

ASSEMBLAGE DE LA CHROMATINE PAR CAF-1 AU COURS DE LA RECOMBINAISON HOMOLOGUE : UN NOUVEAU DEGRÉ DE RÉGULATION CHEZ LA LEVURE *S. POMBE*

1. INTRODUCTION

La réplication de l'ADN est un processus fondamental pour toute forme de vie. Afin de maintenir la stabilité du génome et la transmission de l'information épi-génétique, la réplication de l'ADN doit être coordonné avec le désassemblage/assemblage de la chromatine, le maintien de marques épi-génétiques et les mécanismes de réparation de l'ADN. L'assemblage de la chromatine associée à la réplication de l'ADN est un processus vital qui permet l'enroulement correct de l'ADN néo-synthétisé autour des nucléosomes et la transmission des marques d'histones. Le facteur d'assemblage de la chromatine CAF-1 (pour *Chromatin Assembly Factor 1*) est un chaperon des histones H3-H4 et qui est conservé au cours de l'évolution chez les eucaryotes. CAF-1 joue un rôle important dans le dépôt des histones sur l'ADN néo-synthétisé au cours de la réplication de l'ADN. (Kaufman, Kobayashi et al., 1995). CAF-1 est composé de trois sous-unités, chacune capable de se lier aux histones H3-H4 : la p150 chez l'homme (Pcfl chez la levure *S. pombe*), p60 (SpPcf2) et p48 (SpPcf3).

L'efficacité de la réplication des chromosomes peut être défiée par divers obstacles qui interfèrent avec la progression des fourches de réplication. Les cellules doivent donc également coordonner la synthèse d'ADN avec les voies de surveillance de l'intégrité du génome (checkpoints) et les voies de recombinaison homologue, afin d'assurer le redémarrage des fourches entravées dans leur progression. Des défauts dans la coordination de ces mécanismes peuvent entraîner une instabilité génétique et épi-génétique accrue associée à une prédisposition tumorale.

1.1 La recombinaison homologue (RH)

La RH est un mécanisme ubiquitaire de réparation de l'ADN. La RH est aussi un mécanisme qui assiste la réplication des chromosomes de par sa capacité à réparer et réactiver des fourches de réplication. Le mécanisme fondamental de la RH est de promouvoir un échange de brin d'ADN entre molécules homologues, ce qui résulte en un échange d'information génétique (Paques and Haber 1999; Mimitou and Symington 2009). La RH est nécessaire à la

réparation des cassures double-brin et des brèches simple-brin mais a aussi de multiples fonctions chez les eucaryotes : le maintien des télomères, la diversification des chaînes d'immunoglobuline, promouvoir la diversité génétique en méiose et la ségrégation des chromosomes lors de la méiose.

La RH est aussi considéré comme une source d'instabilité génétique. En effet, de par sa capacité à recombiner des séquences répétées dispersées dans le génome, la RH peut conduire à des réarrangements chromosomiques (Lambert and Carr 2005; Aguilera and Gomez-Gonzalez 2008; Lambert, Mizuno et al. 2010; Simmons, Carvalho et al. 2012). La RH doit donc être finement régulée afin d'assurer une réparation efficace de l'ADN et une réplication robuste des chromosomes tout en limitant la formation de réarrangements chromosomiques délétères pour la survie des cellules.

Au cours de la réparation des cassures double brin, la RH est initiée par une dégradation 5'-3' des cassures double-brin qui conduit à une extrémité simple-brin 3' sortante recouverte par la protéine RPA (pour *Replication Protein A*), la protéine de liaison de l'ADN simple brin chez les eucaryotes (Alani, Thresher et al. 1992) (Figure n. 1). La protéine Rad52, le principal médiateur de la RH, permet de déplacer RPA de l'ADN simple-brin et de charger la recombinase Rad51 qui forme alors un filament nucléoprotéique sur l'ADN simple-brin. Le nucléo-filament Rad51 est alors compétent pour la recherche d'homologie. Rad51 promeut l'envahissement de l'ADN simple-brin au sein d'un duplex d'ADN homologue, l'appariement de l'ADN simple-brin envahissant avec le brin complémentaire et le déplacement du brin non complémentaire. L'intermédiaire à trois brins ainsi formé est appelé boucle de déplacement (D-loop pour *Displacement loop*) (New, Sugiyama et al. 1998; Shinohara, Shinohara et al. 1998). L'extrémité 3' envahissante est alors étendue par synthèse d'ADN en utilisant le brin complémentaire du duplex homologue comme matrice (Figure n.1).

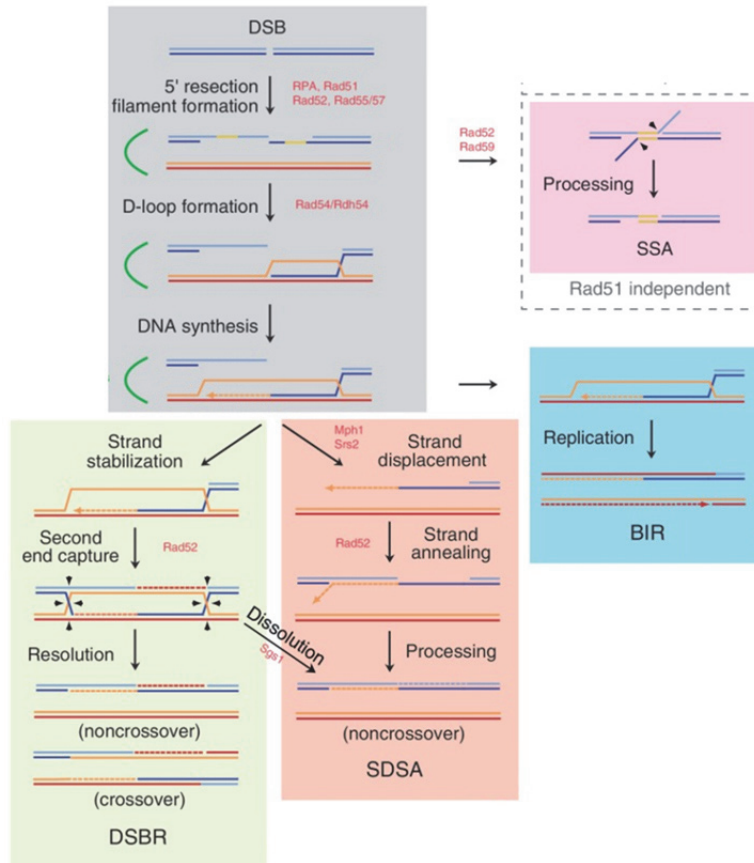


Figure n. 1: Mécanisme de réparation des CDB par recombinaison homologue. Voir texte pour des explications détaillées.

À partir de la formation de la D-loop, plusieurs modèles de recombinaison ont été proposés afin de rendre compte de la nature des échanges génétiques observés au cours de la recombinaison mitotique et méiotique:

- Dans le modèle **DSBR** (pour *Double Strand Break Repair*), la seconde extrémité double brin de la cassure est capturée (Figure n. 1 panneau de gauche). Cette capture résulte en la formation d'une double jonction de Holliday. Ces jonctions sont résolues soit par clivage, donnant lieu à des produits de recombinaison associés ou non à des crossing-over (COs, échange réciproque d'information génétique) soit par dissolution, donnant lieu uniquement à des produits de recombinaison non associés à des COs (Holliday 1964; Boddy, Gaillard et al. 2001; Osman, Dixon et al. 2003; Singh, Ahn et al. 2009; Elborough and West 1990; Hyde, Davies et al. 1994)
- Dans le modèle **SDSA** (pour *Synthesis Dependent Strand Annealing*), le brin envahissant étendu par polymérisation est déplacé de la D-loop et s'apparie avec la second extrémité de la cassure double brin. Ce mécanisme conduit uniquement à la formation de produits de

recombinaison sans COs et sans altération de l'information génétique portée par la molécule d'ADN donneuse (Figure n.1 panneau du milieu) (Nassif, Penney et al. 1994; Mimitou and Symington 2009).

- Dans le modèle **BIR** (pour *Break Induced Replication*), la deuxième extrémité double brin n'est jamais capturée. Ce modèle est mécanisme alternatif de réparation des cassures double-brin, lorsqu'une extrémité ne présente pas d'homologie avec la molécule d'ADN donneuse (Figure n. 1 en bas à droite du panneau). Le BIR a la particularité d'induire une synthèse d'ADN efficace sur des centaines de kilobases, et favoriserait l'assemblage d'un réplisome unique. Le BIR est donc proposé comme un mécanisme permettant de synthétiser un bras de chromosome entier et de réparer des fourches de réplication cassées (Bosco and Haber 1998; Lydeard, Jain et al. 2007; Lydeard, Lipkin-Moore et al. 2010).

- dans le modèle **SSA** (pour *Single Strand Annealing*), la cassure double brin survient entre deux répétitions directes. Au cours de la dégradation des extrémités, l'homologie entre les séquences répétées permet l'appariement des ADN simple brin. Les extrémités 3' sortantes non appariées sont alors clivées : le mécanisme SSA conduit à la délétion de la région contenue entre les répétitions et la conservation d'une seule répétition (Figure n. 1 en haut à droite du panneau). Le mécanisme du SSA ne nécessite pas une étape d'invasion de brin et est donc génétiquement indépendant de Rad51 (McDonald and Rothstein 1994; Sugawara, Ira et al. 2000).

1.2 Assemblage de la chromatine lors de la réplication de l'ADN

La structure du nucléosome est constituée d'un tétramère d'histone H3-H4 ((H3-H4)₂) flanqué de chaque côté par deux dimères H2A-H2B. Au cours de la réplication de l'ADN, les nucléosomes parentaux sont transitoirement désassemblés devant la fourche de réplication et transférés sur l'ADN néo-synthétisé derrière la fourche. Le transfert des nucléosomes parentaux se produit en même temps que le dépôt des histones nouvellement synthétisées (assemblage de novo) afin de restaurer la densité correcte des nucléosomes le long des chromatides sœurs (Figure n. 2).

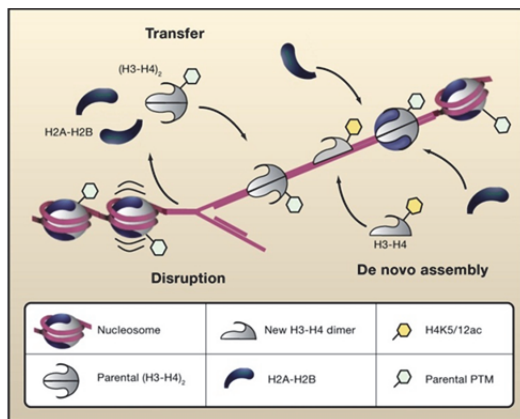


Figure n. 2: Métabolisme des nucléosomes au cours de la réplication de l'ADN. Les nucléosomes parentaux sont désassemblés devant la fourche et sont transférés sur les brins néo-synthétisés. Ce mécanisme de ségrégation des nucléosomes fonctionne avec l'assemblage des nucléosomes de novo pour reproduire une densité correcte de nucléosomes sur les deux brins filles (Groth, Corpet et al., 2007).

L'assemblage des nucléosomes sur l'ADN néo-synthétisé se fait via l'action concertée de plusieurs chaperons d'histones H3-H4 : CAF-1, Asf1 (pour *Facteur Anti Silencing 1*) et Rtt106. Asf1 et CAF-1 sont connus pour interagir avec les composants de la machinerie de réplication (Li, Zhou et al. 2008). Par contre, le mode de recrutement de Rtt106 à la fourche de réplication reste inconnu. Asf1 ne dépose pas directement les histones sur l'ADN, tout du moins *in vitro*, mais Asf1 potentialise la capacité de CAF-1 à assembler les nucléosomes au cours de la réplication *in vitro* (Tyler, Collins et al, 2001; Mello, Sillje et al 2002). L'interaction entre le complexe CAF-1 et Asf1 permet le transfert du dimère H3-H4 de Asf1 vers CAF-1. Au cours de la réplication, CAF-1 assemble préférentiellement les dimères H3-H4 nouvellement synthétisés à la fois sur les brins avancés et retardés. Le complexe CAF-1 est recruté dans les foyers de réplication via l'interaction entre la PIP-box de la grande sous unité p150 et le facteur de processivité PCNA (Krawitz, Kama et al 2002;. Shibahara et Stillman 1999; Moggs, Grandi et al. 2000; Rolef Ben-Shahar, Castillo et al 2009). Les histones nouvellement synthétisées portent des modifications post-traductionnelles spécifiques dont l'acétylation de la lysine K56 de l'histone H3 (H3K56Ac) chez les levures. C'est l'acétyl transférase Rtt109 qui promeut l'acétylation la lysine K56 et qui interagit avec Asf1 (Jackson, Shires et al, 1976;. Sobel, Cook et al, 1995;. Verreault, Kaufman et al, 1996;. Verreault, Kaufman et al, 1998;. Su, Hu et al 2012).

Une autre fonction du complexe CAF-1 est le maintien de l'hétérochromatine (Quivy, Roche et al 2004;. Quivy, Gérard et al 2008;. Dohke, Myazaki et al. 2008). La sous unité p150 est nécessaire pour faciliter le passage de la fourche de réplication dans des régions d'hétérochromatine : la p150 permet le déplacement de la protéine HP1 devant la fourche et facilite son transfert derrière la fourche, notamment sur les histones portant la marque triméthylation de la lysine 9 de l'histone H3 (H3K9Me3) (Bannister, Zegerman et al 2001; Quivy, Roche et al 2004; Quivy, Gérard et al 2008). Ce mécanisme de transfert de HP1

pourrait assurer le maintien de la structure de l'hétérochromatine et donc la mémoire de l'état de la chromatine (Quivy, Roche et al 2004; Quivy, Gérard et al 2008). La perte d'interaction entre la p150 et HP1 résulte en un défaut de progression de la phase S sans activation des mécanismes de surveillance de l'intégrité du génome, suggérant que l'interaction entre HP1 et l'ADN se comporterait comme une barrière de réplication (Quivy, Roche et al. 2004).

Chez la levure *S. pombe*, l'absence de CAF-1 conduit aussi à des défauts dans le maintien de l'hétérochromatine centromérique, accompagné d'une diminution du recrutement de la protéine Swi6 (l'homologue de HP1) (Dohke, Myazaki et al. 2008). En effet, Dohke et ses collègues ont proposé un modèle basé sur l'interaction entre CAF-1 et Swi6 et dans lequel, la capacité de CAF-1 à recruter Swi6 derrière la fourche favoriserait le maintien de l'hétérochromatine.

1.3 L'assemblage de la chromatine aux fourches de réplication est essentiel pour maintenir la stabilité du génome

CAF-1 joue un rôle important dans le maintien de la stabilité du génome. Par exemple, un défaut de CAF-1 cause des altérations dans l'organisation de l'hétérochromatine chez des cellules embryonnaires pluripotentes (Houlard, Berlivet et al. 2006), conduisant à un arrêt du développement. Dans des lignées cellulaires humaines, CAF-1 est également requis pour la progression efficace de la phase S (Hoek et Stillman 2003). De plus, chez la levure, l'inactivation de CAF-1 ou de facteur d'assemblage des nucléosomes au cours de la réplication (RCAF) augmente le taux de différents types de réarrangements chromosomiques, y compris des translocations et l'addition de novo de télomères (Myung, Pennanéach et al. 2003).

Chez les plantes, CAF-1 est également important pour le maintien de la stabilité du génome en supprimant des événements de recombinaison illégitime. Chez *Arabidopsis thaliana*, la délétion de la large sous-unité du complexe CAF-1 augmente la fréquence de recombinaison homologue somatique d'environ 40 fois (Endo, Ishikawa et al. 2006). En outre, la fréquence de l'intégration des T-DNA est également augmentée en l'absence de CAF-1. L'intégration des T-DNA se fait principalement par un mécanisme indépendant de la RH tel que le NHEJ. L'augmentation du niveau de la recombinaison illégitime est probablement due à une augmentation générale du niveau de l'instabilité du génome, plutôt que liée à une augmentation de l'expression des gènes de la voie du NHEJ (Endo, Ishikawa et al. 2006).

Un défaut dans l'assemblage des nucléosomes au cours de la réplication conduit à une instabilité des fourches de réplication active qui nécessite en retour un besoin de réparation des fourches par la recombinaison homologe. Des perturbations de la réplication de l'ADN peuvent induire l'activation des voies de surveillance de l'intégrité du génome qui ont pour fonction d'assurer la stabilité des fourches de réplication altérées et de ralentir la progression du cycle cellulaire afin de donner le temps de réparer ou tolérer les dommages induits (Lopes, Cotta-Ramusino et al. 2001). Lorsque l'assemblage des nucléosomes couplé à la réplication de l'ADN est défectueux, l'intégrité des fourches actives est menacée ce qui active les voies de surveillance et l'accumulation de structures d'ADN recombinogènes. De plus, l'absence de la marque d'histone H3K56Ac ou l'inactivation simultanée du complexe CAF-1 et Rtt106 affecte l'intégrité des fourches actives, ce qui conduit à une augmentation de la recombinaison homologe (Clemente-Ruiz, Gonzalez-Prieto et al. 2011).

1.4 La restauration de la chromatine lors de la réparation de l'ADN

Au cours de la réparation des dommages de l'ADN, il est nécessaire de restaurer la structure chromatinienne initiale. CAF-1 et Asf1 sont impliqués dans ce processus, jouant ainsi un rôle important dans le maintien de la stabilité épi-génétique (Green et Almouzni 2003; Ishii, Koshiyama et al. 2008). Par exemple, CAF-1 est impliqué dans la restauration de la chromatine lors de la réparation de dommages par excision de nucléotides (NER), lors de la réparation des mésappariements (MMR) et au cours de la réparation des cassures double-brin (Gaillard, Martini et al, 1996;. Vert et Almouzni 2003; Lewis, Karthikeyan et al. 2005; Schopf, Bregenhorn et al 2012;. Baldeyron, Soria et al 2011).

Des travaux récents établissent que CAF-1 joue aussi un rôle précoce au cours de la réparation des dommages, au-delà de son rôle dans la restauration post-réparation de l'état de la chromatine (Schopf, Bregenhorn et al 2012;.. Baldeyron, Soria et al 2011). Une hypothèse intéressante est que CAF-1 agirait d'abord dans le recrutement ou dans la régulation des enzymes de réparation sur les sites des lésions. Après la réparation, la fonction de CAF-1 pourrait basculer vers un mode chaperon d'histones pour promouvoir le dépôt des nucléosomes sur la zone d'ADN réparée (Ishii, Koshiyama et al 2008; Baldeyron, Soria et al 2011; Schopf, Bregenhorn et al 2012).

La restauration de la chromatine post-réparatrice par CAF-1 et Asf1 est nécessaire pour désactiver les mécanismes de surveillance et autoriser la reprise du cycle cellulaire,

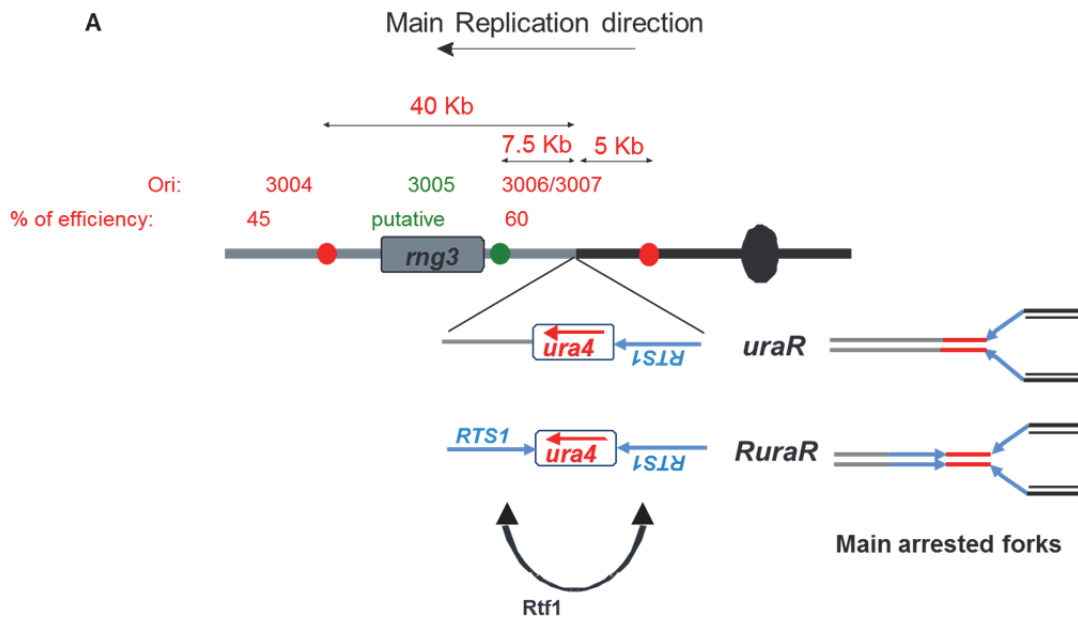
notamment lors de la réparation des cassures double brin. En effet, le double mutant *asf1-d cac1-d* est incapable de reprendre la progression dans le cycle cellulaire après réparation d'une cassure double-brin, alors que chacun des simples mutants ne présente pas de phénotypes (Kim et Haber 2009). Il a été montré que c'est la présence de la marque d'histone H3K56Ac sur la zone d'ADN réparé qui est nécessaire pour désactiver les mécanismes de surveillance (Masumoto, Hawke et al, 2005; Collins, Miller et al 2007; Driscoll, Hudson et al 2007; Han, Zhou et al 2007; Tsubota, Berndsen et al 2007; Wurtele, Kaiser et al 2012). Les mécanismes par lesquels la marque H3K56Ac, sur les nucléosomes déposés après réparation, contribue à l'inactivation des voies de surveillance restent inconnus (Chen, Carson et al. 2008).

2. OBJECTIFS

Les chaperons d'histones, tels que CAF-1 et Asf1, semblent avoir une influence significative sur les voies de recombinaison homologue. D'une part, des défauts d'assemblage de la chromatine couplé à la réplication de l'ADN entraînent une instabilité du génome, en particulier aux fourches de réplication, créant ainsi un besoin de réactivation ou réparation des fourches par la recombinaison homologue. Ceci est susceptible d'entraîner un phénotype hyper-rec. En revanche, l'analyse de la réparation de lésions spécifiques, telles que les cassures double-brin, révèle un rôle potentiel de CAF-1 dans la régulation de la recombinaison homologue.

Les objectifs de mon projet de thèse étaient d'étudier le rôle de CAF-1 dans la régulation de la recombinaison homologue au cours de la réplication de l'ADN, chez la levure *Schizosaccharomyces pombe*. En plus des essais de recombinaison classiques disponibles chez la levure *S. pombe*, J'ai utilisé des barrières de réplication conditionnelles développées au laboratoire (Lambert, Watson et al. 2005). Ces essais génétiques permettent d'induire le blocage d'une fourche de réplication unique à un locus spécifique (figure n.3A). La barrière de réplication utilisée est médiée par une séquence nucléique, appelée *RTS1* (pour *Replication termination Site 1*), sur laquelle se forme un complexe protéique dépendant de la protéine Rtf1. La barrière de réplication *RTS1* (*RTS1*-RFB) a été introduite au locus *ura4*, à une distance de 5 Kb d'une origine de réplication forte (*ori 3006/7*), de façon à bloquer les fourches progressant de l'origine 3006/7 vers le télomère. L'activité de la barrière *RTS1*-RFB est régulée en contrôlant l'activité transcriptionnelle du gène *rtf1*⁺, placé sous le contrôle du promoteur réprimé par la thiamine, *nmt41*. En présence de thiamine dans le milieu de culture,

la protéine Rtf1 n'est pas exprimée et la barrière *RTS1*-RFB n'est pas active (définie comme la condition « OFF », Figure n.3B, C). En absence de thiamine dans le milieu de culture, la protéine Rtf1 est exprimée, et la barrière *RTS1*-RFB est active (définie comme la condition « ON »). En analysant les intermédiaires de réplication par gel d'ADN bidimensionnel (2-DGE), il est estimée qu'environ 95% des fourches de réplication voyageant de l'origine ori 3006/7 vers le télomère sont bloquées au locus *ura4*.



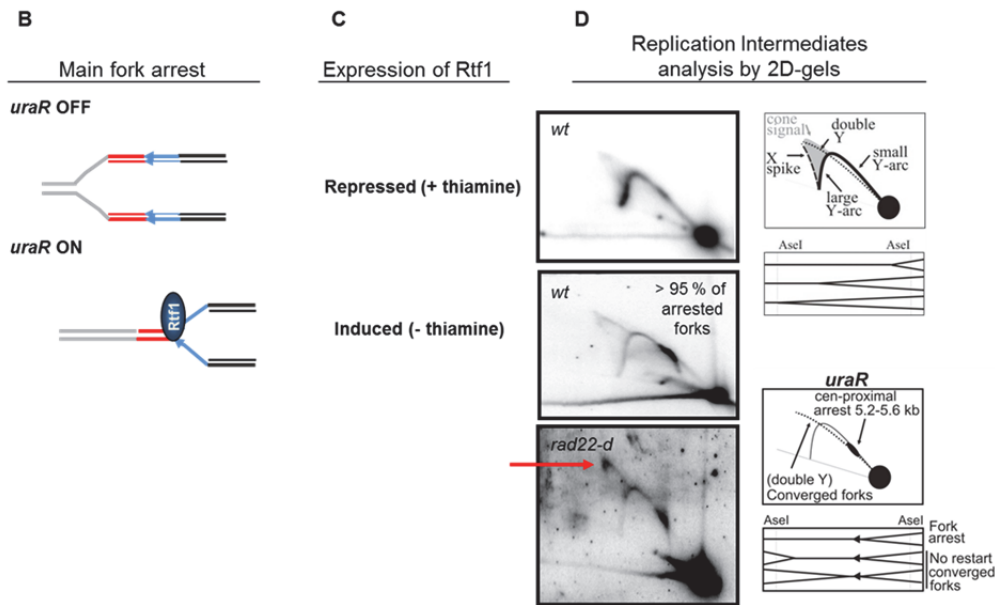


Figure n. 3: La barrière de réplication *RTSI*-RFB. A) Les flèches bleues indiquent la barrière *RTSI*-RFB et sa polarité. Les cercles rouges, verts et noirs indiquent les origines de réplication confirmées et putatives et le centromère, respectivement. Les régions télomériques et centromériques sont représentées en gris et en noir, respectivement. Le principal sens de réplication du locus *ura4* est indiqué sur la figure (Lambert, Mizuno et al 2010.). La séquence *RTSI*-RFB a été introduite soit du côté centromérique du gène *ura4*, pour créer le locus *uraR*, soit de part et d'autre du locus *ura4*, en répétition inverse pour créer le locus *RuraR*. B). Représentation des fourches de réplication pour le substrat *uraR* en condition « OFF » et « ON ». C) Statut de l'expression de la protéine Rtf1. D) Analyse des intermédiaires de réplication par gel d'ADN bidimensionnel. Les panneaux de gauches donnent un schéma de la structure des intermédiaires de réplication au sein du fragment de restriction AseI. Dans le mutant *rad22-d*, la flèche rouge indique l'accumulation de signaux de terminaison de réplication, montrant qu'en absence de recombinaison homologue, la barrière *RTSI*-RFB se comporte comme un point chaud de terminaison de la réplication.

Une seconde construction (*RuraR*, Figure n.3) a été générée : deux séquences *RTSI* ont été introduites de part et d'autre du gène *ura4*, en répétition inverse. Des études précédentes ont montré que les enzymes de la recombinaison homologue sont recrutés sur la barrière *RTSI*-RFB et que celle-ci se comporte comme un point chaud de recombinaison et de réarrangements chromosomiques. Il est proposé que la réactivation de la fourche bloquée sur la barrière *RTSI*-RFB soit initiée par l'extrusion des brins naissants sur lesquels les protéines de la recombinaison comme Rad52 et Rad51 sont recrutées. Après élimination de la barrière protéique, la fourche peut être redémarrée sur la matrice initiale. Dans environ 2-3 % des cellules, les brins naissants peuvent s'apparier avec la séquence *RTSI* opposée et initient une synthèse d'ADN sur une matrice discontinue (dans la construction *RuraR*). Ce changement de matrice des brins naissants conduit à la formation de molécules jointes: des structures de D-loop et des structures contenant des jonctions de Holliday formées entre les séquences *RTSI* (Une figure serait bienvenue !). La résolution des jonctions de Holliday conduit à la

formation de réarrangements : soit des iso-chromosomes acentriques et dicentriques, soit le changement d'orientation du marqueur *ura4*.

Le substrat *RuraR* permet donc d'analyser des événements de recombinaison induits par des blocages de fourches au niveau moléculaire : la visualisation de molécules jointes et le produit de leur résolution.

1. RÉSULTATS

1. Caractérisation des souches déficientes pour CAF-1

Le Dr Francesconi (UMR3348, Institut Curie) a créé trois souches portant une délétion d'une des trois sous unités de CAF-1: *pcf1-d* (p150 humaine), *pcf2-d* (p60 humaine) ou *pcf3-d* (p48 humaine). Ces trois souches sont viables, montrant que CAF-1 n'est pas un chaperon d'histones essentiel chez la levure *S. pombe*, contrairement au chaperon Asf1 (Dohke, Miyazaki et al 2008; Tanae, Horiuchi et al 2012).

Il est apparu que les souches *pcf1-d*, *pcf2-d* et *pcf3-d* ont un temps de génération similaire à la souche de référence (wt) en milieu riche (YE) et en milieu minimum contenant du glutamate comme source d'azote (EMM-Glu). Par contre, les trois souches sont incapables de croître dans un milieu minimum contenant du NH₄Cl comme source d'azote. L'absence de CAF-1 rend donc les cellules sensibles à la source d'azote. Cependant, j'ai été surprise de constater que la souche *pcf1-d pcf2-d pcf3-d* (portant la délétion des trois sous unités), était capable de pousser sur milieu EMM-NH₄Cl. Il semble donc que c'est le dysfonctionnement de CAF-1, plutôt que sa perte de fonction, qui rend les souches sensibles à la source d'azote.

Les souches *pcf1-d*, *pcf2-d* et *pcf3-d* ne présentent pas de sensibilité accrue aux agents génotoxiques, mais plutôt une résistance accrue au MMS, par rapport à la souche de référence. Par conséquent, CAF-1 ne semble pas avoir de rôle majeur dans la réponse aux dommages de l'ADN.

2. CAF-1 stimule la recombinaison ectopique mais pas la recombinaison allélique

Recombinaison allélique

Afin d'étudier la contribution de CAF-1 aux mécanismes de la recombinaison homologe, j'ai analysé l'impact de défauts de CAF-1 sur la recombinaison allélique (recombinaison entre

chromatides-sœurs et chromosomes homologues) et sur la recombinaison ectopique (recombinaison entre séquences répétées dispersées).

En ce qui concerne la recombinaison entre chromosomes homologues (Hartsuiker, Vaessen et al. 2001), des souches inactivées pour *pcf1*, *pcf2* ou *pcf3* ont montré un taux de crossing-over entre chromosomes homologues et un taux de perte de chromosomes, semblables à ceux de la souche de référence (Figure n. 4A). De plus, les souches inactivées pour *pcf1*, *pcf2* ou *pcf3* présentent un taux de recombinaison entre chromatides sœurs similaire à celui de la souche de référence, quel que soit le type de recombinant analysés (conversion génique ou délétion) et les conditions expérimentales (avec ou sans traitement au CPT) (Figure n. 4B, C). Ainsi, j'ai conclu que CAF-1 n'est pas nécessaire à la recombinaison entre chromatides sœurs chez *S. pombe*, même en réponse à des perturbations de la réplication. Ces données sont cohérentes avec le fait que les défauts de CAF-1 ne conduisent pas à une sensibilité accrue aux agents endommageant de l'ADN, ce qui suggère que la réparation par recombinaison homologue entre chromatides sœurs reste fonctionnelle en l'absence de CAF-1. Cette hypothèse a été confirmée en utilisant un essai génétique permettant d'analyser la réparation d'une fourche de réplication cassée avec la chromatide sœur (Roseaulin, Yamada et al. 2008).

A

| Strains | Rate of recombination event/cell/division $\times 10^{-4}$ | Fold increase over wt | Rate of chromosome loss event/cell/division $\times 10^{-5}$ | Fold increase over wt |
|---------------|--|-----------------------|--|-----------------------|
| wt | 1.17 (0.92 – 1.76) | -- | 4.86 (3.56 – 5.87) | -- |
| <i>pcf1-d</i> | 1.53 (1.03 – 1.63) | 1.3 | 8.23 (4.71 – 16.10) | 1.7 |
| <i>pcf2-d</i> | 1.39 (1.12 – 2.68) | 1.2 | 4.46 (2.98 – 6.23) | 0.9 |
| <i>pcf3-d</i> | 1.67 (1.26 – 2.26) | 1.4 | 5.45 (5.16 – 9.74) | 1.1 |

B

| Strains | Rate of Gene Conversion (event/cell/division) $\times 10^{-5}$ | Fold increase over wt | Rate of deletion (event/cell/division) $\times 10^{-5}$ | Fold increase over wt |
|---------------|--|-----------------------|---|-----------------------|
| wild type | 2.68 (1.94-5.27) | -- | 8.86 (5.42-17.2) | -- |
| <i>pcf1-d</i> | 4.13 (3.45-9.22) | 1.54 | 13.8 (10.1-13.9) | 1.55 |
| <i>pcf2-d</i> | 6.96 (3.81-7.85) | 2.59 | 11.9 (9.65-18.8) | 1.40 |
| <i>pcf3-d</i> | 4.86 (3.39-7.91) | 1.81 | 10.5 (8.19- 14.2) | 1.18 |

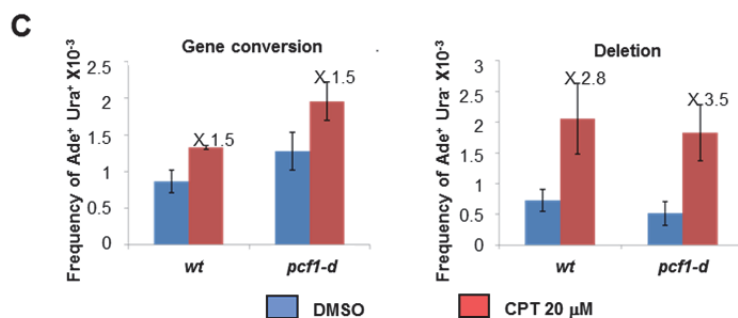


Figure n. 4: Le rôle de CAF-1 lors de la recombinaison allélique.

A) Taux de recombinaison entre chromosomes homologues et de perte de chromosomes chez les souches diploïdes indiquées. Les valeurs correspondent à la moyenne de trois taux indépendants, chacun étant la médiane de 13 cultures indépendantes. L'intervalle de confiance à 95% est indiqué entre parenthèses. Le facteur d'augmentation par rapport à la souche sauvage est indiqué.

B) Taux de conversion génique et de délétion entre chromatides sœurs chez les souches haploïdes indiquées. Les valeurs correspondent à la moyenne de trois taux indépendants, chacun étant la médiane de 13 cultures indépendantes. L'intervalle de confiance à 95% est indiqué entre parenthèses. Le facteur d'augmentation par rapport à la souche sauvage est indiqué.

C) Fréquence de la conversion génique et des délétions d'une souche sauvage et *pcf1-d*, après 4 heures de traitement avec 20 μM de CPT. Le DMSO est utilisé comme contrôle. Les valeurs sont la moyenne de deux expériences indépendantes et les barres d'erreur indiquent l'écart type. Les chiffres indiquent l'induction par le traitement avec CPT.

Recombinaison ectopique induite par une fourche bloquée

J'ai ensuite utilisé le système *RuraR* pour évaluer le rôle de CAF-1 dans la recombinaison ectopique. Le blocage des fourches au locus *ura4* conduit à une perte du marqueur *ura4*⁺ et donc à une résistance à la drogue 5-FOA. L'analyse par PCR des cellules 5-FOA^R a montré que la perte du marqueur *ura4* correspond à des délétions génomiques associées ou non à des translocations avec le chromosome 2 qui porte une barrière *RTSI*-RFB naturelle. Ces délétions et translocations sont dépendantes de la recombinaison homologue et sont le résultat d'une recombinaison ectopique entre séquences *RTSI* répétées et dispersées dans le génome de *S. pombe*.

Tout d'abord, j'ai observé que CAF-1 n'est pas nécessaire pour promouvoir la viabilité des cellules, lors de l'induction de la barrière *RTSI*-RFB. En absence de CAF-1, la recombinaison ectopique est sévèrement diminuée, aussi bien au niveau des délétions que des translocations (diminution de 3 à 5 fois) (Figure n. 5).

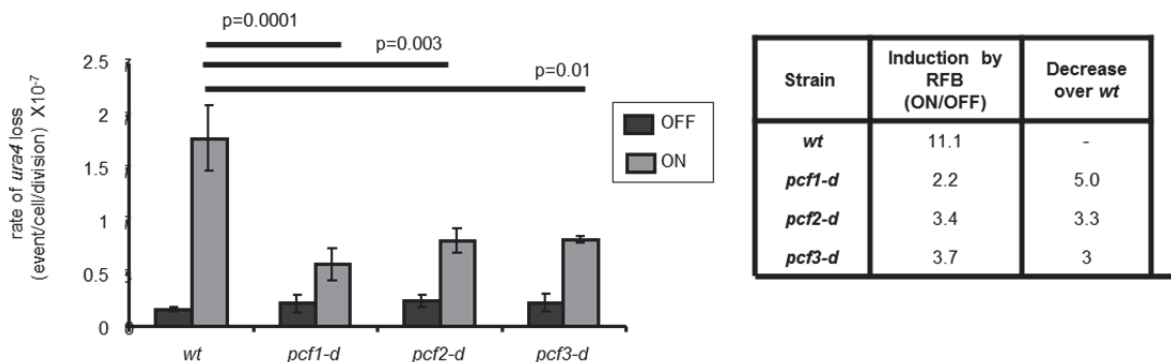


Figure n. 5: Rôle de CAF-1 lors de la recombinaison ectopique. À gauche: Taux de perte du marqueur *ura4* analysé par la résistance au 5-FOA, dans les souches indiquées. Les valeurs correspondent à la moyenne d'au moins trois taux indépendants (11 cultures pour chaque expérience). Les barres d'erreur représentent l'écart type et la signification statistique a été calculée en utilisant le test non paramétrique de Mann-Whitney. A droite: tableau indiquant l'induction de la perte du marqueur *ura4* par l'activation de la barrière *RTSI*-RFB dans les souches indiquées (taux de perte de *ura4* en condition « ON »/taux de perte de *ura4* en condition « OFF »), et la diminution par rapport à la souche sauvage.

Mes résultats montrent que CAF-1 n'est pas indispensable à la recombinaison allélique mais stimule la recombinaison ectopique. CAF-1 est donc impliqué dans les mécanismes de la recombinaison homologue et son rôle est crucial lorsque l'homologie entre les molécules recombinantes est limitée. Fait important, cette fonction pro-recombinogène de CAF-1 implique les trois sous-unités, ce qui suggère que la fonction de chaperon d'histone est impliquée dans la régulation de la recombinaison. Mes données suggèrent que CAF-1 pourrait être un nouveau régulateur de la recombinaison homologue.

3. Stabilisation des intermédiaires de recombinaison de type D-loop par CAF-1

Compte tenu des résultats précédents, j'ai décidé d'étudier l'impact des défauts de CAF-1 sur la recombinaison homologue au niveau moléculaire. Pour ce faire, j'ai utilisé le système *RuraR* qui permet d'analyser la recombinaison homologue induite par des blocages de fourches. Ce système permet d'analyser les différentes étapes du mécanisme de la recombinaison : le recrutement des protéines de la recombinaison, la formation de molécules jointes et le produit de leur résolution. Les molécules jointes observées par 2-DGE sont de deux types : des D-loop (JM-A) et des molécules contenant des jonctions de Holliday formées entre les séquences *RTS1* (JM-B) (Figure n. 6A). Il est important de noter que les structures de type D-loop sont les précurseurs des jonctions de Holliday.

L'absence de CAF-1 conduit à une diminution drastique de l'intensité des molécules jointes, quel que soit leur type (Figure n. 6B, C). Ces données montrent que CAF-1 affecte les molécules jointes formées entre les séquences *RTS1*, soit en favorisant leur formation soit en favorisant leur stabilité. En outre, comme les souches inactivées pour chacune des trois sous-unités présentent le même phénotype, le rôle de CAF-1 dans la promotion ou dans la stabilisation des molécules jointes est probablement lié à sa fonction de chaperon d'histone.

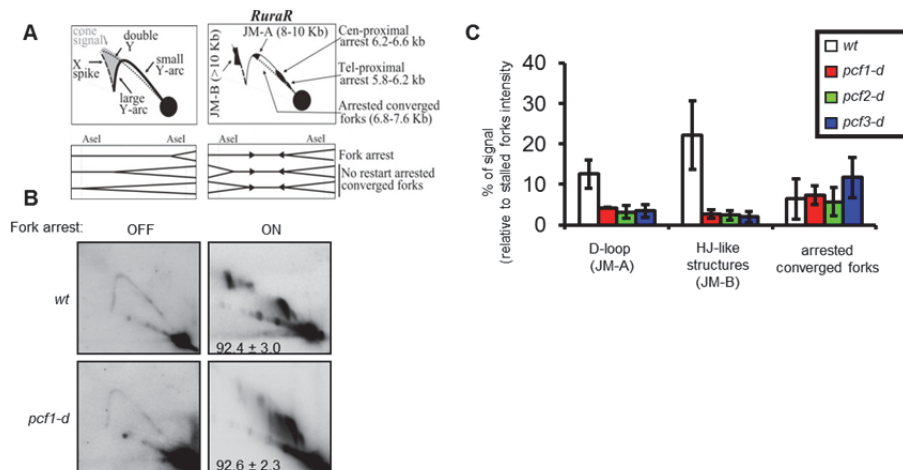


Figure n. 6: Défauts de molécules jointes au locus *RuraR* en absence de CAF-1. A) Schéma des intermédiaires de réplication et de recombinaison observés par 2-DGE au locus *RuraR*, au sein du fragment de restriction *AseI*. Les flèches noires indiquent l'orientation des barrières *RTS1*. JM-A et JM-B indiquent les molécules jointes de type D-loop et de type jonctions de Holliday. B) Analyse des intermédiaires de recombinaison et de réplication par 2-DGE au locus *RuraR* dans les souches indiquées, cultivées pendant 24 heures avec thiamine (condition OFF) ou sans thiamine (condition ON). Les chiffres indiquent le pourcentage des fourches arrêtées par la barrière *RTS1*-RFB (\pm écart-type). C) Quantification du panneau B. Les valeurs correspondent à la moyenne de trois expériences indépendantes et les barres d'erreur correspondent à l'erreur standard de la moyenne.

J'ai ensuite analysé les produits de résolution des molécules jointes de type jonctions de Holliday, en analysant les réarrangements chromosomiques par Pulse Field Gel Electrophoresis (PFGE). En effet, une explication possible pour la diminution observée de l'intensité des molécules jointes en absence de CAF-1 est que celles-ci sont résolues plus rapidement, dû à une réduction potentielle de la densité des nucléosomes. Tous les types de réarrangements sont réduits dans les souches *pcf1-d*, *pcf2-d* et *pcf3-d* (Figure n. 7). J'ai aussi analysé le triple mutant *pcf1-d pcf2-d pcf3-d*, dans lequel les trois gènes codant pour les sous-unités de CAF-1 ont été inactivés. Le triple mutant montre une réduction de l'accumulation du chromosome acentrique similaire à chacun des simples mutants, ce qui suggère que c'est la fonction chaperon d'histone de CAF-1 qui est impliquée dans la recombinaison induite par le blocage de fourches (Figure n. 7).

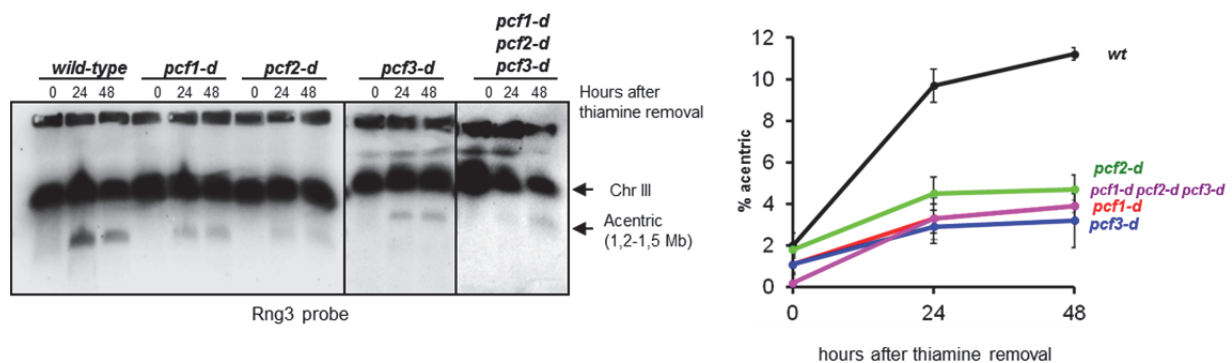


Figure n. 7: Analyse de l'accumulation du chromosome acentrique, produit de résolution des molécules jointes. À gauche: analyse par PFGE de souches sauvage, *pcf1-d*, *pcf2-d*, *pcf3-d* et *pcf1-d pcf2-d pcf3-d* en condition OFF et en condition ON (24h et 48h en absence de thiamine). La taille du chromosome III est de 3,5 Mb et la taille du chromosome acentrique est de 1.2 à 1.5 Mb. A droite: cinétique d'accumulation du chromosome acentrique après élimination de la thiamine du milieu de culture, dans les souches *RuraR* indiquées. Les valeurs correspondent à la moyenne d'au moins trois expériences indépendantes et les barres d'erreur indiquent l'erreur standard de la moyenne.

Plusieurs hypothèses peuvent être tirées de ces expériences. En absence de CAF-1 :

- les molécules jointes ne sont pas formées correctement, soit parce que les fourches bloquées sont instables et incompétentes pour une réactivation par la recombinaison homologue, soit parce que les facteurs de recombinaison ne sont pas recrutés correctement.
- Les molécules jointes sont formées mais sont instables et rapidement dissociées.

Pour tester la première hypothèse, j'ai analysé la stabilité des fourches bloquées par la barrière *RTS1-RFB* et sa réactivation par la recombinaison. J'ai aussi analysé le recrutement du principal médiateur de la recombinaison, Rad22. Par microscopie à fluorescence 3D, j'ai observé que les souches inactivées pour *pcf1* ou *pcf2* ou *pcf3* présentent une augmentation spontanée des foyers Rad22, particulièrement en phase S (Figure n. 8A). Par la suite, je me suis concentrée sur le recrutement de Rad22 sur les fourches bloquées par la barrière *RTS1-*

RFB, en utilisant la technique d'immuno-précipitation des protéines associées à la chromatine (ChIP). Rad22 est recruté aux fourches arrêtées en absence de CAF-1, dans la même mesure que la souche de référence (Figure n. 8B). Par conséquent, la diminution de l'efficacité de recombinaison ne peut s'expliquer par un défaut dans le recrutement de facteurs de recombinaison aux fourches arrêtées, en absence de CAF-1.

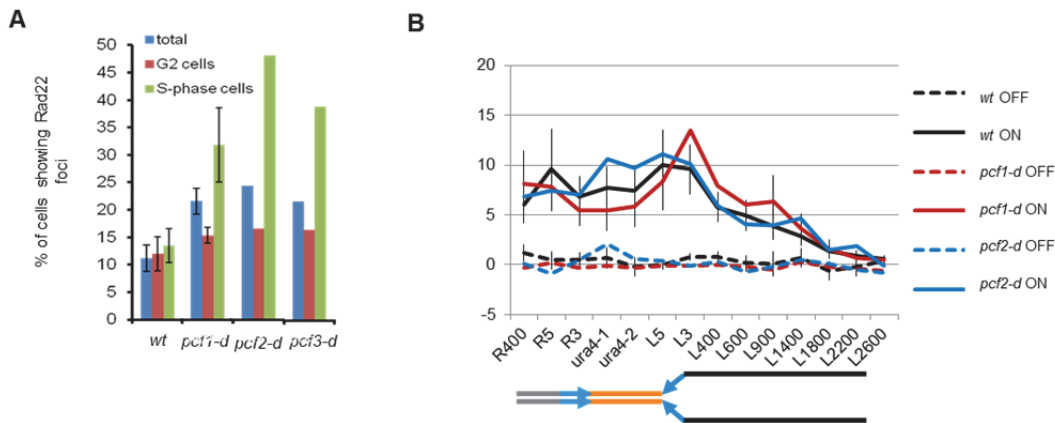


Figure n.8: Recrutement de Rad22 en absence de CAF-1. A) Quantification des foyers spontanées de Rad22 dans les souches indiquées. Les valeurs sont des moyennes d'au moins trois expériences indépendantes (pour le sauvage et *pcf1*) ou deux (*pcf2-d* et *pcf3-d*). Les barres d'erreurs correspondent à l'écart type. Au moins 300 noyaux ont été analysés par souche et par expérience. B) graphique représentant le niveau de recrutement de Rad22 au niveau du locus *RuraR* dans les souches indiquées, cultivées pendant 24 heures en présence (condition OFF) ou en absence de thiamine (condition ON). Les valeurs correspondent à la moyenne de trois expériences indépendantes et les barres d'erreur correspondent à l'écart type.

Ensuite, j'ai analysé par 2-DGE la stabilité des fourches et leur réactivation dans des souches portant la construction *uraR* (Figure n. 9A). En absence de recombinaison homologue, des signaux de terminaison s'accumulent, montrant que la barrière *RTS1*-RFB se comporte alors comme un point chaud de terminaison de réplication. En absence de CAF-1, les signaux de terminaison sont d'intensité équivalente à la souche de référence. J'en ai conclu que la stabilisation des fourches arrêtées et leur redémarrage par recombinaison n'est pas défectueux, ni plus efficace en absence de CAF-1 (Figure n. 9B, C). Globalement, les résultats obtenus suggèrent que CAF-1 serait impliqué dans la stabilité des molécules jointes, plutôt que dans leur formation.

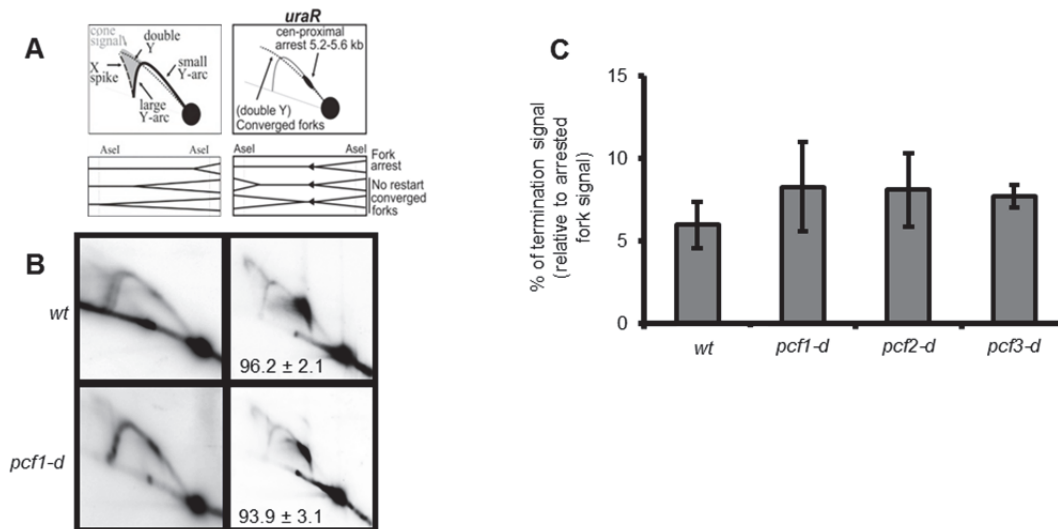


Figure n. 9: Les fourches bloquées sont stables et sujettes au redémarrage par la recombinaison en absence de CAF-1. A) Les diagrammes des intermédiaires de réplication (RI) au sein du fragment de restriction AseI analysés par 2DGE (en haut) et leurs structures (en bas: les pointes des flèches noires indiquent l'orientation de la barrière *RTS1-RFB*). B) Analyse par 2DGE des intermédiaires de réplication dans les souches indiquées, cultivées pendant 24 heures en présence de thiamine (pause OFF) ou non (pause ON). Les chiffres indiquent le pourcentage des fourches arrêtées \pm écart-type. C) Quantification du panneau B. Les valeurs correspondent à la moyenne de trois expériences indépendantes et les barres d'erreur correspondent à l'erreur standard de la moyenne.

Dans le système *RuraR*, les réarrangements chromosomiques peuvent être formés par deux voies : une voie dépendante de Rad22 et Rhp51, avec formation de molécules jointes de type D-loop ; une voie dépendante de Rad22 et indépendante de Rhp51, sans formation de molécules jointes de type D-loop (Lambert, Mizuno et al. 2010). En effet, la souche *rhp51-d* ne présente pas le signal correspondant à la D-loop, tandis que les molécules jointes de type jonctions de Holliday sont formées. Par conséquent, afin de mieux comprendre la contribution de CAF-1 dans les mécanismes de recombinaison, j'ai décidé d'étudier les interactions génétiques entre CAF-1 et Rhp51. Pour cela, j'ai créé les double mutants *pcf1-d rhp51-d* et *pcf2-d rhp51-d*, et contenant la construction *RuraR*, et j'ai analysé le niveau de réarrangements chromosomiques par PFGE (Figure n. 10). Mes données montrent que l'inactivation de *rhp51* sauve le défaut de CAF-1 au niveau des réarrangements chromosomiques. Les résultats montrent que CAF-1 agit dans la voie Rhp51, en aval de Rhp51.

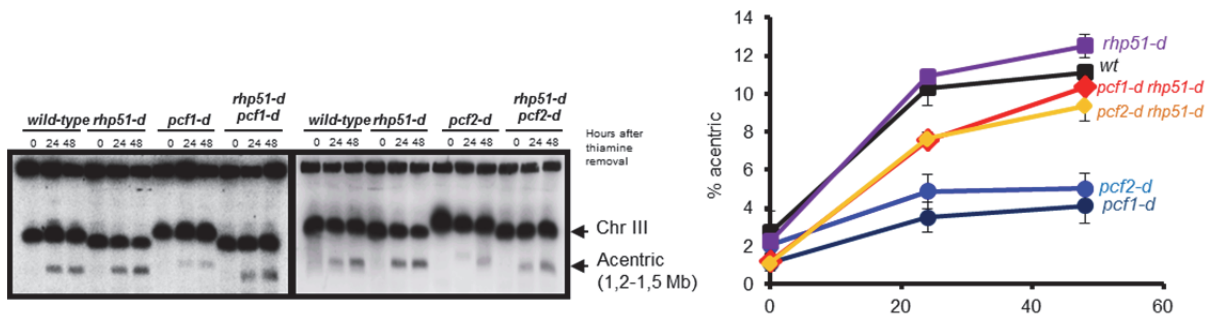


Figure n. 10: Interaction génétique entre *pcf1* ou *pcf2* et *rhp51*. À gauche: analyse par PFGE du chromosome acentriques dans les souches indiquées en présence de thiamine (condition OFF) ou 24h et 48h après l'élimination de la thiamine du milieu de culture (condition ON). La taille du chromosome III est de 3,5 Mb et la taille du chromosome acentrique est de 1.2 à 1.5 Mb. A droite: cinétique d'accumulation du chromosome acentrique après élimination de la thiamine dans les souches indiquées. Les valeurs correspondent à la moyenne d'au moins trois expériences indépendantes et les barres d'erreur indiquent l'écart type.

Les résultats obtenus suggèrent que CAF-1 régule la stabilité des molécules jointes formées par la voie Rhp51, c'est-à-dire de type D-loop. CAF-1 pourrait agir en empêchant la dissolution des intermédiaires D-loop par des hélicases telles que Rqh1. Si mon hypothèse est correcte, l'inactivation du gène codant pour l'hélicase Rqh1 pourrait sauver l'instabilité observée des molécules jointes en absence de CAF-1. Pour étudier les interactions génétiques entre *rqh1* et *pcf1* ou *pcf2*, j'ai créé les souches *pcf1-d rqh1-d* et *pcf2-d rqh1-d* avec la construction *RuraR*, et j'ai analysé le niveau du chromosome acentrique par PFGE. Le niveau du chromosome acentrique dans *pcf1-d rqh1-d* et *pcf2-d rqh1-d* est similaire à celle de la souche sauvage (Figure n. 11A). Ainsi, la délétion de *rqh1* sauve les défauts de recombinaison dû à l'absence de CAF-1.

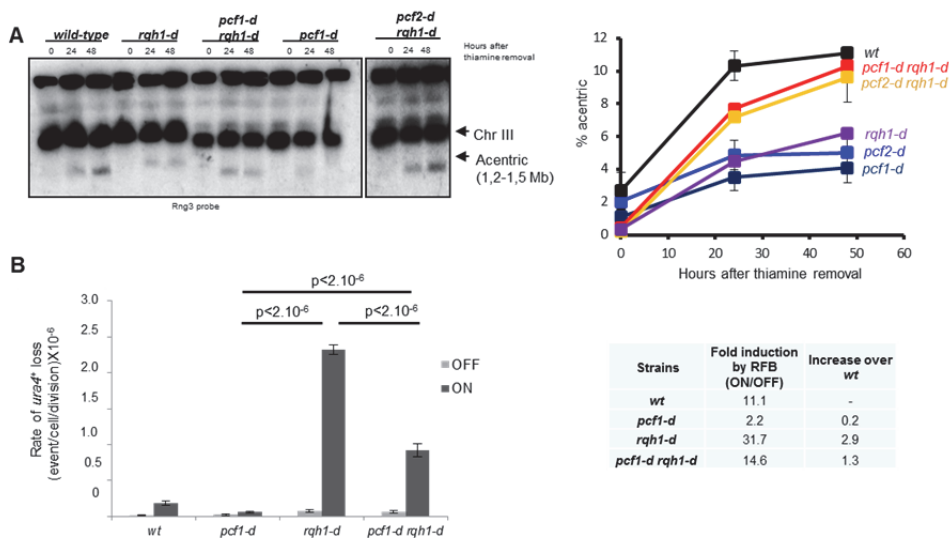


Figure n. 11: Interaction génétique entre *pcf1* ou *pcf2* et *rqh1*. A) À gauche: analyse par PFGE de chromosome acentrique dans les souches indiquées en présence de thiamine (OFF) ou 24h et 48h après l'élimination de la thiamine du milieu de culture (ON). À droite: cinétique d'accumulation du chromosome acentrique après élimination de la thiamine dans les souches indiquées. B) Bar chart showing the rate of *ura4+* loss in various strains under OFF and ON conditions.

l'élimination de la thiamine (ON conditions). La taille de l'chromosome III est de 3,5 Mb et la taille du chromosome acentrique est de 1.2 à 1.5 Mb. A droite: cinétique d'accumulation du chromosome acentrique après l'élimination de la thiamine dans les souches indiquées. Les valeurs correspondent à la moyenne d'au moins trois expériences indépendantes et les barres d'erreur indiquent l'écart type. B) A gauche: taux de perte d'*ura4* analysé par la résistance au 5-FOA dans les souches et les conditions indiquées. Les valeurs correspondent à la moyenne de trois taux indépendants (chacun déterminé à partir de 9 cultures indépendantes selon la méthode de la médiane). Les barres d'erreur représentent l'écart type et la signification statistique a été calculée en utilisant le test non paramétrique de Mann-Whitney. A droite: tableau représentant l'induction de la perte de *ura4* dans les souches indiquées (taux de perte d'*ura4* en condition ON/ taux de perte d'*ura4* en condition OFF).

Pour tester directement l'hypothèse que CAF-1 stabilise les molécules jointes de type D-loop en inhibant leur dissolution par Rqh1, j'ai analysé par 2-DGE les molécules jointes dans les simples et double mutants. Remarquablement, l'intensité des intermédiaires de recombinaison de type D-loop et de type jonctions de Holliday dans les double mutant *pcf1-d rqh1-d* et *pcf2-d rqh1-d* est restaurée au niveau de celles de la souche sauvage. Ainsi, ces données établissent que CAF-1 stabilise les intermédiaires de recombinaison de type D-loop, en contrecarrant leur dissociation par Rqh1.

Pour appuyer davantage la conclusion que la fonction pro-recombinogène de CAF-1 est de contrecarrer l'activité anti-recombinase de Rqh1, j'ai analysé l'induction de la recombinaison ectopique dans les doubles mutants. En effet, l'absence de Rqh1 devrait supprimer le défaut de recombinaison ectopique observé dû à l'absence de CAF-1. Fait remarquable, l'inactivation de *rqh1* supprime la diminution de la recombinaison ectopique dans le mutant *pcf1-d* (figure n. 11B). En effet, l'induction de la perte de *ura4* causé par le blocage de la fourche, dans *pcf1-d rqh1-d* est semblable à celle de la souche sauvage. Ainsi, ces données établissent que CAF-1 favorise la recombinaison ectopique en neutralisant l'activité anti-recombinase de Rqh1. Cependant, Rqh1 dispose de fonctions supplémentaires dans la prévention de l'instabilité du génome induite par des blocage de fourches, et qui ne sont pas contrecarrées par CAF-1.

4. L'interaction entre CAF-1 et PCNA est nécessaire pour stabiliser les intermédiaires D-loops.

La fonction de CAF-1 au cours du maintien de l' hétérochromatine est dispensable pour la stabilisation de la D-loop.

CAF-1 stabilise les molécules jointes de type D-loop en empêchant leur dissolution par Rqh1. CAF-1 est un chaperon d'histone impliqué dans l'assemblage de la chromatine au cours de la réplication via son interaction avec le facteur de réplication PCNA ; et le maintien de l'hétérochromatine en interagissant avec la protéine Swi6. Pour déterminer la fonction de

CAF-1 impliquée dans les mécanismes de recombinaison homologue, j'ai analysé les phénotypes d'un mutant *swi6-d* et d'un mutant de *pcf1* incapable d'interagir avec PCNA.

J'ai trouvé que la délétion du gène *swi6* n'affecte pas la recombinaison entre séquence RTS1, induite par le blocage de fourche. L'inactivation de Swi6 ne phénocopie donc pas les défauts du complexe CAF-1. Ceci suggère que le rôle de CAF-1 dans les mécanismes de recombinaison n'implique pas son rôle dans le maintien de l'hétérochromatine.

L'interaction entre CAF-1 et PCNA est nécessaire pour stabiliser les intermédiaires D-loops.

Au cours de la réplication de l'ADN, CAF-1 est recruté dans les foyers de réplication via son interaction entre la grande sous unité Pcf1 avec PCNA (Moggs, Grandi et al, 2000;. Krawitz, Kama et al 2002;. Rolef Ben-Shahar, Castillo et al 2009.). En outre, la capacité de CAF-1 à déposer les histones au cours de la réplication dépend in vitro de son interaction avec PCNA (Krawitz, Kama et al., 2002). Mon hypothèse est que CAF-1 pourrait stabiliser les molécules jointes de type D-loop via sa fonction d'assemblage de la chromatine. Ceci est suggéré par les phénotypes communs entre *pcf1-d*, *pcf2-d*, et *pcf3-d* et le triple mutant *pcf1-d pcf2-d pcf3-d*. Tout d'abord, j'ai confirmé que CAF-1 est recruté aux foyers de réplication chez *S. pombe* par microscopie à fluorescence 3D, en analysant la co-localisation de Pcf1-YFP avec PCNA-CFP. L'interaction entre Pcf1 et PCNA est médiée par la PIP-box canonique de Pcf1. Celle-ci a été mutée (QLKLNNFF en ALKANNA) pour créer l'allèle *pcf1-PIP**. Des expériences de co-immuno-précipitation ont montré que la mutation de la PIP-box abolit fortement l'interaction de Pcf1 avec PCNA, sans affecter l'interaction entre Pcf1 et Pcf2, suggérant que le complexe CAF-1 est formé mais avec une capacité fortement réduite d'interagir avec PCNA.

La souche *pcf1-PIP* RuraR* présente une réduction de l'accumulation du chromosome acentrique, un défaut de recombinaison ectopique et une instabilité des molécules jointes, de façon similaire à la souche inactivée pour *pcf1* (Figure n. 12A, B et C). Ainsi, ces données établissent que l'interaction entre Pcf1 et PCNA est crucial pour la stabilisation des molécules jointes, et suggèrent que la fonction pro-recombinogène de CAF-1 nécessite sa fonction d'assemblage de la chromatine.

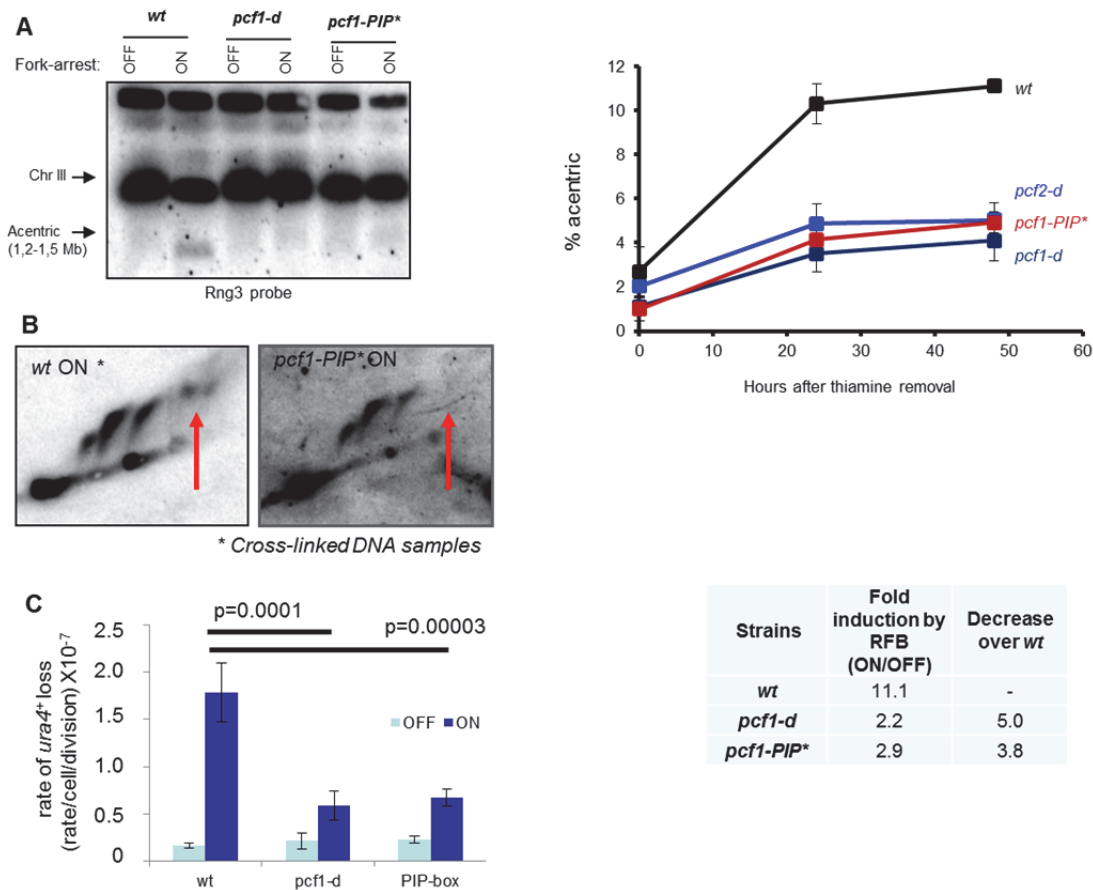


Figure n. 12: La fonction pro-recombinogène de CAF-1 nécessite l'interaction entre PCNA et Pcf1 A) A gauche: analyse par PFGE du chromosome acentrique, dans les souches indiquées, en condition OFF et en condition ON (48h après l'élimination de la thiamine). Le chromosome III et le chromosome acentrique ont été visualisées en utilisant la sonde *rng3*. A droite: cinétique d'accumulation du chromosome acentrique après l'élimination de la thiamine dans les souches indiquées. Les valeurs représentent la moyenne d'au moins trois expériences indépendantes et les barres d'erreur indiquent l'écart type. B) Analyse des intermédiaires de réplication au locus *RuraR* par 2-DGE dans les souches indiquées, lors de l'induction du blocage de fourches. Tous les échantillons d'ADN ont été figés au tri-méthyl-psoralen. C) A gauche: Taux de perte d'*ura4* analysé par la résistance au 5-FOA dans les souches indiquées. Les valeurs correspondent à la moyenne de 3 taux (déterminé à partir de 9 cultures indépendantes). Les barres d'erreur correspondent à l'écart type et la signification statistique a été calculée en utilisant le test non paramétrique de Mann-Whitney. A droite: table avec l'induction de la perte de *ura4* par le blocage de fourches au locus *RuraR* (taux de perte de *ura4* dans les conditions ON / taux de perte de *ura4* dans des conditions OFF) dans les souches indiquées.

5. Rôle de la CAF-1 dans la stabilisation des intermédiaires de recombinaison toxiques

Un défaut dans l'élimination du nucléo-filament Rad51 ou la gestion des molécules jointes peut conduire à l'accumulation d'intermédiaires de recombinaison toxiques. Ceci est à l'origine de l'extrême ralentissement de croissance du double mutant *srs2-d rqh1-d*. Ce défaut de croissance est en partie supprimé par la délétion de *rhp51*, responsable de la formation de molécules jointes (Chanet, Heude et al, 1996;. Doe et Whitby, 2004; Burgess, Lisby et al 2009.; Lambert, Mizuno et al. 2010). Pour confirmer le rôle de CAF-1 dans la stabilisation des molécules jointes, j'ai analysé si la délétion de *pcf1* ou de *pcf2* pouvait

également supprimer en partie le défaut de croissance du double mutant *srs2-d rqh1-d*. Comme prévu, chacune des délétions *pcf2-d* ou *pcf1-d* supprime le phénotype de croissance lente de la souche *srs2-d rqh1-d*, mais pas dans la même mesure que la délétion de *rhp51* (Figure n. 13). Ces données renforcent mes conclusions que CAF-1 stabilise les molécules jointes formées par la recombinaise Rad51.

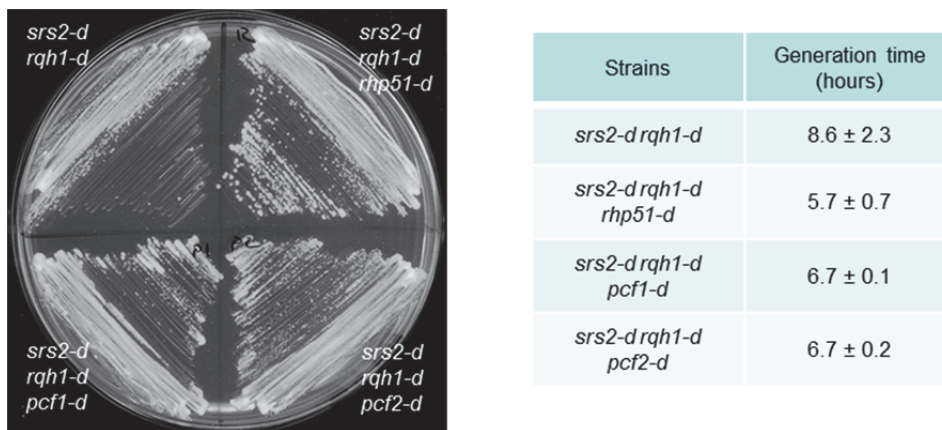


Figure n. 13: Les délétions de *pcf1* ou *pcf2* sauve le phénotype de croissance lente de *srs2-d rqh1-d*. La délétion de *pcf1* ou *pcf2* ne sauve pas le phénotype de croissance lente de *srs2-d rqh1-d*, dans la même mesure que la délétion de *rhp51*. A droite: Le temps de génération en heures dans les souches indiquées.

2. CONCLUSION

Les données que j'ai obtenues au cours de ma thèse me conduisent à proposer les conclusion suivantes

- CAF-1 est impliqué dans les mécanismes de la recombinaison homologue dépendants de la recombinaise Rad51.
- CAF-1 a une fonction pro-recombinogène
- CAF-1 stabilise les intermédiaires de recombinaison de type D-loop en contrecarrant leurs dissolutions par l'hélicase Rqh1.
- La fonction pro-recombinogène de CAF-1 nécessite son interaction avec PCNA, et donc probablement sa fonction d'assemblage de la chromatine liée à la synthèse d'ADN.

Ces conclusions me conduisent à proposer le modèle suivant : CAF-1 favorise le dépôt des histones au cours de l'extension de la D-loop par synthèse d'ADN. L'assemblage de la chromatine sur les molécules jointes joue comme une barrière contre leur dissolution par l'hélicase Rqh1 (Figure n. 15). En effet, CAF-1 pourrait être recruté sur les intermédiaires de type D-loop via son interaction avec PCNA, pour favoriser le dépôt des histones

pendant l'extension de la D-loop via la synthèse d'ADN. Le dépôt des histones pourrait alors stabiliser les intermédiaires de type D-loops en empêchant leur dissolution par l'hélicase Rqh1. Ainsi, en neutralisant la fonction de Rqh1, CAF-1 pourrait faire partie d'un équilibre de régulation de la stabilisation/dissociation des intermédiaires de recombinaison.

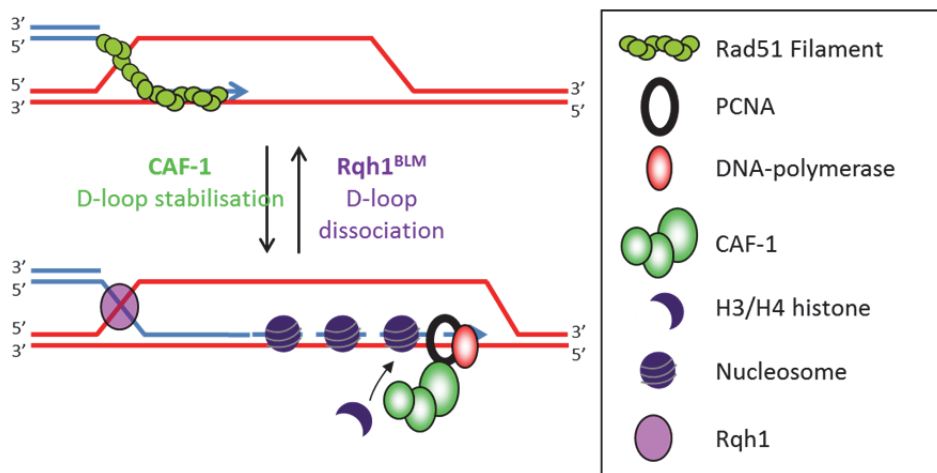


Figure n. 15: Un modèle pour la stabilisation des intermédiaires de recombinaison de type D-loops par l'assemblage des nucléosomes dépendant de CAF-1. CAF-1 est recruté par l'interaction entre Pcf1 et PCNA au cours de l'extension de la D-loop, afin de promouvoir la chromatinization des intermédiaires de recombinaison précoces (D-loops). Ce faisant, CAF-1 neutralise l'activité hélicase de Rqh1 et empêche la dissolution du D-loop.