (FxLFXT) présente un résidu thréonine (en position 138) à la place d'un résidu acide aspartique ou glutamique en position +6 du motif. Cependant, nos analyses en phosphoprotéomique sur des complexes Mus81-Eme1 partiellement purifiés ont permis de mettre en évidence que ce résidu Thr138 était phosphorylé, et présente ainsi une charge similaire à celle d'un résidu d'acide aspartique ou glutamique (Fig 4A, résultat 2). De plus, le résidu Thr138 est suivi d'un résidu proline constituant de ce fait un site consensus pour Cdc2^{CDK1}. Ainsi, il serait possible que la phosphorylation de ce site par Cdc2^{CDK1} soit un

prérequis pour révéler la fonctionnalité d'un site de reconnaissance pour APC/C. Or ce résidu est intact dans le mutant *eme1^{45A}*, ce qui complique cette hypothèse et laisse présager une coordination de différentes phosphorylations Cdc2^{CDK1} dépendantes. Ce nouveau réseau élaboré de coopération entre les phosphorylations d'Eme1 et la régulation de son niveau protéique mériterait d'être testé.

Nos analyses de la fluctuation d'Eme1 au cours du cycle n'indiquent pas de disparition d'Eme1, suggérant qu'une néo-synthèse d'Eme1 prend part en sortie de mitose. Il faudra confronter ces analyses aux fluctuations du niveau protéique de Mus81 au cours du cycle cellulaire, qui basé sur nos données actuelles, semblent stable. *In silico*, nous avons identifié une D-box au sein de Mus81. Est-ce que cette dernière est requise pour la dégradation de Mus81, collabore-t-elle avec les motifs dégrons d'Eme1 ? Ces questions restent ouvertes.

Néanmoins, ces observations soulèvent la question de la fonction du complexe Mus81-Eme1 au cours de la phase S. Sur cet aspect, il a d'ailleurs été montré chez l'humain que MUS81-EME1 joue un rôle positif dans la progression des fourches de réplication, et ce, même en absence de dommages induits par un stress génotoxique exogène (Fu et al., 2015). L'étude du rôle du complexe Mus81-Eme1 au cours de la phase S et l'influence de la phosphorylation et de son niveau protéique sur la stabilité du génome mérite d'être exploré plus avant.

Notre hypothèse de travail propose que la phosphorylation d'Eme1 par Cdc2^{CDK1} restreint la stimulation catalytique du complexe Mus81-Eme1 à la phase G2 et à la mitose, en cas d'activation de la voie de réponses aux dommages. La persistance en sortie de mitose d'une forme stimulable (Eme1 phosphorylé par Cdc2^{CDK1}) ou stimulée (Eme1 phosphorylé par Rad3^{ATR}) de Mus81-Eme1 représenterait un danger pour la cellule. La/les forme(s) phosphorylée(s) d'Eme1 serai(en)t ainsi reconnue(s) par APC/C via les motifs dégrons, poly-ubiquitinylée(s) et adressée(s) au protéasome pour dégradation. Des travaux ont en effet montré que chez *S. cerevisiae*, l'expression d'un mutant de *mms4* mimant une phosphorylation constitutive entraînait une instabilité génomique (Szakal and Branzei, 2013).

Afin de tester notre modèle, nous avons investigué les phénotypes de souches exprimant un allèle d'*eme1* muté au niveau de la D-box d'Eme1 (*eme1^{R75A/L78A}*). L'expression d'un allèle *eme1^{R75A/L78A}* n'affecte ni la viabilité ni la croissance des cellules en absence comme en présence de CPT (Fig 6A, résultat 2). Le contrôle de la quantité d'Eme1 en soit ne semble pas

important lors de la réponse à la CPT. Il est à noter que le contrôle de Mus81-Eme1 par phosphorylation bimodale n'est pas non plus requis pour garantir la survie des cellules en réponse à des agents génotoxiques. Par contre, l'expression d'un allèle muté au niveau de la D-box d'Eme1 semble affecter la survie des cellules dans un contexte *rqh1Δ*.

Nos analyses de croissance de dilutions sériées ne sont pas suffisamment sensibles pour clairement établir une relation synergique entre *eme1^{R75A/L78A}* et l'absence de *rqh1^{BLM}*. Des approches par clonogénie sur les doubles mutants *eme1^{R75A/L78A} rqh1Δ* permettront d'avoir une vision plus fine de la viabilité de ces cellules. Des analyses par microscopie de la morphologie cellulaire de ces doubles mutants couplées à des analyses en microscopie à fluorescence du nombre de foyers de la protéine Rad52, lesquels sont indicateurs d'évènements de réparation de cassures de l'ADN, seraient particulièrement informatives quant à l'implication des dégrons sur la stabilité du génome. Toutes ces observations soulèvent de nouvelles questions auxquelles les réponses apportées permettraient de mieux comprendre les mécanismes fondamentaux de maintien de la stabilité du génome.

Des travaux antérieurs ont démontré qu'une régulation phospho-dépendante entraîne la stimulation catalytique de Mus81-Eme1 suite à la phosphorylation de sa sous-unité Eme1 au cours du cycle cellulaire et de manière induite par les dommages à l'ADN. Dans ce mécanisme bimodal, Eme1 est phosphorylé par Cdc2^{CDK1}, qui amorce la phosphorylation en aval par la voie Rad3^{ATR}-Chk1 lors des dommages à l'ADN (Dehé et al., 2013). Cette phosphorylation dépendante des dommages à l'ADN stimule l'activité catalytique de Mus81-Eme1 et est cruciale pour la stabilité du génome en l'absence de Rqh1^{BLM}. Nous avons récemment accumulé un ensemble de nouvelles données robuste qui révèle un réseau de régulation considérablement plus complexe de Mus81-Eme1 par phosphorylation : 1) C'est la phosphorylation directe par Rad3^{ATR}, et non Chk1, qui stimule principalement l'activité catalytique de Mus81-Eme1. 2) Les motifs interagissant avec SUMO nouvellement identifiés (SIM1 et SIM2) dans l'extrémité N-terminale d'Eme1 n'exercent pas de contrôle sur l'activité catalytique de Mus81-Eme1 mais ont une contribution spécifique intrigante des fonctions dépendantes du SIM2 à la phosphorylation d'Eme1 médiée par Chk1. 3) L'abrogation simultanée des dommages à l'ADN induits par la phosphorylation d'Eme1 et sa propriété de liaison à SUMO est incompatible avec la viabilité cellulaire en l'absence de Rqh1^{BLM}.

Ainsi, il apparaît que le contrôle de Mus81-Eme1 repose sur trois niveaux indépendants qui impliquent la phosphorylation d'Eme1 par Cdc2^{CDK1}, Rad3^{ATR} et/ou Chk1 combinés à des fonctions médiées par SUMO encore mal comprises. Il est important de noter que les trois niveaux contribuent conjointement aux fonctions essentielles que Mus81-Eme1 remplit dans les cellules dépourvues de Rqh1^{BLM}, mais il reste à déterminer comment exactement ces modes de régulations sont mis en œuvre, quelles sont leurs interactions fonctionnelles et quels sont les mécanismes moléculaires exacts sur lesquels elles reposent pour moduler l'activité de Mus81-Eme1 de manière catalytique et non catalytique. De plus, la découverte de ces nouvelles voies de régulation offre une opportunité unique de comprendre comment l'activité Mus81-Eme1 est régulée de manière différentielle tout au long du cycle cellulaire et/ou en réponse à des dommages à l'ADN.

Enfin, un quatrième niveau de régulation s'appuie sur la dégradation cycle cellulaire dépendante d'Eme1 par le protéasome. Cette dégradation est médiée par l'E3 ligase APC/C mais aussi semble nécessiter la phosphorylation Cdc2^{CDK1} dépendante. Les mécanismes moléculaires de cette régulation et l'interaction entre les différents motifs ou phosphorylations restent encore à déterminer.

Mes travaux de thèse ouvrent un vaste champ d'investigation sur les fonctions de Mus81-Eme1 avec de nouveaux mécanismes de régulations qui impactent directement l'activité catalytique du complexe de Mus81-Eme1. De plus, mes travaux ont permis de révéler un contrôle non-catalytique dont le mécanisme reste encore à caractériser. L'ensemble de ces aspects permettrait de mieux comprendre le fonctionnement de cette enzyme clé dans le maintien de la stabilité du génome.

BIBLIOGRAPHIE

Adair, G.M., Rolig, R.L., Moore-Faver, D., Zabelshansky, M., Wilson, J.H., and Nairn, R.S. (2000). Role of ERCC1 in removal of long non-homologous tails during targeted homologous recombination. *Embo J* 19, 5552–5561.

Ahuja, A.K., Jodkowska, K., Teloni, F., Bizard, A.H., Zellweger, R., Herrador, R., Ortega, S., Hickson, I.D., Altmeyer, M., Mendez, J., et al. (2016). A short G1 phase imposes constitutive replication stress and fork remodelling in mouse embryonic stem cells. *Nat Commun* 7, 10660.

Akamatsu, Y., Dziadkowiec, D., Ikeguchi, M., Shinagawa, H., and Iwasaki, H. (2003). Two different Swi5-containing protein complexes are involved in mating-type switching and recombination. *089498*, 1–6.

Akamatsu, Y., Murayama, Y., Yamada, T., Nakazaki, T., Tsutsui, Y., Ohta, K., and Iwasaki, H. (2008). Molecular Characterization of the Role of the *Schizosaccharomyces pombe* *nip1+/ctp1+* Gene in DNA Double-Strand Break Repair in Association with the Mre11-Rad50-Nbs1 Complex ▽. *Mol Cell Biol* 28, 3639–3651.

Alexeev, A., Mazin, A., and Kowalczykowski, S.C. (2003). Rad54 protein possesses chromatin- remodeling activity stimulated by the Rad51 – ssDNA nucleoprotein filament. *Nat Struct Mol Biol* 10, 182–187.

Amangyeld, T., Shin, Y.K., Lee, M., Kwon, B., and Seo, Y.S. (2014). Human MUS81-EME2 can cleave a variety of DNA structures including intact Holliday junction and nicked duplex. *Nucleic Acids Res* 42, 5846–5862.

Anamika, A., and Spyropoulos, L. (2016). Molecular Basis for Phosphorylation-dependent SUMO Recognition by the DNA Repair Protein RAP80*. *J Biol Chem* 291, 4417–4428.

Anand, R., Ranjha, L., Cannavo, E., and Cejka, P. (2016). Phosphorylated CtIP Functions as a Co-factor of the MRE11-RAD50-NBS1 Endonuclease in DNA End Resection. *Mol Cell* 64, 940–950.

Anand, R., Jasrotia, A., Bundschuh, D., Howard, S.M., Ranjha, L., Stucki, M., and Cejka, P. (2019). NBS1 promotes the endonuclease activity of the MRE11-RAD50 complex by sensing CtIP phosphorylation. *Embo J* 38, 1–16.

Andersen, S.L., Bergstralh, D.T., Kohl, K.P., LaRocque, J.R., Moore, C.B., and Sekelsky, J. (2009). *Drosophila* MUS312 and the Vertebrate Ortholog BTBD12 Interact with DNA Structure-Specific Endonucleases in DNA Repair and Recombination. *Mol Cell* 35, 128–135.

Argunhan, B., Sakakura, M., Afshar, N., and Kurihara, M. (2020). Cooperative interactions facilitate stimulation of Rad51 by the Swi5-Sfr1 auxiliary factor complex. 1–28.

Atkinson, J., and McGlynn, P. (2009). Replication fork reversal and the maintenance of genome stability. *Nucleic Acids Res* 37, 3475–3492.

Bass, T.E., and Cortez, D. (2019). Quantitative phosphoproteomics reveals mitotic function of the ATR activator ETAA1. *J Cell Biol* 218, 1235–1249.

Bass, T.E., Luzwick, J.W., Kavanaugh, G., Carroll, C., Dungrawala, H., Glick, G.G., Feldkamp, M.D., Putney, R., Chazin, W.J., and Cortez, D. (2016). ETAA1 acts at stalled replication forks to maintain genome integrity. *Nat Cell Biol* 18, 1185–1195.

Bastin-Shanower, S.A., Fricke, W.M., Mullen, J.R., and Brill, S.J. (2003). The Mechanism of Mus81-Mms4 Cleavage Site Selection Distinguishes It from the Homologous Endonuclease Rad1-Rad10. *Molecular and Cellular Biology*.

Baumann, C., Körner, R., Hofmann, K., and Nigg, E.A. (2007). PICH, a Centromere-Associated SNF2 Family ATPase, Is Regulated by Plk1 and Required for the Spindle Checkpoint. *Cell* 128, 101–114.

Benito, J., Martin-Castellanos, C., and Moreno, S. (1998). Regulation of the G1 phase of the cell cycle by periodic stabilization and degradation of the p25^{rum1} CDK inhibitor. *EMBO Journal*.

Bentley, N.J., Holtzman, D.A., Flaggs, G., Keegan, K.S., DeMaggio, A., Ford, J.C., Hoekstra, M., and Carr, A.M. (1996). The *Schizosaccharomyces pombe* rad3 checkpoint gene. *Embo J* 15, 6641–6651.

Bergerat, A., Massy, B. de, Gadelle, D., Varoutas, P.-C., Nicolas, A., and Forterre, P. (1997). An atypical topoisomerase II from archaea with implications for meiotic recombination. *Nature* 386, 414–417.

Bermudez, V.P., Lindsey-Boltz, L.A., Cesare, A.J., Maniwa, Y., Griffith, J.D., Hurwitz, J., and Sancar, A. (2003). Loading of the human 9-1-1 checkpoint complex onto DNA by the checkpoint clamp loader hRad17-replication factor C complex in vitro. *Proc National Acad Sci* 100, 1633–1638.

Berti, M., Chaudhuri, A.R., Thangavel, S., Gomathinayagam, S., Kenig, S., Vujanovic, M., Odreman, F., Glatzer, T., Graziano, S., Mendoza-Maldonado, R., et al. (2013). Human RECQ1 promotes restart of replication forks reversed by DNA topoisomerase I inhibition. *Nat Struct Mol Biol* 20, 347–354.

Bhowmick, R., Minocherhomji, S., and Hickson, I.D. (2016). RAD52 Facilitates Mitotic DNA Synthesis Following Replication Stress. *Mol Cell* 64, 1117–1126.

Bi, B., Rybalchenko, N., Golub, E.I., and Radding, C.M. (2004). Human and yeast Rad52 proteins promote DNA strand exchange. *PNAS*

Biebricher, A., Hirano, S., Enzlin, J.H., Wiechens, N., Streicher, W.W., Huttner, D., Wang, L.H.-C., Nigg, E.A., Owen-Hughes, T., Liu, Y., et al. (2013). PICH: A DNA Translocase Specially Adapted for Processing Anaphase Bridge DNA. *Mol Cell* 51, 691–701.

Biggerstaff, M., E.Szymkowski, D., and D.Wood, R. (1993). Co-correction of the ERCC1, ERCC4 and xeroderma. *EMBO Journal*.

- Bishop, D.K., Park, D., Xu, L., and 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, 439–456.
- Biswas, H., Goto, G., Wang, W., Sung, P., and Sugimoto, K. (2019). Ddc2ATRIP promotes Mec1ATR activation at RPA-ssDNA tracts. *Plos Genet* 15, 1–23.
- Blanco, M.G., Matos, J., and West, S.C. (2014). Dual Control of Yen1 Nuclease Activity and Cellular Localization by Cdk and Cdc14 Prevents Genome Instability. *Mol Cell* 54, 94–106.
- Bocquet, N., Bizard, A.H., Abdulrahman, W., Larsen, N.B., Faty, M., Cavadini, S., Bunker, R.D., Kowalczykowski, S.C., Cejka, P., Hickson, I.D., et al. (2014). Structural and mechanistic insight into Holliday-junction dissolution by Topoisomerase III α and RMI1. *Nat Struct Mol Biol* 21, 261–268.
- Boddy, M.N., Lopez-Girona, A., Shanahan, P., Interthal, H., Heyer, W.-D., and Russell, P. (2000a). Damage Tolerance Protein Mus81 Associates with the FHA1 Domain of Checkpoint Kinase Cds1.
- Boddy, M.N., Lopez-Girona, A., Shanahan, P., Interthal, H., Heyer, W.-D., and Russell, P. (2000b). Damage Tolerance Protein Mus81 Associates with the FHA1 Domain of Checkpoint Kinase Cds1. *Mol Cell Biol* 20, 8758–8766.
- Boddy, M.N., Lopez-Girona, A., Shanahan, P., Interthal, H., Heyer, W.-D., and Russell, P. (2000c). Damage Tolerance Protein Mus81 Associates with the FHA1 Domain of Checkpoint Kinase Cds1. *Mol Cell Biol* 20, 8758–8766.
- Boddy, M.N., Gaillard, P.-H.L., McDonald, W.H., Shanahan, P., Yates, J.R., and Russell, P. (2001). Mus81-Eme1 Are Essential Components of a Holliday Junction Resolvase. *Molecular Cell* 537–548.
- Bøe, C.A., Krohn, M., Rodland, G.E., Capiaghi, C., Maillard, O., Thoma, F., Boye, E., and Grallert, B. (2012). Induction of a G1-S checkpoint in fission yeast. *Proc National Acad Sci* 109, 9911–9916.
- Bosco, G., and Haber, J.E. (1998). Chromosome Break-Induced DNA Replication Leads to Nonreciprocal Translocations and Telomere Capture. *Genetics*.
- Boulton, S.J., and Jackson, S.P. (1996). *Saccharomyces cerevisiae* Ku70 potentiates illegitimate DNA double-strand break repair and serves as a barrier to error-prone DNA repair pathways. *Embo J* 15, 5093–5103.
- Bruin, R.A.M.D., Kalashnikova, T.I., Aslanian, A., Wohlschlegel, J., Chahwan, C., Yates, J.R., Russell, P., and Wittenberg, C. (2008). DNA replication checkpoint promotes G1-S transcription by inactivating the MBF repressor Nrm1. *Proc National Acad Sci* 105, 11230–11235.
- Cannavo, E., and Cejka, P. (2014). Sae2 promotes dsDNA endonuclease activity within Mre11–Rad50–Xrs2 to resect DNA breaks. *Nature* 514, 122–125.

Cannavo, E., Reginato, G., and Cejka, P. (2019). Stepwise 5' DNA end-specific resection of DNA breaks by the Mre11-Rad50-Xrs2 and Sae2 nuclease ensemble. *Proc National Acad Sci* *116*, 201820157.

Cannavo, E., Sanchez, A., Anand, R., Ranjha, L., Hugener, J., Adam, C., Acharya, A., Weyland, N., Aran-Guiu, X., Charbonnier, J.-B., et al. (2020). Regulation of the MLH1–MLH3 endonuclease in meiosis. *Nature* *586*, 618–622.

Carneiro, T., Khair, L., Reis, C.C., Borges, V., Moser, B.A., Nakamura, T.M., and Ferreira, M.G. (2010). Telomeres avoid end detection by severing the checkpoint signal transduction pathway. *Nature* *467*, 228–232.

Cejka, P., Cannavo, E., Polaczek, P., Masuda-Sasa, T., Pokharel, S., Campbell, J.L., and Kowalczykowski, S.C. (2010a). DNA end resection by Dna2-Sgs1-RPA and its stimulation by Top3-Rmi1 and Mre11-Rad50-Xrs2. *Nature* *467*, 112–116.

Cejka, P., Plank, J.L., Bachrati, C.Z., Hickson, I.D., and Kowalczykowski, S.C. (2010b). Rmi1 stimulates decatenation of double Holliday junctions during dissolution by Sgs1-Top3. *Nat Struct Mol Biol* *17*, 1377–1382.

Cejka, P., Plank, J.L., Dombrowski, C.C., and Kowalczykowski, S.C. (2012). Decatenation of DNA by the *S. cerevisiae* Sgs1-Top3-Rmi1 and RPA Complex: A Mechanism for Disentangling Chromosomes. *Mol Cell* *47*, 886–896.

Ceppi, I., Howard, S.M., Kasaciunaite, K., Pinto, C., Anand, R., Seidel, R., and Cejka, P. (2020). CtIP promotes the motor activity of DNA2 to accelerate long-range DNA end resection. *Proc National Acad Sci* *117*, 8859–8869.

Chahwan, C., Marti, V., Gao, H., Iii, J.R.Y., McGowan, C.H., and Russell, P. (2006). Sws1 is a conserved regulator of homologous recombination in eukaryotic cells. *Embo J* *25*, 2564–2574.

Chan, K., North, P.S., and Hickson, I.D. (2007). BLM is required for faithful chromosome segregation and its localization defines a class of ultrafine anaphase bridges. *Embo J* *26*, 3397–3409.

Chan, K.L., Palma-Pallag, T., Ying, S., and Hickson, I.D. (2009). Replication stress induces sister-chromatid bridging at fragile site loci in mitosis. *Nat Cell Biol* *11*, 753–760.

Chang, J.H., Kim, J.J., Choi, J.M., Lee, J.H., and Cho, Y. (2008). Crystal structure of the Mus81 – Eme1 complex. 1093–1106.

Chang, M., Bellaoui, M., Zhang, C., Desai, R., Morozov, P., Delgado-Cruzata, L., Rothstein, R., Freyer, G.A., Boone, C., and Brown, G.W. (2005). RMI1/NCE4, a suppressor of genome instability, encodes a member of the RecQ helicase/Topo III complex. *Embo J* *24*, 2024–2033.

Chaudhuri, A.R., Hashimoto, Y., Herrador, R., Neelsen, K.J., Fachinetti, D., Bermejo, R., Cocito, A., Costanzo, V., and Lopes, M. (2012). Topoisomerase I poisoning results in PARP-mediated replication fork reversal. *Nat Struct Mol Biol* *19*, 417–423.

- Chen, C.-F., and Brill, S.J. (2007). Binding and Activation of DNA Topoisomerase III by the Rmi1 Subunit*. *J Biol Chem* 282, 28971–28979.
- Chen, X.-B., Melchionna, R., Denis, C.-M., Gaillard, P.-H.L., Blasina, A., Weyer, I.V. de, Boddy, M.N., Russell, P., Vialard, J., and McGowan, C.H. (2001). Human Mus81-Associated Endonuclease Cleaves Holliday Junctions In Vitro. *Mol Cell* 8, 1117–1127.
- Ciccia, A., Constantinou, A., and West, S.C. (2003). Identification and Characterization of the Human Mus81-Emel Endonuclease. *J Biol Chem* 278, 25172–25178.
- Cloud, V., Chan, Y.-L., Grubb, J., Budke, B., and Bishop, D.K. (2012). Rad51 Is an Accessory Factor for Dmc1-Mediated Joint Molecule Formation During Meiosis. *Science* 337, 1222–1225.
- Corneo, B., Wendland, R.L., Deriano, L., Cui, X., Klein, I.A., Wong, S.-Y., Arnal, S., Holub, A.J., Weller, G.R., Pancake, B.A., et al. (2007). Rag mutations reveal robust alternative end joining. *Nature* 449, 483–486.
- Cortez, D., Guntuku, S., Qin, J., and Elledge, S.J. (2001). ATR and ATRIP: Partners in checkpoint signaling. *Science* 294, 1713–1716.
- Coudreuse, D., and Nurse, P. (2010). Driving the cell cycle with a minimal CDK control network. *Nature* 468, 1074–1079.
- Coulon, S., Gaillard, P.-H.L., Chahwan, C., McDonald, W.H., Iii, J.R.Y., and Russell, P. (2004). Slx1-Slx4 Are Subunits of a Structure-specific Endonuclease That Maintains Ribosomal DNA in Fission Yeast. *Molecular Biology of the Cell* 15, 71–80.
- Daley, J.M., Jimenez-Sainz, J., Wang, W., Miller, A.S., Xue, X., Nguyen, K.A., Jensen, R.B., and Sung, P. (2017). Enhancement of BLM-DNA2-Mediated Long-Range DNA End Resection by CtIP. *Cell Reports* 21, 324–332.
- Davis, A.P., and Symington, L.S. (2004). RAD51-Dependent Break-Induced Replication in Yeast. *Mol Cell Biol* 24, 2344–2351.
- Deem, A., Keszthelyi, A., Blackgrove, T., Vayl, A., Coffey, B., Mathur, R., Chabes, A., and Malkova, A. (2011). Break-Induced Replication Is Highly Inaccurate. *Plos Biol* 9, e1000594.
- Dehé, P.M., and Gaillard, P.H.L. (2017). Control of structure-specific endonucleases to maintain genome stability. *Nat Rev Mol Cell Biol*.
- Dehé, P.M., Coulon, S., Scaglione, S., Shanahan, P., Takedachi, A., Wohlschlegel, J.A., Yates, J.R., Llorente, B., Russell, P., and Gaillard, P.H.L. (2013). Regulation of Mus81-Emel Holliday junction resolvase in response to DNA damage. *Nat Struct Mol Biol* 20, 598–603.
- Deshpande, R.A., Myler, L.R., Soniat, M.M., Makharashvili, N., Lee, L., Lees-Miller, S.P., Finkelstein, I.J., and Paull, T.T. (2020). DNA-dependent protein kinase promotes DNA end processing by MRN and CtIP. *Sci Adv* 6, eaay0922.

Dilley, R.L., Verma, P., Cho, N.W., Winters, H.D., Wondisford, A.R., and Greenberg, R.A. (2016). Break-induced telomere synthesis underlies alternative telomere maintenance. *Nature* 539, 54–58.

Dodson, G.E., Limbo, O., Nieto, D., and Russell, P. (2010). Phosphorylation-regulated binding of Ctp1 to Nbs1 is critical for repair of DNA double-strand breaks. *Cell Cycle* 9, 1516–1522.

Donnianni, R.A., and Symington, L.S. (2013). Break-induced replication occurs by conservative DNA synthesis. *Proc National Acad Sci* 110, 13475–13480.

Donnianni, R.A., Zhou, Z.-X., Lujan, S.A., Al-Zain, A., Garcia, V., Glancy, E., Burkholder, A.B., Kunkel, T.A., and Symington, L.S. (2019). DNA Polymerase Delta Synthesizes Both Strands during Break-Induced Replication. *Mol Cell* 76, 371-381.e4.

Dorison, H., Talhaoui, I., and Mazón, G. (2021). Sumo-mediated recruitment allows timely function of the Yen1 nuclease in mitotic cells. *BioRxiv*.

Du, L.L., Nakamura, T.M., and Russell, P. (2006). Histone modification-dependent and -independent pathways for recruitment of checkpoint protein Crb2 to double-strand breaks. *Gene Dev* 20, 1583–1596.

Duda, H., Arter, M., Gloggnitzer, J., Teloni, F., Wild, P., Blanco, M.G., Altmeyer, M., and Matos, J. (2016). A Mechanism for Controlled Breakage of Under-replicated Chromosomes during Mitosis. *Dev Cell* 39, 740–755.

Dunderdale, H.J., Benson, F.E., Parsons, C.A., Sharpies, G.J., Lloyd, R.G., and West, S.C. (1991). Formation and resolution of recombination intermediates by *E. coli* RecA and RuvC proteins. *Nature* 354, 506–510.

Dutta, C., Patel, P.K., Rosebrock, A., Oliva, A., Leatherwood, J., and Rhind, N. (2008). The DNA Replication Checkpoint Directly Regulates MBF-Dependent G1/S Transcription. *Mol Cell Biol* 28, 5977–5985.

Dyck, E.V., Stasiak, A.Z., Stasiak, A., and West, S.C. (2001). Visualization of recombination intermediates produced by RAD52-mediated single-strand annealing. *Embo Rep* 2, 905–909.

Edwards, R.J., Bentley, N.J., and Carr, A.M. (1999). A Rad3-Rad26 complex responds to DNA damage independently of other checkpoint proteins. *Nat Cell Biol* 1, 393–398.

Egel, R. (1973). Commitment to meiosis in fission yeast. *Mol Gen Genetics Mgg* 121, 277–284.

Eissler, C.L., Mazón, G., Powers, B.L., Savinov, S.N., Symington, L.S., and Hall, M.C. (2014). The Cdk/Cdc14 Module Controls Activation of the Yen1 Holliday Junction Resolvase to Promote Genome Stability. *Mol Cell* 54, 80–93.

Emptage, R.P., Schoenberger, M.J., Ferguson, K.M., and Marmorstein, R. (2017). Intramolecular autoinhibition of checkpoint kinase 1 is mediated by conserved basic motifs of the C-terminal kinase-associated 1 domain. *J Biol Chem* 292, 19024–19033.

- Fekairi, S., Scaglione, S., Chahwan, C., Taylor, E.R., Tissier, A., Coulon, S., Dong, M.Q., Ruse, C., Yates, J.R., Russell, P., et al. (2009). Human SLX4 Is a Holliday Junction Resolvase Subunit that Binds Multiple DNA Repair/Recombination Endonucleases. *Cell* *138*, 78–89.
- Fishman-Lobell, J., and Haber, J.E. (1992). Removal of Nonhomologous DNA Ends in Double-Strand Break Recombination: The Role of the Yeast Ultraviolet Repair Gene RAD1. *Science*.
- Follonier, C., Oehler, J., Herrador, R., and Lopes, M. (2013). Friedreich's ataxia-associated GAA repeats induce replication-fork reversal and unusual molecular junctions. *Nat Struct Mol Biol* *20*, 486–494.
- Fouché, N., Özgür, S., Roy, D., and Griffith, J.D. (2006). Replication fork regression in repetitive DNAs. *Nucleic Acids Res* *34*, 6044–6050.
- Froget, B., Blaisonneau, J., Lambert, S., and Baldacci, G. (2008). Cleavage of stalled forks by fission yeast Mus81/Eme1 in absence of DNA replication checkpoint. *Mol Biol Cell* *19*, 445–456.
- Fu, H., Martin, M.M., Regairaz, M., Huang, L., You, Y., Lin, C.-M., Ryan, M., Kim, R., Shimura, T., Pommier, Y., et al. (2015). The DNA repair endonuclease Mus81 facilitates fast DNA replication in the absence of exogenous damage. *Nat Commun* *6*, 6746–6746.
- Fugger, K., Mistrik, M., Neelsen, K.J., Yao, Q., Zellweger, R., Kousholt, A.N., Haahr, P., Chu, W.K., Bartek, J., Lopes, M., et al. (2015). FBH1 Catalyzes Regression of Stalled Replication Forks. *Cell Reports* *10*, 1749–1757.
- Furnari, B., Blasina, A., Boddy, M.N., McGowan, C.H., and Russell, P. (1999). Cdc25 Inhibited In Vivo and In Vitro by Checkpoint Kinases Cds1 and Chk1. *Mol Biol Cell* *10*, 833–845.
- Furuya, K., Poitelea, M., Guo, L., Caspari, T., and Carr, A.M. (2004). Chk1 activation requires Rad9 S/TQ-site phosphorylation to promote association with C-terminal BRCT domains of Rad4TOPBP1. *Gene Dev* *18*, 1154–1164.
- Gaillard, P.-H.L., and Wood, R.D. (2001). Activity of individual ERCC1 and XPF subunits in DNA nucleotide excision repair. *Nucleic Acids Res* *29*, 872–879.
- Gaillard, P.H.L., Noguchi, E., Shanahan, P., and Russell, P. (2003). The endogenous Mus81-Eme1 complex resolves Holliday junctions by a nick and counternick mechanism. *Mol Cell* *12*, 747–759.
- Gallo-Fernández, M., Saugar, I., Ortiz-Bažan, M.Á., Vázquez, M.V., and Tercero, J.A. (2012). Cell cycle-dependent regulation of the nuclease activity of Mus81-Eme1/Mms4. *Nucleic Acids Res* *40*, 8325–8335.
- Gao, H., Chen, X.-B., and McGowan, C.H. (2003). Mus81 Endonuclease Localizes to Nucleoli and to Regions of DNA Damage in Human S-phase Cells. *Molecular Biology of the Cell*.

- Garcia, V., Phelps, S.E.L., Gray, S., and Neale, M.J. (2011). Bidirectional resection of DNA double-strand breaks by Mre11 and Exo1. *Nature* 479, 241–244.
- Ge, X.Q., Jackson, D.A., and Blow, J.J. (2007). Dormant origins licensed by excess Mcm2–7 are required for human cells to survive replicative stress. *Gene Dev* 21, 3331–3341.
- Gelot, C., Magdalou, I., and Lopez, B.S. (2015). Replication Stress in Mammalian Cells and Its Consequences for Mitosis. *Genes-Basel* 6, 267–298.
- Glickman, M.H., and Ciechanover, A. (2002). The Ubiquitin-Proteasome Proteolytic Pathway: Destruction for the Sake of Construction. *Physiol Rev* 82, 373–428.
- Grabarz, A., Guirouilh-Barbat, J., Barascu, A., Pennarun, G., Genet, D., Rass, E., Germann, S.M., Bertrand, P., Hickson, I.D., and Lopez, B.S. (2013). A Role for BLM in Double-Strand Break Repair Pathway Choice: Prevention of CtIP/Mre11-Mediated Alternative Nonhomologous End-Joining. *Cell Reports* 5, 21–28.
- Gravel, S., Chapman, J.R., Magill, C., and Jackson, S.P. (2008). DNA helicases Sgs1 and BLM promote DNA double-strand break resection. *Gene Dev* 22, 2767–2772.
- Greeson, N.T., Sengupta, R., Arida, A.R., Jenuwein, T., and Sanders, S.L. (2008). Di-methyl H4 lysine 20 targets the checkpoint protein Crb2 to sites of DNA damage. *J Biol Chem* 283, 33168–33174.
- Grigaitis, R., Ranjha, L., Wild, P., Kasaciunaite, K., Ceppi, I., Kissling, V., Henggeler, A., Susperregui, A., Peter, M., Seidel, R., et al. (2020). Phosphorylation of the RecQ Helicase Sgs1/BLM Controls Its DNA Unwinding Activity during Meiosis and Mitosis. *Dev Cell* 53, 1–18.
- Gritenaite, D., Princz, L.N., Szakal, B., Bantele, S.C.S., Wendeler, L., Schilbach, S., Habermann, B.H., Matos, J., Lisby, M., Branzei, D., et al. (2014). A cell cycle-regulated Slx4–Dpb11 complex promotes the resolution of DNA repair intermediates linked to stalled replication. *Gene Dev* 28, 1604–1619.
- Guervilly, J.H., Takedachi, A., Naim, V., Scaglione, S., Chawhan, C., Lovera, Y., Despras, E., Kuraoka, I., Kannouche, P., Rosselli, F., et al. (2015). The SLX4 complex is a SUMO E3 ligase that impacts on replication stress outcome and genome stability. *Mol Cell* 57, 123–137.
- Guirouilh-Barbat, J., Huck, S., Bertrand, P., Pirzio, L., Desmaze, C., Sabatier, L., and Lopez, B.S. (2004). Impact of the KU80 pathway on NHEJ-induced genome rearrangements in mammalian cells. *Mol Cell* 14, 611–623.
- Guirouilh-Barbat, J., Rass, E., Plo, I., Bertrand, P., and Lopez, B.S. (2007). Defects in XRCC4 and KU80 differentially affect the joining of distal nonhomologous ends. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*.
- Gutiérrez-Escribano, P., and Nurse, P. (2015). A single cyclin–CDK complex is sufficient for both mitotic and meiotic progression in fission yeast. *Nat Commun* 6, 6871.

- Gwon, G.H., Jo, A., Baek, K., Jin, K.S., Fu, Y., Lee, J.B., Kim, Y., and Cho, Y. (2014). Crystal structures of the structure-selective nuclease Mus81-Eme1 bound to flap DNA substrates. *Embo J* 33, 1061–1072.
- Haahr, P., Hoffmann, S., Tollenaere, M.A.X., Ho, T., Toledo, L.I., Mann, M., Bekker-Jensen, S., Räschle, M., and Mailand, N. (2016). Activation of the ATR kinase by the RPA-binding protein ETAA1. *Nat Cell Biol* 18, 1196–1207.
- Haber, J.E., and Heyer, W.-D. (2001). The Fuss about Mus81. *Cell* 107, 551–554.
- Hanada, K., Budzowska, M., Davies, S.L., Drunen, E.V., Onizawa, H., Beverloo, H.B., Maas, A., Essers, J., Hickson, I.D., and Kanaar, R. (2007). The structure-specific endonuclease Mus81 contributes to replication restart by generating double-strand DNA breaks. *Nat Struct Mol Biol* 14, 1096–1104.
- Hartsuiker, E., Neale, M.J., and Carr, A.M. (2009). Distinct Requirements for the Rad32Mre11 Nuclease and Ctp1CtIP in the Removal of Covalently Bound Topoisomerase I and II from DNA. *Mol Cell* 33, 117–123.
- Hassine, S.B., and Arcangioli, B. (2009). Tdp1 protects against oxidative DNA damage in non-dividing fission yeast. *Embo J* 28, 632–640.
- Hengeveld, R.C.C., de Boer, H.R., Schoonen, P.M., de Vries, E.G.E., Lens, S.M.A., and van Vugt, M.A.T.M. (2015). Rif1 Is Required for Resolution of Ultrafine DNA Bridges in Anaphase to Ensure Genomic Stability. *Dev Cell* 34, 466–474.
- H.ENZLIN, J., and D.SCHARER, O. (2002). The active site of the DNA repair endonuclease XPF-ERCC1 forms a highly conserved nuclease motif. *EMBO Journal*.
- Higgins, N.P., Kato, K., and Strauss, B. (1976). A model for replication repair in mammalian cells. *J Mol Biol* 101, 417–425.
- Hsiang, Y.H., Hertzberg, R., Hecht, S., and Liu, L.F. (1985). Camptothecin induces protein-linked DNA breaks via mammalian DNA topoisomerase I. *J Biol Chem* 260, 14873–14878.
- Hsiang, Y.-H., Lihou, M.G., and Liu, L.F. (1989). Arrest of replication forks by drug-stabilized topoisomerase I-DNA cleavable complexes as a mechanism of cell killing by camptothecin. *Cancer Research*.
- Hu, J., Sun, L., Shen, F., Chen, Y., Hua, Y., Liu, Y., Zhang, M., Hu, Y., Wang, Q., Xu, W., et al. (2012). The intra-S phase checkpoint targets Dna2 to prevent stalled replication forks from reversing. *Cell* 149, 1221–1232.
- Hu, L., Yang, F., Lu, L., and Dai, W. (2017). Arsenic-induced sumoylation of Mus81 is involved in regulating genomic stability. *Cell Cycle* 16, 802–811.
- Ibarra, A., Schwob, E., and Méndez, J. (2008). Excess MCM proteins protect human cells from replicative stress by licensing backup origins of replication. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*.

- Interthal, H., and 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*. *Mol Gen Genetics Mgg* 263, 812–827.
- Ip, S.C.Y., Rass, U., Blanco, M.G., Flynn, H.R., Skehel, J.M., and West, S.C. (2008). Identification of Holliday junction resolvases from humans and yeast. *Nature* 456, 357–361.
- Ivanova, T., Alves-Rodrigues, I., Gómez-Escoda, B., Dutta, C., DeCaprio, J.A., Rhind, N., Hidalgo, E., and Ayté, J. (2013). The DNA damage and the DNA replication checkpoints converge at the MBF transcription factor. *Mol Biol Cell* 24, 3350–3357.
- Iwasaki, H., Takahagi, M., Shiba, T., Nakata, A., and Shinagawa, H. (1991). *Escherichia coli* RuvC protein is an endonuclease that resolves the Holliday structure. *Embo J* 10, 4381–4389.
- Jones, M., Beuron, F., Borg, A., Nans, A., Earl, C.P., Briggs, D.C., Snijders, A.P., Bowles, M., Morris, E.P., Linch, M., et al. (2020). Cryo-EM structures of the XPF-ERCC1 endonuclease reveal how DNA-junction engagement disrupts an auto-inhibited conformation. *Nat Commun* 11, 1120.
- Kagawa, W., Kurumizaka, H., Ikawa, S., Yokoyama, S., and Shibata, T. (2001). Homologous Pairing Promoted by the Human Rad52 Protein*. *J Biol Chem* 276, 35201–35208.
- Kai, M., Boddy, M.N., Russell, P., and Wang, T.S.F. (2005). Replication checkpoint kinase Cds1 regulates Mus81 to preserve genome integrity during replication stress. *Gene Dev* 19, 919–932.
- Karow, J.K., Chakraverty, R.K., and Hickson, I.D. (1997). The Bloom's Syndrome Gene Product Is a 3'-5' DNA Helicase*. *J Biol Chem* 272, 30611–30614.
- Kasaciunaite, K., Fettes, F., Levikova, M., Daldrop, P., Anand, R., Cejka, P., and Seidel, R. (2019). Competing interaction partners modulate the activity of Sgs1 helicase during DNA end resection. *Embo J* 38, e101516.
- Kashkina, E., Qi, T., Weinfeld, M., and Young, D. (2012). Polynucleotide kinase/phosphatase, Pnk1, is involved in base excision repair in *Schizosaccharomyces pombe*. *Dna Repair* 11, 676–683.
- Kato, R., and Ogawa, H. (1994). An essential gene, ESR1, is required for mitotic growth, DNA repair and meiotic recombination *saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res* 22, 3104–3112.
- Kawabata, T., Luebben, S.W., Yamaguchi, S., Ilves, I., Matise, I., Buske, T., Botchan, M.R., and Shima, N. (2011). Stalled Fork Rescue via Dormant Replication Origins in Unchallenged S Phase Promotes Proper Chromosome Segregation and Tumor Suppression. *Mol Cell* 41, 543–553.
- Keeney, S., Giroux, C.N., and Kleckner, N. (1997). Meiosis-specific DNA double-strand breaks are catalyzed by Spo11, a member of a widely conserved protein family. *Cell* 88, 375–384.

Kikuchi, K., Narita, T., Pham, V.T., Iijima, J., Hirota, K., Keka, I.S., Mohiuddin, Okawa, K., Hori, T., Fukagawa, T., et al. (2013). Structure-Specific Endonucleases Xpf and Mus81 Play Overlapping but Essential Roles in DNA Repair by Homologous Recombination. *Cancer Res* 73, 4362–4371.

Kleff, S., Kemper, B., and Sternglanz, R. (1992). Identification and characterization of yeast mutants and. *EMBO Journal*.

Kolinjivadi, A.M., Sannino, V., Antoni, A.D., Zadorozhny, K., Kilkenny, M., Técher, H., Baldi, G., Shen, R., Ciccio, A., Pellegrini, L., et al. (2017). Smarcal1-Mediated Fork Reversal Triggers Mre11-Dependent Degradation of Nascent DNA in the Absence of Brca2 and Stable Rad51 Nucleofilaments. *Mol Cell* 67, 867-881.e7.

Komori, K., Sakae, S., Shinagawa, H., Morikawa, K., and Ishino, Y. (1999). A Holliday junction resolvase from *Pyrococcus furiosus*: Functional similarity to *Escherichia coli* RuvC provides evidence for conserved mechanism of homologous recombination in Bacteria, Eukarya, and Archaea. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*.

Komori, K., Fujikane, R., Shinagawa, H., and Ishino, Y. (2002). Novel endonuclease in Archaea cleaving DNA with various branched structure. *Genes Genet Syst* 77, 227–227.

Kumar, S., and Burgers, P.M. (2013). Lagging strand maturation factor Dna2 is a component of the replication checkpoint initiation machinery. *Gene Dev* 27, 313–321.

Kuramae, E.E., Robert, V., Snel, B., and Boekhout, T. (2006). Conflicting phylogenetic position of *Schizosaccharomyces pombe*. *Genomics* 88, 387–393.

Lai, X., Broderick, R., Bergoglio, V., Zimmer, J., Badie, S., Niedzwiedz, W., Hoffmann, J.-S., and Tarsounas, M. (2017). MUS81 nuclease activity is essential for replication stress tolerance and chromosome segregation in BRCA2-deficient cells. *Nat Commun* 8, 15983.

Lambert, S., Watson, A., Sheedy, D.M., Martin, B., and Carr, A.M. (2005). Gross Chromosomal Rearrangements and Elevated Recombination at an Inducible Site-Specific Replication Fork Barrier. *Cell* 121, 689–702.

Langerak, P., Mejia-ramirez, E., Limbo, O., and Russell, P. (2011). Release of Ku and MRN from DNA Ends by Mre11 Nuclease Activity and Ctp1 Is Required for Homologous Recombination Repair of Double-Strand Breaks. *Plos Genet* 7, e1002271.

Lee, K.M., Saiz, J.E., Barton, W.A., and Fisher, R.P. (1999). Cdc2 activation in fission yeast depends on Mcs6 and Csk1, two partially redundant Cdk-activating kinases (CAKs). *Curr Biol* 9, 441–444.

Lee-Theilen, M., Matthews, A.J., Kelly, D., Zheng, S., and Chaudhuri, J. (2011). CtIP promotes microhomology-mediated alternative end-joining during class switch recombination. *Nat Struct Mol Biol* 18, 75–79.

Lemaçon, D., Jackson, J., Quinet, A., Brickner, J.R., Li, S., Yazinski, S., You, Z., Ira, G., Zou, L., Mosammaparast, N., et al. (2017). MRE11 and EXO1 nucleases degrade reversed

forks and elicit MUS81-dependent fork rescue in BRCA2-deficient cells. *Nat Commun* 8, 860.

Lengsfeld, B.M., Rattray, A.J., Bhaskara, V., Ghirlando, R., and Paull, T.T. (2007). Sae2 Is an Endonuclease that Processes Hairpin DNA Cooperatively with the Mre11/Rad50/Xrs2 Complex. *Mol Cell* 28, 638–651.

Letessier, A., Millot, G.A., Koundrioukoff, S., Lachagès, A.-M., Vogt, N., Hansen, R.S., Malfoy, B., Brison, O., and Debatisse, M. (2011). Cell-type-specific replication initiation programs set fragility of the FRA3B fragile site. *Nature* 470, 120–123.

Levikova, M., Pinto, C., and Cejka, P. (2017). The motor activity of dna2 functions as an ssdna translocase to promote dna end resection. *Gene Dev* 31, 493–502.

L.Gould, K., Moreno, S., J.Owen, D., Sazer, S., and Nurse, P. (1991). Phosphorylation at Thr 167 is required for *Schizosaccharomyces pombe* p34Cdc2 function. *EMBO Journal*.

Li, Y., Wang, J., Zhou, G., Lajeunesse, M., Le, N., Stawicki, B.N., Corcino, Y.L., Berkner, K.L., and Runge, K.W. (2017). Nonhomologous End-Joining with Minimal Sequence Loss Is Promoted by the Mre11-Rad50-Nbs1-Ctp1 Complex in *Schizosaccharomyces pombe*. *Genetics* 206, 481–496.

Lieber, M.R. (2010). The Mechanism of Double-Strand DNA Break Repair by the Nonhomologous DNA End-Joining Pathway. *Annu Rev Biochem* 79, 181–211.

Limbo, O., Chahwan, C., Yamada, Y., Bruin, R.A.M. de, Wittenberg, C., and Russell, P. (2007). Ctp1 Is a Cell-Cycle-Regulated Protein that Functions with Mre11 Complex to Control Double-Strand Break Repair by Homologous Recombination. *Mol Cell* 28, 134–146.

Limbo, O., Yamada, Y., and Russell, P. (2018). Mre11-Rad50–dependent activity of ATM/Tel1 at DNA breaks and telomeres in the absence of Nbs1. *Mol Biol Cell* 29, 1389–1399.

Lin, S.J., Wardlaw, C.P., Morishita, T., Miyabe, I., Chahwan, C., Caspari, T., Schmidt, U., Carr, A.M., and Garcia, V. (2012). The Rad4TopBP1 ATR-activation domain functions in G1/S phase in a chromatin-dependent manner. *Plos Genet* 8, e1002801.

Liu, F., Stanton, J.J., Wu, Z., and Piwnicka-Worms, H. (1997). The Human Myt1 Kinase Preferentially Phosphorylates Cdc2 on Threonine 14 and Localizes to the Endoplasmic Reticulum and Golgi Complex.

Liu, Y., Nielsen, C.F., Yao, Q., and Hickson, I.D. (2014). The origins and processing of ultra fine anaphase DNA bridges. *Curr Opin Genet Dev* 26, 1–5.

Lorenz, A., West, S.C., and Whitby, M.C. (2009). The human Holliday junction resolvase GEN1 rescues the meiotic phenotype of a *Schizosaccharomyces pombe* mus81 mutant. *Nucleic Acids Res* 38, 1866–1873.

Lukas, C., Savic, V., Bekker-Jensen, S., Doil, C., Neumann, B., Pedersen, R.S., Grøfte, M., Chan, K.L., Hickson, I.D., Bartek, J., et al. (2011). 53BP1 nuclear bodies form around DNA

lesions generated by mitotic transmission of chromosomes under replication stress. *Nat Cell Biol* 13, 243–253.

Lundgren, K., Walworth, N., Booher, R., Dembski, M., Kirschner, M., and Beach, D. (1991). Mik1 and Wee1 Cooperate in the Inhibitory Tyrosine Phosphorylation of Cdc2. *Cell* 64, 1111–1122.

Lydeard, J.R., Jain, S., Yamaguchi, M., and Haber, J.E. (2007). Break-induced replication and telomerase-independent telomere maintenance require Pol32. *Nature* 448, 820–823.

Lydeard, J.R., Lipkin-Moore, Z., Jain, S., Eapen, V.V., and Haber, J.E. (2010a). Sgs1 and Exo1 Redundantly Inhibit Break-Induced Replication and De Novo Telomere Addition at Broken Chromosome Ends. *Plos Genet* 6, e1000973.

Lydeard, J.R., Lipkin-Moore, Z., Sheu, Y.-J., Stillman, B., Burgers, P.M., and Haber, J.E. (2010b). Break-induced replication requires all essential DNA replication factors except those specific for pre-RC assembly. *Genes and Development*.

Ma, C.J., Gibb, B., Kwon, Y., Sung, P., and Greene, E.C. (2017). Protein dynamics of human RPA and RAD51 on ssDNA during assembly and disassembly of the RAD51 filament. *Nucleic Acids Res* 45, 749–761.

Ma, J.-L., Kim, E.M., Haber, J.E., and Lee, S.E. (2003). Yeast Mre11 and Rad1 Proteins Define a Ku-Independent Mechanism To Repair Double-Strand Breaks Lacking Overlapping End Sequences. *Mol Cell Biol* 23, 8820–8828.

Ma, Y., Lu, H., Tippin, B., Goodman, M.F., Shimazaki, N., Koiwai, O., Hsieh, C.L., Schwarz, K., and Lieber, M.R. (2004). A biochemically defined system for mammalian nonhomologous DNA end joining. *Mol Cell* 16, 701–713.

Majka, J., Niedziela-Majka, A., and Burgers, P.M.M.J. (2006). The Checkpoint Clamp Activates Mec1 Kinase during Initiation of the DNA Damage Checkpoint. *Mol Cell* 24, 891–901.

Makharashvili, N., Tubbs, A.T., Yang, S.-H., Wang, H., Barton, O., Zhou, Y., Deshpande, R.A., Lee, J.-H., Lobrich, M., Sleckman, B.P., et al. (2014). Catalytic and Noncatalytic Roles of the CtIP Endonuclease in Double-Strand Break End Resection. *Mol Cell* 54, 1022–1033.

Malkova, A., Ivanov, E.L., and Haber, J.E. (1996). Double-strand break repair in the absence of RAD51 in yeast: a possible role for break-induced DNA replication. *Proc National Acad Sci* 93, 7131–7136.

Maloisel, L., Fabre, F., and Gangloff, S. (2008). DNA Polymerase δ Is Preferentially Recruited during Homologous Recombination To Promote Heteroduplex DNA Extension $\square$. *Mol Cell Biol* 28, 1373–1382.

Manolis, K.G., Nimmo, E.R., Hartsuiker, E., Carr, A.M., Jeggo, P.A., and Allshire, R.C. (2001). Novel functional requirements for non-homologous DNA end joining in *Schizosaccharomyces pombe*. *Embo J* 20, 210–221.

- Mao, Z., Bozzella, M., Seluanov, A., and Gorbunova, V. (2008). Comparison of nonhomologous end joining and homologous recombination in human cells. *Dna Repair* 7, 1765–1771.
- Marco, S.D., Hasanova, Z., Kanagaraj, R., Chappidi, N., Altmannova, V., Menon, S., Sedlackova, H., Langhoff, J., Surendranath, K., Hühn, D., et al. (2017). RECQ5 Helicase Cooperates with MUS81 Endonuclease in Processing Stalled Replication Forks at Common Fragile Sites during Mitosis. *Mol Cell* 66, 658–671.e8.
- Marrero, V.A., and Symington, L.S. (2010). Extensive DNA End Processing by Exo1 and Sgs1 Inhibits Break-Induced Replication. *Plos Genet* 6, e1001007.
- Matos, J., Blanco, M.G., Maslen, S., Skehel, J.M., and West, S.C. (2011). Regulatory Control of the Resolution of DNA Recombination Intermediates during Meiosis and Mitosis. *Cell* 147, 158–172.
- Matos, J., Blanco, M.G., and West, S.C. (2013). Cell-Cycle Kinases Coordinate the Resolution of Recombination Intermediates with Chromosome Segregation. *Cell Reports* 4, 76–86.
- Mayle, R., Campbell, I.M., Beck, C.R., Yu, Y., Wilson, M., Shaw, C.A., Bjergbaek, L., Lupski, J.R., and Ira, G. (2015). Mus81 and converging forks limit the mutagenicity of replication fork breakage. *Science* 349, 742–747.
- Mazin, A.V., Alexeev, A.A., and Kowalczykowski, S.C. (2003). A Novel Function of Rad54 Protein. *J Biol Chem* 278, 14029–14036.
- Mcilwraith, M.J., Vaisman, A., Liu, Y., Fanning, E., Woodgate, R., and West, S.C. (2005). Human DNA Polymerase η Promotes DNA Synthesis from Strand Invasion Intermediates of Homologous Recombination. *Mol Cell* 20, 783–792.
- McVey, M., and Lee, S.E. (2008). MMEJ repair of double-strand breaks (director's cut): deleted sequences and alternative endings. *Trends Genet* 24, 529–538.
- Menin, L., Ursich, S., Trovesi, C., Zellweger, R., Lopes, M., Longhese, M.P., and Clerici, M. (2018). Tel1/ATM prevents degradation of replication forks that reverse after topoisomerase poisoning. *Embo Rep* 19.
- Michel, B., Boubakri, H., Baharoglu, Z., LeMasson, M., and Lestini, R. (2007). Recombination proteins and rescue of arrested replication forks. *Dna Repair* 6, 967–980.
- Mijic, S., Zellweger, R., Chappidi, N., Berti, M., Jacobs, K., Mutreja, K., Ursich, S., Chaudhuri, A.R., Nussenzweig, A., Janscak, P., et al. (2017). Replication fork reversal triggers fork degradation in BRCA2-defective cells. *Nat Commun* 8, 859.
- Millar, J.B., McGowan, C.H., Lenaers, G., Jones, R., and Russell, P. (1991). P80Cdc25 Mitotic Inducer Is the Tyrosine Phosphatase That Activates P34Cdc2 Kinase in Fission Yeast. *Embo J* 10, 4301–4309.

- Miller, A.S., Daley, J.M., Pham, N.T., Niu, H., Xue, X., Ira, G., and Sung, P. (2017). A novel role of the Dna2 translocase function in DNA break resection. *Gene Dev* 31, 503–510.
- Mimitou, E.P., and Symington, L.S. (2008). Sae2, Exo1 and Sgs1 collaborate in DNA double-strand break processing. *Nature* 455, 770–774.
- Minocherhomji, S., Ying, S., Bjerregaard, V.A., Bursomanno, S., Aleliunaite, A., Wu, W., Mankouri, H.W., Shen, H., Liu, Y., and Hickson, I.D. (2015). Replication stress activates DNA repair synthesis in mitosis. *Nature* 528, 286–290.
- Mizuuchi, K., Kemper, B., Hays, J., and Weisberg, R.A. (1982). T4 endonuclease VII cleaves holliday structures. *Cell* 29, 357–365.
- Morafraila, E.C., Hänni, C., Allen, G., Zeisner, T., Clarke, C., Johnson, M.C., Santos, M.M., Carroll, L., Minchell, N.E., Baxter, J., et al. (2019). Checkpoint inhibition of origin firing prevents DNA topological stress. *Gene Dev* 33, 1539–1554.
- Moreno-Herrero, F., Jager, M.D., Dekker, N.H., Kanaar, R., Wyman, C., and Dekker, C. (2005). Mesoscale conformational changes in the DNA-repair complex Rad50/Mre11/Nbs1 upon binding DNA. *Nature* 437, 440–443.
- Moriel-Carretero, M., and Aguilera, A. (2010). A Postincision-Deficient TFIIH Causes Replication Fork Breakage and Uncovers Alternative Rad51- or Pol32-Mediated Restart Mechanisms. *Mol Cell* 37, 690–701.
- Mueller, P.R., Coleman, T.R., Kumagai, A., and Dunphy, W.G. (1995). Myt1: A Membrane-Associated Inhibitory Kinase That Phosphorylates Cdc2 on Both Threonine-14 and Tyrosine-15. *Science* 270, 86–90.
- Mullen, J.R., Kaliraman, V., Ibrahim, S.S., and Brill, S.J. (2001). Requirement for Three Novel Protein Complexes in the Absence of the Sgs1 DNA Helicase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*.
- Muñoz, I.M., Hain, K., Déclais, A.Ć., Gardiner, M., Toh, G.W., Sanchez-Pulido, L., Heuckmann, J.M., Toth, R., Macartney, T., Eppink, B., et al. (2009). Coordination of Structure-Specific Nucleases by Human SLX4/BTBD12 Is Required for DNA Repair. *Mol Cell* 35, 116–127.
- Myler, L.R., Gallardo, I.F., Soniat, M.M., Deshpande, R.A., Gonzalez, X.B., Kim, Y., Paull, T.T., and Finkelstein, I.J. (2017). Single-Molecule Imaging Reveals How Mre11-Rad50-Nbs1 Initiates DNA Break Repair. *Mol Cell* 67, 891–898.e4.
- Naim, V., Wilhelm, T., Debatisse, M., and Rosselli, F. (2013). ERCC1 and MUS81–EME1 promote sister chromatid separation by processing late replication intermediates at common fragile sites during mitosis. *Nat Cell Biol* 15, 1008–1015.
- Nakamura, T.M., Du, L.-L., Redon, C., and Russell, P. (2004). Histone H2A Phosphorylation Controls Crb2 Recruitment at DNA Breaks, Maintains Checkpoint Arrest, and Influences DNA Repair in Fission Yeast. *Mol Cell Biol* 24, 7820–7820.

- Navadgi-Patil, V.M., and Burgers, P.M. (2008). Yeast DNA replication protein Dpb11 activates the Mec1/ATR checkpoint kinase. *J Biol Chem* 283, 35853–35859.
- Navadgi-Patil, V.M., and Burgers, P.M. (2009). The Unstructured C-Terminal Tail of the 9-1-1 Clamp Subunit Ddc1 Activates Mec1/ATR via Two Distinct Mechanisms. *Mol Cell* 36, 743–753.
- New, J.H., Sugiyama, T., Zaitseva, E., and Kowalczykowski, S.C. (1998). Rad52 protein stimulates DNA strand exchange by Rad51 and replication protein A. *Nature* 391, 407–410.
- Newman, M., Murray-Rust, J., Lally, J., Rudolf, J., Fadden, A., Knowles, P.P., White, M.F., and McDonald, N.Q. (2005). Structure of an XPF endonuclease with and without DNA suggests a model for substrate recognition. *Embo J* 24, 895–905.
- Nilssen, E.A., Synnes, M., Kleckner, N., Grallert, B., and Boye, E. (2003). Intra-G1 arrest in response to UV irradiation in fission yeast. *Proc National Acad Sci* 100, 10758–10763.
- Nimonkar, A.V., Genschel, J., Kinoshita, E., Polaczek, P., Campbell, J.L., Wyman, C., Modrich, P., and Kowalczykowski, S.C. (2011). BLM-DNA2-RPA-MRN and EXO1-BLM-RPA-MRN constitute two DNA end resection machineries for human DNA break repair. *Gene Dev* 25, 350–362.
- Nishino, T., Komori, K., Ishino, Y., and Morikawa, K. (2003). X-Ray and Biochemical Anatomy of an Archaeal XPF/Rad1/Mus81 Family Nuclease Similarity between Its Endonuclease Domain and Restriction Enzymes. *Structure* 11, 445–457.
- Nishino, T., Komori, K., Tsuchiya, D., Ishino, Y., and Morikawa, K. (2005a). Crystal Structure and Functional Implications of *Pyrococcus furiosus* Hef Helicase Domain Involved in Branched DNA Processing. *Structure* 13, 143–153.
- Nishino, T., Komori, K., Ishino, Y., and Morikawa, K. (2005b). Structural and Functional Analyses of an Archaeal XPF/Rad1/Mus81 Nuclease: Asymmetric DNA Binding and Cleavage Mechanisms. *Structure* 13, 1183–1192.
- Niu, H., Chung, W.-H., Zhu, Z., Kwon, Y., Zhao, W., Chi, P., Prakash, R., Seong, C., Liu, D., Lu, L., et al. (2010). Mechanism of the ATP-dependent DNA end-resection machinery from *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature* 467, 108–111.
- Noguchi, E., Noguchi, C., Du, L.-L., and Russell, P. (2003). Swi1 Prevents Replication Fork Collapse and Controls Checkpoint Kinase Cds1. *Mol Cell Biol* 23, 7861–7874.
- Noguchi, E., Noguchi, C., McDonald, W.H., Yates, J.R., and Russell, P. (2004). Swi1 and Swi3 Are Components of a Replication Fork Protection Complex in Fission Yeast. *Mol Cell Biol* 24, 8342–8355.
- Ohouo, P.Y., Oliveira, F.M.B. de, Liu, Y., Ma, C.J., and Smolka, M.B. (2013). DNA Repair Scaffolds Dampen Checkpoint Signaling by Counteracting the Rad9 Adaptor. *Nature* 493, 120–124.

- Osman, F., Dixon, J., Doe, C.L., and Whitby, M.C. (2003). Generating Crossovers by Resolution of Nicked Holliday Junctions A Role for Mus81-Eme1 in Meiosis. *Mol Cell* *12*, 761–774.
- Ouyang, J., Garner, E., Hallet, A., Nguyen, H.D., Rickman, K.A., Gill, G., Smogorzewska, A., and Zou, L. (2015). Noncovalent Interactions with SUMO and Ubiquitin Orchestrate Distinct Functions of the SLX4 Complex in Genome Maintenance. *Mol Cell* *57*, 108–122.
- Paciotti, V., Clerici, M., Lucchini, G., and Longhese, M.P. (2000). The checkpoint protein Ddc2, functionally related to *S. pombe* Rad26, interacts with Mec1 and is regulated by Mec1-dependent phosphorylation in budding yeast. *Gene Dev* *14*, 2046–2059.
- Palermo, C., Hope, J.C., Freyer, G.A., Rao, H., and Walworth, N.C. (2008). Importance of a C-Terminal Conserved Region of Chk1 for Checkpoint Function. *Plos One* *3*, e1427.
- Palma, A., Pugliese, G.M., Murfun, I., Marabitti, V., Malacaria, E., Rinalducci, S., Minoprio, A., Sanchez, M., Mazzei, F., Zolla, L., et al. (2018). Phosphorylation by CK2 regulates MUS81/EME1 in mitosis and after replication stress. *Nucleic Acids Res* *46*, 5109–5124.
- Pardo, B., Moriel-Carretero, M., Vicat, T., Aguilera, A., and Pasero, P. (2020). Homologous recombination and Mus81 promote replication completion in response to replication fork blockage. *Embo Rep* *21*, 1–19.
- Paull, T.T., and Gellert, M. (1998). The 3' to 5' exonuclease activity of Mre11 facilitates repair of DNA double-strand breaks. *Mol Cell* *1*, 969–979.
- Pedersen, R.T., Kruse, T., Nilsson, J., Oestergaard, V.H., and Lisby, M. (2015). TopBP1 is required at mitosis to reduce transmission of DNA damage to G1 daughter cells. *J Cell Biology* *210*, 565–582.
- Pepe, A., and West, S.C. (2014a). Substrate specificity of the MUS81-EME2 structure selective endonuclease. *Nucleic Acids Res* *42*, 3833–3845.
- Pepe, A., and West, S.C. (2014b). MUS81-EME2 promotes replication fork restart. *Cell Reports* *7*, 1048–1055.
- Piazza, A., Shah, S.S., Wright, W.D., Gore, S.K., Koszul, R., and Heyer, W.D. (2019). Dynamic Processing of Displacement Loops during Recombinational DNA Repair. *Mol Cell* *73*, 1255-1266.e4.
- Plank, J.L., Wu, J., and Hsieh, T. (2006). Topoisomerase III α and Bloom's helicase can resolve a mobile double Holliday junction substrate through convergent branch migration. *Proc National Acad Sci* *103*, 11118–11123.
- Pommier, Y., Sun, Y., Huang, S.Y.N., and Nitiss, J.L. (2016). Roles of eukaryotic topoisomerases in transcription, replication and genomic stability. *Nat Rev Mol Cell Bio* *17*, 703–721.

- Porter-Goff, M.E., and Rhind, N. (2009). The Role of MRN in the S-Phase DNA Damage Checkpoint Is Independent of Its Ctp1-dependent Roles in Double-Strand Break Repair and Checkpoint Signaling.
- Postow, L., Ullsperger, C., Keller, R.W., Bustamante, C., Vologodskii, A.V., and Cozzarelli, N.R. (2001). Positive Torsional Strain Causes the Formation of a Four-way Junction at Replication Forks*. *J Biol Chem* 276, 2790–2796.
- Princz, L.N., Wild, P., Bittmann, J., Aguado, F.J., Blanco, M.G., Matos, J., and Pfander, B. (2017). Dbf4-dependent kinase and the Rtt107 scaffold promote Mus81-Mms4 resolvase activation during mitosis. *Embo J* 36, 664–678.
- Prudden, J., Perry, J.J.P., Arvai, A., Tainer, J.A., and Boddy, M.N. (2009). Molecular Mimicry of SUMO Promotes DNA Repair. *Nat Struct Mol Biol* 16, 509–516.
- Qu, M., Yang, B., Tao, L., Yates, J.R., Russell, P., Dong, M.Q., and Du, L.L. (2012). Phosphorylation-dependent interactions between Crb2 and Chk1 are essential for DNA damage checkpoint. *Plos Genet* 8, e1002817.
- Qu, M., Rappas, M., Wardlaw, C.P., Garcia, V., Ren, J.Y., Day, M., Carr, A.M., Oliver, A.W., Du, L.L., and Pearl, L.H. (2013). Phosphorylation-Dependent Assembly and Coordination of the DNA Damage Checkpoint Apparatus by Rad4 TopBP1. *Mol Cell* 51, 723–736.
- Raleigh, J.M., and O’Connell, M.J. (2000). The G2 DNA damage checkpoint targets both Wee1 and Cdc25. *J Cell Sci* 113, 1727–1736.
- Rass, E., Grabarz, A., Plo, I., Gautier, J., Bertrand, P., and Lopez, B.S. (2009). Role of Mre11 in chromosomal nonhomologous end joining in mammalian cells. *Nat Struct Mol Biol* 16, 819–824.
- Raynard, S., Bussen, W., and Sung, P. (2006). A Double Holliday Junction Dissolvasome Comprising BLM, Topoisomerase III α , and BLAP75*. *J Biol Chem* 281, 13861–13864.
- Raynard, S., Zhao, W., Bussen, W., Lu, L., Ding, Y.-Y., Busygina, V., Meetei, A.R., and Sung, P. (2008). Functional Role of BLAP75 in BLM-Topoisomerase III α -dependent Holliday Junction Processing*. *J Biol Chem* 283, 15701–15708.
- Regairaz, M., Zhang, Y.W., Fu, H., Agama, K.K., Tata, N., Agrawal, S., Aladjem, M.I., and Pommier, Y. (2011). Mus81-mediated DNA cleavage resolves replication forks stalled by topoisomerase I-DNA complexes. *J Cell Biol* 195, 739–749.
- Reginato, G., Cannavo, E., and Cejka, P. (2017). Physiological protein blocks direct the Mre11–Rad50–Xrs2 and Sae2 nuclease complex to initiate DNA end resection. *Gene Dev* 31, 2325–2330.
- Roberts, J.A., and White, M.F. (2005). An Archaeal Endonuclease Displays Key Properties of Both Eukaryal XPF-ERCC1 and Mus81*. *J Biol Chem* 280, 5924–5928.

Roberts, J.A., Bell, S.D., and White, M.F. (2003). An archaeal XPF repair endonuclease dependent on a heterotrimeric PCNA. *Molecular Microbiology*.

Rondinelli, B., Gogola, E., Yücel, H., Duarte, A.A., Ven, M.V.D., Sluijs, R.V.D., Konstantinopoulos, P.A., Jonkers, J., Ceccaldi, R., Rottenberg, S., et al. (2017). EZH2 promotes degradation of stalled replication forks by recruiting MUS81 through histone H3 trimethylation. *Nat Cell Biol* 19, 1371–1378.

Roseaulin, L., Yamada, Y., Tsutsui, Y., Russell, P., Iwasaki, H., and Arcangioli, B. (2008). Mus81 is essential for sister chromatid recombination at broken replication forks. *Embo J* 27, 1378–1387.

Roth, D.B., and Wilson, J.H. (1985). Relative rates of homologous and nonhomologous recombination in transfected DNA.

Roumelioti, F., Sotiriou, S.K., Katsini, V., Chiourea, M., Halazonetis, T.D., and Gagos, S. (2016). Alternative lengthening of human telomeres is a conservative DNA replication process with features of break-induced replication. *Embo Rep* 17, 1731–1737.

Rouse, J., and Jackson, S.P. (2002). Lcd1p recruits Mec1p to DNA lesions in vitro and in vivo. *Mol Cell* 9, 857–869.

Rouzeau, S., Cordelières, F.P., Buhagiar-Labarchède, G., Hurbain, I., Onclercq-Delic, R., Gemble, S., Magnaghi-Jaulin, L., Jaulin, C., and Amor-Guérét, M. (2012). Bloom's Syndrome and PICH Helicases Cooperate with Topoisomerase II α in Centromere Disjunction before Anaphase. *Plos One* 7, e33905.

Rozenzhak, S., Mejía-Ramírez, E., Williams, J.S., Schaffer, L., Hammond, J.A., Head, S.R., and Russell, P. (2010). Rad3ATR decorates critical chromosomal domains with γ H2A to protect genome integrity during S-phase in fission yeast. *Plos Genet* 6, 1–17.

Runge, K.W., and Li, Y. (2018). A curious new role for MRN in *Schizosaccharomyces pombe* non-homologous end-joining. *Curr Genet* 64, 359–364.

Russell, P., and Nurse, P. (1986). *cdc25+* Functions as an Inducer in the Mitotic Control of Fission Yeast. *Cell*.

Saini, N., Ramakrishnan, S., Elango, R., Ayyar, S., Zhang, Y., Deem, A., Ira, G., Haber, J.E., Lobachev, K.S., and Malkova, A. (2013). Migrating bubble during break-induced replication drives conservative DNA synthesis. *Nature* 502, 389–392.

Sanders, S.L., Portoso, M., Mata, J., Bähler, J., Allshire, R.C., and Kouzarides, T. (2004). Methylation of Histone H4 Lysine 20 Controls Recruitment of Crb2 to Sites of DNA Damage Histone H4 Methylation and Checkpoint Control Results Fission Yeast H4-K20 Methylation Is Set9 Dependent. *Online* 119, 603–614.

Santos, T. de los, Loidl, J., Larkin, B., and Hollingsworth, N.M. (2001). A Role for MMS4 in the Processing of Recombination Intermediates During Meiosis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*.

- Santos, T. de los, Hunter, N., Lee, C., Larkin, B., Loidl, J., and Hollingsworth, N.M. (2003). The Mus81/Mms4 Endonuclease Acts Independently of Double-Holliday Junction Resolution to Promote a Distinct Subset of Crossovers During Meiosis in Budding Yeast. *Genetics*.
- Sartori, A.A., Lukas, C., Coates, J., Mistrik, M., Fu, S., Bartek, J., Baer, R., Lukas, J., and Jackson, S.P. (2007). Human CtIP promotes DNA end resection. *Nature* *450*, 509–514.
- Schellenberg, M.J., and Williams, R.S. (2011). DNA end processing by polynucleotide kinase/phosphatase. *Proc National Acad Sci* *108*, 20855–20856.
- Schiller, C.B., Lammens, K., Guerini, I., Coords, B., Feldmann, H., Schlauderer, F., Möckel, C., Schele, A., Strässer, K., Jackson, S.P., et al. (2012). Structure of Mre11-Nbs1 complex yields insights into ataxia-telangiectasia- like disease mutations and DNA damage signaling. *Nat Struct Mol Biol* *19*, 693–700.
- Sebesta, M., Urulangodi, M., Stefanovie, B., Szakal, B., Pacesa, M., Lisby, M., Brnzei, D., and Krejci, L. (2017). Esc2 promotes Mus81 complex-activity via its SUMO-like and DNA binding domains. *Nucleic Acids Res* *45*, 215–230.
- Sekelsky, J.J., McKim, K.S., Chin, G.M., and Hawley, R.S. (1995). The *Drosophila* Meiotic Recombination Gene *mei-7* Encodes a Homologue of the Yeast Excision Repair Protein Rad1. *Genetics*.
- Septenville, A.L.D., Duigou, S., Boubakri, H., and Michel, B. (2012). Replication Fork Reversal after Replication–Transcription Collision. *Plos Genet* *8*, e1002622.
- Sfeir, A., Kosiyatrakul, S.T., Hockemeyer, D., MacRae, S.L., Karlseder, J., Schildkraut, C.L., and Lange, T. de (2009). Mammalian Telomeres Resemble Fragile Sites and Require TRF1 for Efficient Replication. *Cell* *138*, 90–103.
- Shao, X., and Grishin, N.V. (2000). Common fold in helix–hairpin–helix proteins. *Nucleic Acids Res* *28*, 2643–2650.
- Shibata, A., Conrad, S., Birraux, J., Geuting, V., Barton, O., Ismail, A., Kakarougkas, A., Meek, K., Taucher-Scholz, G., Löbrich, M., et al. (2011). Factors determining DNA double-strand break repair pathway choice in G2 phase. *Embo J* *30*, 1079–1092.
- Shinohara, A., and Ogawa, T. (1998). Stimulation by Rad52 of yeast Rad51- mediated recombination. *391*, 0–4.
- Shinohara, A., Ogawa, H., and Ogawa, T. (1992). Rad51 protein involved in repair and recombination in *S. cerevisiae* is a RecA-like protein. *Cell* *69*, 457–470.
- Sipiczki, M. (2000). Where does fission yeast sit on the tree of life? *Genome Biology* *1*, 1–4.
- Sirbu, B.M., Couch, F.B., Feigerle, J.T., Bhaskara, S., Hiebert, S.W., and Cortez, D. (2011). Analysis of protein dynamics at active, stalled, and collapsed replication forks. *Gene Dev* *25*, 1320–1327.

Smith, G.R., Boddy, M.N., Shanahan, P., and Russell, P. (2003). Fission Yeast Mus81•Eme1 Holliday Junction Resolvase Is Required for Meiotic Crossing Over but Not for Gene Conversion. *Genetics*.

Spagnolo, L., Rivera-Calzada, A., Pearl, L.H., and Llorca, O. (2006). Three-Dimensional Structure of the Human DNA-PKcs/Ku70/Ku80 Complex Assembled on DNA and Its Implications for DNA DSB Repair. *Mol Cell* 22, 511–519.

Sugiyama, T., and 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 *. *J Biol Chem* 277, 31663–31672.

Svendsen, J.M., Smogorzewska, A., Sowa, M.E., O’Connell, B.C., Gygi, S.P., Elledge, S.J., and Harper, J.W. (2009). Mammalian BTBD12/SLX4 Assembles A Holliday Junction Resolvase and Is Required for DNA Repair. *Cell* 138, 63–77.

Swaffer, M.P., Jones, A.W., Flynn, H.R., Snijders, A.P., and Nurse, P. (2016). CDK Substrate Phosphorylation and Ordering the Cell Cycle. *Cell* 167, 1750-1761.e16.

Synnes, M., Nilssen, E.A., Boye, E., and Grallert, B. (2002). A novel chk1-dependent G1/M checkpoint in fission yeast. *J Cell Sci* 115, 3609–3618.

Szkal, B., and Branzei, D. (2013). Premature Cdk1/Cdc5/Mus81 pathway activation induces aberrant replication and deleterious crossover. *Embo J* 32, 1155–1167.

Talhaoui, I., Bernal, M., Mullen, J.R., Dorison, H., Palancade, B., Brill, S.J., and Mazón, G. (2018). Slx5-Slx8 ubiquitin ligase targets active pools of the Yen1 nuclease to limit crossover formation. *Nat Commun* 9, 1–14.

Taltec, B.L., Dutrillaux, B., Lachages, A.-M., Millot, G.A., Brison, O., and Debatisse, M. (2011). Molecular profiling of common fragile sites in human fibroblasts. *Nat Struct Mol Biol* 18, 1421–1423.

Tanaka, T., Yokoyama, M., Matsumoto, S., Fukatsu, R., You, Z., and Masai, H. (2010). Fission yeast Swi1-Swi3 complex facilitates DNA binding of Mrc1. *J Biol Chem* 285, 39609–39622.

Taylor, E.R., and McGowan, C.H. (2008). Cleavage mechanism of human Mus81–Eme1 acting on Holliday-junction structures. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*.

Técher, H., Koundrioukoff, S., Carignon, S., Wilhelm, T., Millot, G.A., Lopez, B.S., Brison, O., and Debatisse, M. (2016). Signaling from Mus81-Eme2-Dependent DNA Damage Elicited by Chk1 Deficiency Modulates Replication Fork Speed and Origin Usage. *Cell Reports* 14, 1114–1127.

Truong, L.N., Li, Y., Shi, L.Z., Hwang, P.Y.H., He, J., Wang, H., Razavian, N., Berns, M.W., and Wu, X. (2013). Microhomology-mediated End Joining and Homologous Recombination share the initial end resection step to repair DNA double-strand breaks in mammalian cells. *Proc National Acad Sci* 110, 7720–7725.

- Tsutsui, Y., Khasanov, F.K., Shinagawa, H., Iwasaki, H., and Bashkirov, V.I. (2001). Multiple Interactions Among the Components of the Recombinational DNA Repair System in *Schizosaccharomyces pombe*.
- Tvegård, T., Soltani, H., Skjølberg, H.C., Krohn, M., Nilssen, E.A., Kearsey, S.E., Grallert, B., and Boye, E. (2007). A novel checkpoint mechanism regulating the G1/S transition. *Gene Dev* 21, 649–654.
- Waizenegger, A., Urulangodi, M., Lehmann, C.P., Reyes, T.A.C., Saugar, I., Tercero, J.A., Szakal, B., and Branzei, D. (2020). Mus81-Mms4 endonuclease is an Esc2-STUbL-Cullin8 mitotic substrate impacting on genome integrity. *Nat Commun* 11, 1–14.
- 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., et al. (2013). The Interaction of CtIP and Nbs1 Connects CDK and ATM to Regulate HR-Mediated Double-Strand Break Repair. *Plos Genet* 9, e1003277.
- Wang, H., Li, Y., Truong, L.N., Shi, L.Z., Hwang, P.Y.-H., He, J., Do, J., Cho, M.J., Li, H., Negrete, A., et al. (2014). CtIP Maintains Stability at Common Fragile Sites and Inverted Repeats by End Resection-Independent Endonuclease Activity. *Mol Cell* 54, 1012–1021.
- Wang, W., Daley, J.M., Kwon, Y., Xue, X., Krasner, D.S., Miller, A.S., Nguyen, K.A., Williamson, E.A., Shim, E.Y., Lee, S.E., et al. (2018). A DNA nick at Ku-blocked double-strand break ends serves as an entry site for exonuclease 1 (Exo1) or Sgs1–Dna2 in long-range DNA end resection. *J Biol Chem* 293, 17061–17069.
- Weinert, T.A., and Hartwell, L.H. (1988). The RAD9 gene controls the cell cycle response to DNA damage in *saccharomyces cerevisiae*. *Science* 241, 317–322.
- Weinstock, D.M., Brunet, E., and Jasin, M. (2007). Formation of NHEJ-derived reciprocal chromosomal translocations does not require Ku70. *Nat Cell Biol* 9, 978–981.
- Wietmarschen, N. van, Sridharan, S., Nathan, W.J., Tubbs, A., Chan, E.M., Callen, E., Wu, W., Belinky, F., Tripathi, V., Wong, N., et al. (2020). Repeat expansions confer WRN dependence in microsatellite-unstable cancers. *Nature* 586, 292–298.
- Wilhelm, T., Magdalou, I., Barascu, A., Técher, H., Debatisse, M., and Lopez, B.S. (2014). Spontaneous slow replication fork progression elicits mitosis alterations in homologous recombination-deficient mammalian cells. *Proc National Acad Sci* 111, 763–768.
- Williams, R.S., Moncalian, G., Williams, J.S., Yamada, Y., Limbo, O., Shin, D.S., Groocock, L.M., Cahill, D., Hitomi, C., Guenther, G., et al. (2008). Mre11 Dimers Coordinate DNA End Bridging and Nuclease Processing in Double-Strand-Break Repair. *Cell* 135, 97–109.
- 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., et al. (2009). Nbs1 Flexibly Tethers Ctp1 and Mre11-Rad50 to Coordinate DNA Double-Strand Break Processing and Repair. *Cell* 139, 87–99.

- Wilson, M.A., Kwon, Y., Xu, Y., Chung, W.-H., Chi, P., Niu, H., Mayle, R., Chen, X., Malkova, A., Sung, P., et al. (2013). Pif1 helicase and Pol δ promote recombination-coupled DNA synthesis via bubble migration. *Nature* *502*, 393–396.
- Wood, E., and Nurse, P. (2015). Sizing up to Divide: Mitotic Cell-Size Control in Fission Yeast. *Annu Rev Cell Dev Bi* *31*, 11–29.
- Wood, V., Gwilliam, R., Rajandream, M.A., Lyne, M., Lyne, R., Stewart, A., Sgouros, J., Peat, N., Hayles, J., Baker, S., et al. (2002). The genome sequence of *Schizosaccharomyces pombe*. *Nature* *415*, 871–880.
- Woodward, A.M., Göhler, T., Luciani, M.G., Oehlmann, M., Ge, X., Gartner, A., Jackson, D.A., and Blow, J.J. (2006). Excess Mcm2–7 license dormant origins of replication that can be used under conditions of replicative stress. *J Cell Biology* *173*, 673–683.
- Wu, L., and Hickson, I.O. (2003). The Bloom’s syndrome helicase suppresses crossing over during homologous recombination. *Nature* *426*, 870–874.
- Wu, L., Bachrati, C.Z., Ou, J., Xu, C., Yin, J., Chang, M., Wang, W., Li, L., Brown, G.W., and Hickson, I.D. (2006). BLAP75/RMI1 promotes the BLM-dependent dissolution of homologous recombination intermediates. *P Natl Acad Sci Usa* *103*, 4068–4073.
- Wyatt, H.D.M., Sarbajna, S., Matos, J., and West, S.C. (2013). Coordinated Actions of SLX1-SLX4 and MUS81-EME1 for Holliday Junction Resolution in Human Cells. *Mol Cell* *52*, 234–247.
- Wyatt, H.D.M., Laister, R.C., Martin, S.R., Arrowsmith, C.H., and West, S.C. (2017). The SMX DNA Repair Tri-nuclease. *Mol Cell* *65*, 848-860.e11.
- Xiao, W., Chow, B.L., and Milo, C.N. (1998). Mms4, a putative transcriptional (co)activator, protects *Saccharomyces cerevisiae* cells from endogenous and environmental DNA damage. *Mol Gen Genetics Mgg* *257*, 614–623.
- Xie, A., Kwok, A., and Scully, R. (2009). Role of mammalian Mre11 in classical and alternative non-homologous end joining. *Nat Struct Mol Biol* *16*, 814–818.
- Xu, Y.J., Davenport, M., and Kelly, T.J. (2006). Two-stage mechanism for activation of the DNA replication checkpoint kinase Cds1 in fission yeast. *Gene Dev* *20*, 990–1003.
- Yan, C.T., Boboila, C., Souza, E.K., Franco, S., Hickernell, T.R., Murphy, M., Gumaste, S., Geyer, M., Zarrin, A.A., Manis, J.P., et al. (2007). IgH class switching and translocations use a robust non-classical end-joining pathway. *Nature* *449*, 478–482.
- Yang, J., Bachrati, C.Z., Ou, J., Hickson, I.D., and Brown, G.W. (2010). Human Topoisomerase III α Is a Single-stranded DNA Decatenase That Is Stimulated by BLM and RMI1*. *J Biol Chem* *285*, 21426–21436.
- Ying, S., Minocherhomji, S., Chan, K.L., Palmai-Pallag, T., Chu, W.K., Wass, T., Mankouri, H.W., Liu, Y., and Hickson, I.D. (2013). MUS81 promotes common fragile site expression. *Nat Cell Biol* *15*, 1001–1007.

- You, Z., Chahwan, C., Bailis, J., Hunter, T., and Russell, P. (2005). ATM Activation and Its Recruitment to Damaged DNA Require Binding to the C Terminus of Nbs1. *Mol Cell Biol* 25, 5363–5379.
- Young, S.J., Sebald, M., Punatar, R.S., Larin, M., Masino, L., Rodrigo-Brenni, M.C., Liang, C.C., and West, S.C. (2020). MutS β Stimulates Holliday Junction Resolution by the SMX Complex. *Cell Reports* 33, 108289.
- Yue, M., Zeng, L., Singh, A., and Xu, Y. (2014). Rad4 mainly functions in Chk1-mediated DNA damage checkpoint pathway as a scaffold protein in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Plos One* 9, e92936.
- Zakharyevich, K., Tang, S., Ma, Y., and Hunter, N. (2012). Delineation of joint molecule resolution pathways in meiosis identifies a crossover-specific resolvase. *Cell* 149, 334–347.
- Zellweger, R., Dalcher, D., Mutreja, K., Berti, M., Schmid, J.A., Herrador, R., Vindigni, A., and Lopes, M. (2015). Rad51-mediated replication fork reversal is a global response to genotoxic treatments in human cells. *J Cell Biology* 208, 563–579.
- Zhang, X., and Paull, T.T. (2005). The Mre11/Rad50/Xrs2 complex and non-homologous end-joining of incompatible ends in *S. cerevisiae*. *Dna Repair* 4, 1281–1294.
- Zhang, Y., and Jasin, M. (2011). An essential role for CtIP in chromosomal translocation formation through an alternative end-joining pathway. *Nat Struct Mol Biol* 18, 80–84.
- 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., et al. (2015). Promotion of BRCA2-Dependent Homologous Recombination by DSS1 via RPA Targeting and DNA Mimicry. *Mol Cell* 59, 176–187.
- Zhou, Z., He, M., Shah, A.A., and Wan, Y. (2016). Insights into APC/C: from cellular function to diseases and therapeutics. *Cell Div* 11, 9.
- Zhu, Z., Chung, W., Shim, E.Y., Lee, S.E., and Ira, G. (2008). Sgs1 Helicase and Two Nucleases Dna2 and Exo1 Resect DNA Double-Strand Break Ends. *Cell* 134, 981–994.
- Zou, L., and Elledge, S.J. (2003). Sensing DNA damage through ATRIP recognition of RPA-ssDNA complexes. *Science* 300, 1542–1548.
- Zou, L., Liu, D., and Elledge, S.J. (2003). Replication protein A-mediated recruitment and activation of Rad17 complexes. *Proc National Acad Sci* 100, 13827–13832.