UNIVERSITE MONTPELLIER I
SCIENCES ET TECHNIQUES DU LANGUEDOC

THESE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE MONTPELLIER I

Discipline : Biochimie, Biologie Moléculaire et Cellulaire
Ecole Doctorale : Sciences Chimiques et Biologiques pour la Santé

Présentée et soutenue publiquement

par

Julien BIANCO

Le 15 Décembre 2010

Rôle du complexe CLASPINE/TIMELESS/TIPIN dans le maintien de la stabilité du génome au cours de la réplication

JURY

Pr Simon GALAS	Président du jury
Dr Patricia KANNOUCHE	Rapportrice
Dr Bernard LOPEZ	Rapporteur
Pr Christophe CAZAUX	Examinateur
Dr Philippe PASERO	Directeur de thèse
Dr Hélène TOURRIERE	Co-encadrante

Liste des sigles et des abréviations

9-1-1 : Rad9-Rad1-Hus1

ACS : ARS consensus sequence

ADN : Acide désoxiribonucléique

ARN : Acide ribonucléique

ARS : Autonomously Replicated Sequence

ATM : Ataxia Telangiectasia Mutated

ATR : ATM and Rad3 Related

BER : Base Excision Repair

BrdU : Bromodeoxyuridine

CDK : Cyclin dependant kinase

CFS : Common fragile site

ChIP: Chromatin Immunoprecipitation

CIN: Chromosomal INstability

CldU : Chlorodeoxyuridine

CMG : Cdc45-MCM2-7-GINS

DDK : DBF4-Dependant Kinase:

dNTP : deoxyribonucleotide

DSB : Double strand break

GCR : Gross Chromosomal Rearrangement

HU : Hydroxyurée

IC50 : Concentration inhibant 50% de croissance

IdU : Iododeoxyuridine

MCM : Mini Chromosome Maintenance

MMR : DNA Mismatch Repair

MRN : Mre11-Rad50-Nbs1

NER : Nucleotide Excision Repair

NHEJ : Non Homologous End Joining

ORC : Origin Recognition Complex

Pb : Paire de Base

PCNA : Proliferating Cell Nuclear Antigen

PFGE : Pulse Field Gel Electrophoresis

PIKK: Phosphatidylinositol 3-kinase related kinase

Pre IC : Pre-initiation Complex

Pre RC : Pre-replication Complex

RH : Recombinaison homologue

RNR : Ribonucleotide Reductase

RPA : Replication Protein A

S-CDK: S phase specific CDK

SCE : Sister Chromatin Exchange

shRNA : Short Hairpin RNA

siRNA : Small interfering RNA

ssDNA: single stranded DNA

SVF : Sérum de Veau Foetal

TLS : Translesional Synthesis

Ub : Ubiquitine

UV: Rayonnement Ultra violet

Table des matières

Liste des sigles et des abréviations **3**

Table des matières **5**

Chapitre 1 : Introduction ***8***

1 Principes généraux de la réplication des chromosomes **11**

1.1 Introduction au cycle cellulaire 11

1.1.a. Les différentes étapes du cycle cellulaire 11

1.1.b. Régulation du cycle cellulaire par les CDKs 11

1.2 Origines de réplication 14

1.3 Initiation de la réplication 14

1.3.a. Structure du pré-RC 14

1.3.b. Le complexe d'initiation (IC) 15

- Les facteurs d'initiation 15
- Régulation de l'initiation par les CDKs et les DDKs 17
- Chargement des polymérases réplicatives 17

1.3.c. Inhibition de la re-réplication par la régulation du pré-RC 20

- Inhibition de la réinitiation par les CDKs 20
- Inhibition de CDT1 par la GEMININE et par CUL4-DDB1 20

1.4 Elongation de la réplication 21

1.4.a. Changement de polymérases et fragments d'Okazaki 21

1.4.b. Les protéines du réplisome 24

- Le complexe CMG 24
- MCM8 24
- Topoisomerase 1 (TOP1) 24
- Complexe CLASPINE-TIMELESS-TIPIN (MRC1-TOF1-CSM3 chez la levure) 25
- CTF4 25
- FACT 25
- MCM10 26

1.5 Le programme de réplication 26

1.5.a. Programme temporel d'activation des origines 26

1.5.b. Programme de réplication et transcription 27

1.5.c. Corrélation avec le niveau de compaction de la chromatine 27

1.5.d. Plasticité au cours du développement et de la différenciation 28

2 Mécanismes de surveillance de l'intégrité du génome **29**

2.1 Les différents types de checkpoints chez les mammifères 29

2.2 Activation du checkpoint de phase S 30

2.2.a. Obstacles naturels de la fourche de réplication 30

- Stress oxydatif 30
- Interférence avec la transcription 31
- Autres types de barrières de réplication 33

2.2.b. Agents génotoxiques bloquant la fourche de réplication 33

- Inhibiteurs de synthèse de l'ADN : Hydroxyurée (HU) et Aphidicoline 33
- Les rayonnements ultra-violets (UV) 34
- Oxaliplatine 34

2.3 Cascade d'activation du checkpoint de phase S 35

2.3.a. Voie ATM/CHK2 37

- Détection de la cassure et recrutement des médiateurs 37
- Fonctions d'ATM 38

2.3.b. Voie ATR/CHK1 39

- Activation d'ATR 39

♦ Cibles d'ATR ... 42
2.3.c. Cibles de la kinase effectrice CHK1 ... 43
♦ Stabilisation de la fourche de réplication ... 44
♦ Recombinaison ... 44
♦ Arrêt du cycle cellulaire ... 45
♦ Inactivation des origines tardives ... 45
♦ Activation des mécanismes de réparation et de tolérance des lésions ... 46
2.3.d. Régulation de l'arrêt du checkpoint ... 47
2.4 Rôles des protéines du checkpoint en phase S normale ... 49
2.4.a. Rôle dans l'activation des origines ... 49
2.4.b. Rôles dans la progression des fourches de réplication ... 50

3 Checkpoint et cancer ... 53
3.1 Instabilité génétique ... 56
3.1.a. Différents types d'instabilité génétique ... 56
3.1.b. Les points chauds d'instabilité génétique. ... 57
♦ Les régions fortement transcrites ... 57
♦ Les sites fragiles ... 57
3.1.c. Rôle des checkpoints de phase S dans le maintien de l'intégrité du génome. ... 58
3.2 Un nouveau modèle pour le développement et la progression des cancers : « l'instabilité génomique » induite par des oncogènes ... 59
3.3 Dérégulation de l'expression des protéines du checkpoint et de la réplication ... 64

Chapitre 2 : Materiels & Methodes ... 66

Modèles cellulaires ... 67

Peignage Moléculaire ... 68

Western blot ... 70

Cytométrie de Flux ... 70

Tri par cytométrie de flux ... 71

Tests de croissance et de viabilité cellulaire ... 71

BrdU-IP- chip ... 71

Etalement métaphasique et Fish de FRA3B ... 72

Quantification de l'expression des gènes ... 73

Chapitre 3 : Résultats ... 74

1 Caractérisation des lignées shRNA Claspine et Timeless. ... 78

2 Activation du checkpoint de phase S ... 82

3 Rôle de CLASPINE et TIMELESS au cours de la réplication ... 91

4 Rôle de CLASPINE et TIMELESS dans le maintien de l'intégrité du génome ... 95

5 Rôle de CLASPINE et TIMELESS dans la résistance aux agents anti-tumoraux. ... 102

6 Analyse de l'expression de gènes de la réplication et du checkpoint de phase S dans différents cancers ... 106

Chapitre 4 : Discussion & perspectives ... 111

1 La diminution de CLASPINE ou TIMELESS n'affecte pas le checkpoint de phase S ... 113

2 CLASPINE et TIMELESS: protéines essentielles à la viabilité cellulaire ... 115

3 La surexpression de CLASPINE et TIMELESS favorise la progression des fourches de réplication. ... 117

4 Augmentation de l'instabilité génétique lors de la déplétion de CLASPINE et TIMELESS 120

5 Importance relative de CLASPINE et TIMELESS en phase S précoce et tardive..... 122
6 Importance de CLASPINE et TIMELESS dans la résistance aux agents génotoxiques..... 124
7 Niveau d'expression de CLASPINE et TIMELESS dans différents cancers..... 125
8 Perspectives..... 127
Chapitre 5 : Bibliographie 129
Chapitre 6 : annexes..... 145
Article I : Identification par un criblage RNAi du complexe MMS22L / NFKBIL2, un nouveau régulateur de la réplication dans les cellules humaines (EMBO J., in press)..... 146
Article II : Régulation de la RH au niveau des fourches de réplication et des DSB par la branche MRC1 du checkpoint de phase S chez S. Cerevisiae……147

CHAPITRE 1 : INTRODUCTION

Au cours des dix dernières années, la recherche sur le cancer a été à l'origine d'avancées considérables dans la compréhension des bases moléculaires de cette maladie. Nous savons maintenant que la tumorigenèse est un processus mutagénique multi étapes qui, malgré la diversité des tumeurs, présente certaines caractéristiques communes, comme un potentiel prolifératif illimité ou l'échappement à l'apoptose. Parmi ces caractéristiques on retrouve aussi la présence de stress réplicatif et de dommages à l'ADN. Ce stress et ces dommages sont responsables de mutations ponctuelles, de délétions ou autres réarrangements chromosomiques qui participent au développement tumoral. Il y a quelques années, il a été montré que ce stress réplicatif apparaît très tôt dans le processus de tumorigenèse. En effet, les laboratoires de T. Halazonetis et de J. Bartek ont montré en 2005 que des lésions de l'ADN apparaissent spontanément dans les cellules précancéreuses et entrainent l'activation du checkpoint de dommages à l'ADN (Bartkova et al. 2005; Gorgoulis et al. 2005). Il a été montré peu de temps après par les laboratoires de F. d'Adda di Fagagna et de V. Gorgoulis que cette activation du checkpoint entrainait l'entrée en sénescence des cellules prétumorales (Bartkova et al. 2006; Di Micco et al. 2006). Ces laboratoires ont proposé un modèle dans lequel le checkpoint de dommages à l'ADN constituerait une barrière contre la progression tumorale en limitant l'instabilité génétique et en dirigeant les cellules accumulant des problèmes de réplication vers l'apoptose ou la sénescence. Une étape clef dans la progression tumorale serait donc l'acquisition de mutations affectant l'activité de ce checkpoint, mutations qui représenteraient un avantage sélectif pour les cellules prétumorales en leur permettant d'échapper à cette barrière et favorisant ainsi leur prolifération (Halazonetis et al. 2008). Comme les dommages à l'ADN dans les cellules prétumorales trouvent leurs sources dans des problèmes de réplication, ce modèle place donc le checkpoint de phase S au cœur des mécanismes de protection contre la progression tumorale. Le checkpoint de phase S est subdivisé en deux voies principales, qui reconnaissent différents types de stress génotoxique. La voie ATR/CHK1 (ou checkpoint de réplication), activée par la présence d'ADN simple brin, est importante pour le maintien de la stabilité des fourches. La voie ATM/CHK2 (ou checkpoint de dommages à l'ADN) reconnaît les cassures double-brin de l'ADN.

Au cours de ma thèse, je me suis particulièrement intéressé aux protéines CLASPINE et TIMELESS, qui sont impliquées dans la voie de signalisation ATR/CHK1. Des travaux récents de notre équipe ont montré que MRC1 et TOF1, les homologues de CLASPINE et TIMELESS chez la levure, sont nécessaires au maintien de la stabilité des fourches de réplication indépendamment de leur fonction dans l'activation du checkpoint

(Tourriere et al. 2005). J'ai donc cherché à déterminer si cette fonction réplicative est conservée dans les cellules humaines.

Il est intéressant de noter que CLASPINE est fortement surexprimée dans plusieurs lignées de cellules tumorales utilisées en laboratoire (Lin et al. 2004; Tsimaratou et al. 2007a) et que la surexpression de cette protéine contribue à la prolifération tumorale (Lin et al. 2004). A première vue, cette activité oncogénique de CLASPINE semble contradictoire avec son activité suppresseur de tumeur liée à sa fonction dans le checkpoint de phase S. Afin de réconcilier ces observations contradictoires, nous proposons une hypothèse originale suivant laquelle la surexpression de CLASPINE dans les cellules tumorales leur permettrait de répliquer plus facilement et plus rapidement leur génome en situation de stress réplicatif, et ce indépendamment de l'activation du checkpoint de réplication.

Afin de tester cette hypothèse, nous avons construit des lignées stables de cellules issues de cancer du colon dans lesquelles nous avons diminué le niveau de CLASPINE et de TIMELESS par ARN interférence. Nous avons pu observer que la déplétion partielle de ces protéines induit des défauts de réplication et de l'instabilité génomique, sans pour autant affecter le checkpoint de phase S, ce qui est en accord avec notre modèle. Dans le cadre d'un projet collaboratif coordonné par C. Cazaux (IPBS, Toulouse) et supporté par le Cancéropôle Grand Sud-Ouest, nous avons pu vérifier que CLASPINE est également surexprimée dans différents cancers, cette surexpression étant associée à un mauvais pronostic thérapeutique.

Afin de replacer mon projet de thèse dans le contexte des connaissances actuelles sur la réplication et l'instabilité génétique, la description de mes travaux sera précédé par une introduction bibliographique en trois parties. Dans la première partie, je présenterai les principes généraux de la réplication de l'ADN. Ceux-ci ayant été principalement caractérisés dans des systèmes modèle comme la levure *S. cerevisiae*, je détaillerai ces mécanismes chez ces organismes et je les transposerai par la suite aux eucaryotes supérieurs. Dans la seconde partie je décrirai le checkpoint de phase S et plus particulièrement la voie ATR/CHK1, dans laquelle sont impliquées CLASPINE et TIMELESS. Enfin, dans une troisième partie, j'essaierai de mettre en évidence les connexions entre réplication, checkpoint de phase S, instabilité génétique et tumorigenèse.

1 Principes généraux de la réplication des chromosomes

1.1 Introduction au cycle cellulaire

1.1.a. Les différentes étapes du cycle cellulaire

Le cycle cellulaire représente l'ensemble des étapes et des processus requis pour permettre à une cellule de se diviser et donner deux cellules filles. Pour se diviser, une cellule doit répliquer l'ensemble de son génome au cours de l'interphase puis effectuer un partage équitable de ses chromosomes au cours de la phase de division appelée mitose. L'interphase elle-même est divisée en trois phases : une phase de croissance et de préparation à la réplication de l'ADN (G1), une phase de réplication de l'ADN (S), et une phase de croissance et de préparation à la mitose (G2). Au cours de la phase S, l'ADN est répliqué de manière semi-conservative, la synthèse démarrant au niveau de sites bien précis sur le chromosome appelés origines de réplication.

1.1.b. Régulation du cycle cellulaire par les CDKs

Les mécanismes de la régulation du cycle cellulaire reposent principalement sur deux types de protéines: les CDKs (Cyclin-dependant kinases) et les cyclines (Fisher 1997). CDKs et cyclines s'associent en complexes hétéro-dimériques, les CDK constituant la sous-unité catalytique et les cyclines la sous unité régulatrice. Une CDK peut former des complexes avec plusieurs cyclines différentes, et inversement. À chaque phase du cycle cellulaire correspond un ou plusieurs complexes CDK/cyclines. Les cyclines ne sont pas présentes pendant tout le cycle, elles apparaissent puis disparaissent brusquement à des moments précis du cycle, de façon périodique. Les CDK peuvent donc être sous forme activée ou désactivée, selon qu'elles sont associées ou non à leur cycline. Le cycle cellulaire est contrôlé par au moins six complexes CDK/cyclines différents qui interviennent à des

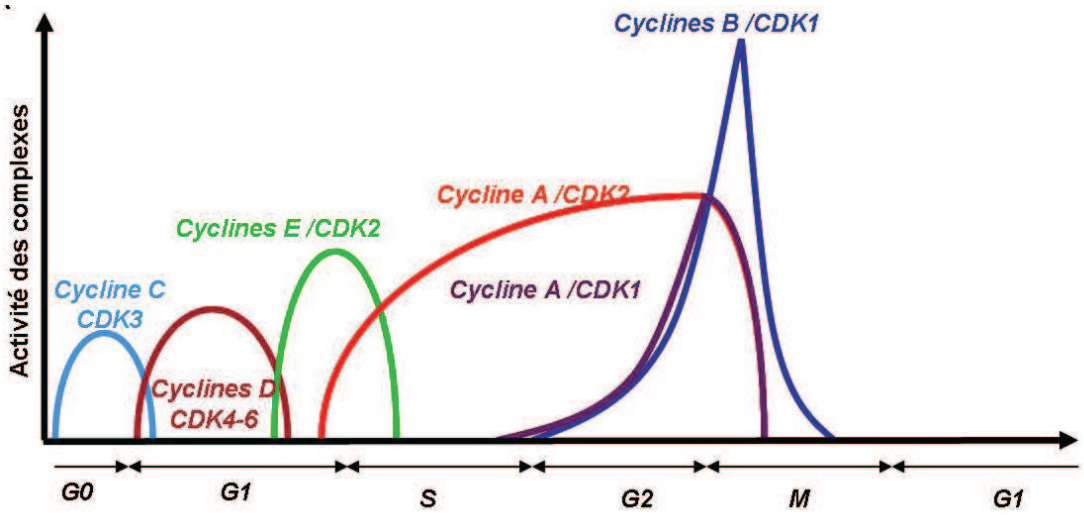
moments précis du cycle cellulaire (Figure 1). La mise en place séquentielle de ces activités kinases est à la base de l'enchainement des phases du cycle cellulaire.

La progression en G1 est coordonnée par les activités de CDK4/cycD et CDK6/cycD. Ces complexes vont d'une part stimuler l'expression de gènes nécessaires à la progression en G1 en phosphorylant la protéine Rb, et d'autre part séquestrer des protéines inhibitrices de CDK2. Grâce à cela et à la synthèse de cycline E, l'activité CDK2 augmente en fin de G1, ce qui entraine la phosphorylation de substrats nécessaire pour donner la compétence aux origines (Mailand and Diffley 2005). L'expression de cycline E chute ensuite brusquement en fin de G1 et CDK2 va former un complexe avec cycline A, ce qui permet l'entrée en phase S. Ensuite c'est CDK1, majoritairement complexé à cycline B qui va entrainer les cellules en mitose (Figure 1).

La dégradation des cyclines en dehors de leur fenêtre d'expression constitue le moteur du cycle cellulaire. Celles-ci sont détruites par la voie du protéasome, grâce à leur ubiquitinylation par les protéines APC/C et SCF. En plus d'être régulé par leur liaison avec les cyclines, les CDK sont aussi régulées positivement ou négativement par des modifications post-traductionnelles réalisées par des phosphatases de la famille CDC25, les kinases CAK (CDK activating kinase), Wee1 et Myt1 (Malumbres and Barbacid 2005). L'activité des CDKs est aussi inhibée par les CDKI (CDK Inhibitors).

Nous nous intéresserons principalement dans cette première partie de l'introduction au rôle des CDKs dans la régulation de la réplication de l'ADN.

A



B

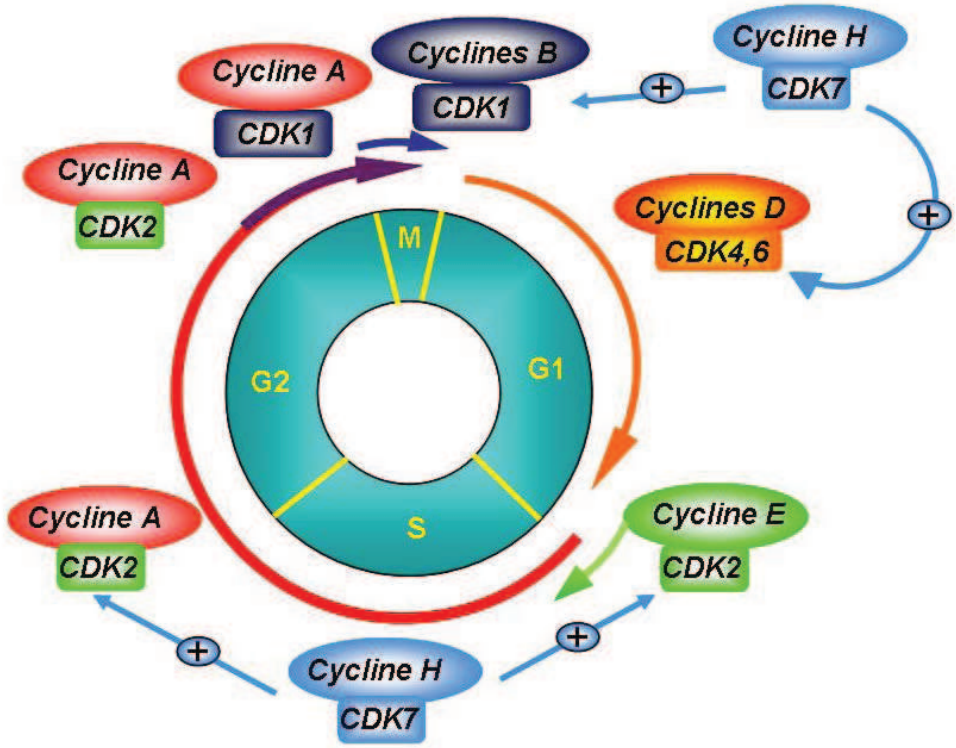


Figure 1. Les complexes cyclines /CDK au cours du cycle cellulaire. **A**. Le déroulement du cycle cellulaire est assuré par l'activation séquentielle des cyclines/CDKs. La séquence d'activation des complexes est assurée par la présence ordonnée des différentes cyclines au cours du cycle cellulaire. Un complexe donné inhibe l'activité du précédent complexe et est nécessaire pour l'activation du prochain complexe. **B**. Les cyclines peuvent s'associer à plusieurs CDK (cycline A à CDK2 puis CDK1) et une CDK peut fixer plusieurs cyclines (CDK1 à la cycline A et aux cyclines B).

1.2 Origines de réplication

Il s'agit du site de démarrage de la réplication de l'ADN. Chez *S. cerevisiae*, les origines de réplication sont spécifiées par des séquences d'ADN appelées « Autonomous Replicating Sequence » (ARS). Ces séquences d'environ 150 pb sont composées d'un consensus de 11 pb appelé ACS et de plusieurs éléments qui contribuent à promouvoir l'initiation (Marahrens and Stillman 1992). La structure des origines de réplication est moins bien définie chez les métazoaires, qui ne semblent pas avoir de séquences spécifiques. Les sites d'initiation correspondent généralement à de larges zones qui tendent à s'organiser en clusters (Lebofsky et al. 2006). Des études récentes basées sur l'utilisation de puces à ADN ont permis de localiser plusieurs centaines d'origines dans le génome humain et ont montré qu'il existe une corrélation entre origines et sites de démarrage de la transcription (Cadoret et al. 2008; Karnani et al. 2009).

1.3 Initiation de la réplication

L'initiation de la réplication sera décrite chez *S. cerevisiae*, car c'est chez cet organisme que ce mécanisme est le mieux connu. Ce processus est très conservé chez tous les eucaryotes et j'indiquerai les aspects qui diffèrent chez les eucaryotes supérieurs.

Le processus de réplication débute en G1 avec la fixation séquentielle aux origines de plusieurs protéines qui forment le complexe pré-réplicatif (pré-RC). A la transition G_1/S, l'action des S-CDK (CDK spécifiques de phase S) et des DDKs (DBF4-dependent kinases) permet le recrutement de facteurs d'initiation au niveau des origines, l'ouverture de l'ADN et l'engagement des ADN polymérases réplicatives (Labib 2010).

1.3.a. Structure du pré-RC

La première étape de l'assemblage du pré-RC comprend la fixation du complexe ORC (Origin Recognition Complex) sur l'origine de réplication. ORC est un complexe de six sous-unités qui va servir de plateforme à la fixation des autres protéines du pré-RC (Bell and

Stillman 1992). Ce complexe se fixe à l'ADN de manière dépendante à l'ATP. Chez *S. cerevisiae*, cette fixation est spécifique à la séquence consensus ACS, alors que chez les eucaryotes supérieurs les déterminants de cette fixation ne sont pas connus. En effet, ORC est capable de lier fonctionnellement n'importe quelle séquence d'ADN chez l'Homme (Schaarschmidt et al. 2004). L'état d'acétylation des histones influence la fixation du complexe ORC chez la Drosophile (Aggarwal and Calvi 2004; MacAlpine et al. 2010) et le Xénope (Danis et al. 2004). Chez le Xénope, ORC se fixe avec beaucoup plus d'affinité sur de l'ADN négativement superenroulé (Remus et al. 2004). Ceci indique que chez les métazoaires, des facteurs épigénétiques plutôt que la séquence de l'ADN déterminent la fixation d'ORC. On ne peut cependant pas exclure que l'absence de séquence consensus pour la fixation d'ORC chez les eucaryotes supérieurs soit liée au très petit nombre d'origines de réplication caractérisées à ce jour.

La fixation d'ORC sur l'ADN permet le recrutement de CDC6 et CDT1, deux protéines nécessaires au chargement du complexe MCM2-7, l'hélicase supposée de la fourche de réplication. Ce recrutement dépend de l'activité ATPase d'ORC et de CDC6 (Bowers et al. 2004; Speck et al. 2005). MCM2-7 est recrutée aux pré-RC sous une forme inactive. Une fois le complexe pré-RC formé, les origines sont compétentes pour la réplication, mais seulement une fraction de celle-ci va être activée durant la phase S (Walter and Newport 1997).

1.3.b. Le complexe d'initiation (IC)

Les pré-RCs sont activés par les kinases CDKs et les DDKs après la transition G_1/S. L'initiation de la réplication requiert le déroulement de l'ADN au niveau de l'origine, la stabilisation de l'ADN simple brin formé et le recrutement des polymérases réplicatives. Ces différentes étapes sont assurées par une deuxième série de facteurs d'initiation, sous le contrôle des CDKs et DDKs (Figure 2).

- ***Les facteurs d'initiation***

Contrairement aux facteurs du pré-RC qui sont chargés à l'origine de façon séquentielle, le recrutement de ces facteurs d'initiation se fait plus de manière interdépendante. Le premier facteur d'initiation recruté est MCM10, qui est requis pour ensuite charger CDC45 (Sawyer et al. 2004). MCM10 interagit avec l'ADN polymérase

α (POLα) (Ricke and Bielinsky 2004). Cette intéraction assure la stabilité de cette polymérase (Yang et al. 2005). Il a été proposé que les protéines MCM10 chargées précocement à la chromatine servent de plateforme pour l'ancrage de MCM10 lié à POLα (Ricke and Bielinsky 2004). La fixation de CDC45 est également nécessaire au chargement des polymérases réplicatives (Mimura et al. 2000). CDC45 se lie au pré-RC et aux polymérases, formant un lien physique entre les facteurs d'initiation et d'élongation. CDC45 se lie aux origines au moment de leur activation, pendant toute la durée de la phase S. Cette protéine est indispensable pour l'initiation mais aussi l'élongation de la réplication car elle intéragit aussi avec les MCMs (Pacek and Walter 2004).

Une série de cribles génétiques chez *S. cerevisiae* a permis d'identifier d'autres facteurs nécessaires à l'activation des pré-RCs. Le premier facteur identifié est DPB11 (Araki et al. 1995). DBP11 (TOPBP1 chez l'Homme) forme un complexe avec la DNA polymérase ε (POLε), ce qui permet son recrutement (ainsi que POLα) aux origines, après CDC45 et RPA (Masumoto et al. 2000). DPB11 est nécessaire au chargement des polymérases, mais ne semble pas se déplacer avec la fourche de réplication. Cette protéine possède aussi une fonction dans l'activation du checkpoint de phase S qui sera détaillée plus tard, ces deux fonctions étant conservées chez le Xénope (CUL5/MUS101) (Hashimoto and Takisawa 2003) et chez les mammifères (TOPBP1).

Un autre crible chez la levure a permis la découverte de nouvelles protéines impliquées dans l'initiation de la réplication : SLD2, SLD3 et SLD5 (Kamimura et al. 1998). SLD2 forme un complexe avec DBP11, POLε et GINS après activation par les CDKs (Muramatsu et al. 2010). SLD3 forme avec CDC45 un complexe qui se fixe aux MCM2-7 avant l'initiation mais contrairement à CDC45, SLD3 ne reste pas lié à la fourche de réplication lors de sa progression (Kanemaki and Labib 2006). Récemment, il a été proposé que le gène Treslin soit son homologue chez les vertébrés (Sanchez-Pulido et al. 2010). Chez le Xénope TRESLIN est nécessaire avec TOPBP1 au chargement de CDC45 aux origines (Kumagai et al. 2010).

Chez la levure, SLD5 interagit avec trois partenaires: PSF1, 2 et 3. Ces quatre protéines forment le complexe GINS, qui interagit avec MCM2-7 et est nécessaire pour l'initiation et l'élongation de la réplication (Gambus et al. 2006). Chez la Drosophile, il a été montré que GINS forme également un complexe avec CDC45 et MCM2-7, appelé complexe CMG (CDC45-MCM2-7-GINS) (Moyer et al. 2006). CDC45 et GINS servent alors de

cofacteur à MCM2-7, qui possède une activité helicase lui permettant de séparer les deux brins d'ADN parentaux (Ilves et al. 2010).

♦ ***Régulation de l'initiation par les CDKs et les DDKs***

Le chargement des facteurs d'initiation aux origines nécessite la présence de deux kinases de phase S, les S-CDKs et les DDKs afin d'activer le complexe CMG, constituant l'hélicase réplicative. Chez *S. cerevisiae* de nombreux facteurs d'initiation sont phosphorylés par les CDKs. Cependant, seulement deux de ces substrats sont nécessaires et suffisants pour provoquer l'initiation de la réplication. Il s'agit de SLD2 et de SLD3, des mutations phosphomimétiques de leurs sites de phosphorylation par les CDKs permettant de se passer totalement des CDKs pour entrer en phase S (Tanaka et al. 2007; Zegerman and Diffley 2007). Il a été proposé récemment que ces phosphorylations permettent la formation d'un nouveau complexe, appelé pré-LC (preloading complex), composé de SLD2, DPB11, POLε et GINS, complexe dont la formation serait un moyen pour les CDKs de réguler l'initiation (Muramatsu et al. 2010). Chez les métazoaires, il existe trois protéines candidates au rôle de SLD3 (DUE-B, TRESLIN et GEMC1) (Fu and Walter 2010). Ces trois protéines ont des sites consensus de phosphorylation par les CDKs et interagissent avec TOPBP1, l'homologue de DPB11.

La kinase DDK est un complexe composé de la sérine/thréonine kinase CDC7 et de la sous unité régulatrice DBF4 chez la levure *S. cerevisiae*. Chez les mammifères, il existe une seconde sous unité régulatrice, DRF1, qui serait nécessaire pour une progression normale en phase S et M (Yoshizawa-Sugata et al. 2005). Chez le Xénope, DRF1 est surtout important pour le développement embryonnaire précoce (Silva et al. 2006). L'activité DDK est essentielle pour l'initiation de la réplication mais ses cibles sont moins bien connues que celles des CDKs. Le complexe DDK agit principalement en activant plusieurs sous unités de MCM2-7. Il a été montré que la phosphorylation de MCM4 permet la liaison de MCM2-7 à CDC45 et leur fixation à la chromatine en phase S (Masai et al. 2006).

♦ ***Chargement des polymérases réplicatives***

Il s'agit de l'étape finale de l'initiation. Les trois ADN polymérases nécessaires à la réplication sont: POLα, POLδ, et POLε. Bien que ces trois polymérases partagent un

domaine catalytique identique, elles ont des fonctions spécialisées lors de l'élongation. Après l'ouverture de l'ADN à l'origine, la protéine RPA vient se fixer sur l'ADN simple brin formé, ce qui permet ensuite le recrutement de POLα. Ces étapes sont séquentielles et dépendantes de la présence de CDC45 (Mimura et al. 2000; Walter and Newport 2000). POLα possède une activité ARN primase qui lui permet de synthétiser des amorces d'ARN sur l'ADN simple brin. C'est la seule ADN polymérase capable d'initier la synthèse *de novo* sur de l'ADN simple brin. Après la synthèse de l'amorce, POLα est remplacée par les polymérases réplicatives POLε sur le brin avancé et POLδ sur le brin retardé.

Œuvre non reproduite par respect du droit d'auteur

Figure 2. Modèle de la dynamique d'activation d'une origine de réplication eucaryote. La fixation à l'origine du complexe ORC est la première étape, suivi de la fixation des autres protéines du complexe pré-réplicatif (pré-RC), Cdt1, Cdc6 et Mcm2-7. Les pré-RC sont assemblés en G1 dans une fenêtre où les activités des CDK et DDK sont basses (window of opportunity). La remontée de l'activité CDK ferme la fenêtre dans laquelle il était possible au pré-RC de se fixer. Les protéines du complexe de pré-initiation (pre-IC) viennent ensuite se fixer: Cdc45 (*45*), Mcm10 (*10*), le complexe GINS, Sld2, Sld3, Dbp11, la polymérase α (*Pol*α), POLε (ε) et RPA qui va stabiliser l'ADN simple brin déroulé. L'augmentation de l'activité DDK permet l'initiation de la réplication. (Figure adapté de *Schepers and Papior 2010 Genome Research*)

1.3.c. Inhibition de la re-réplication par la régulation du pré-RC

Afin d'éviter qu'une origine s'active deux fois au cours du même cycle cellulaire, la cellule a mis en place des mécanismes empêchant la réactivation d'une origine au cours de la phase S. Pour cela, la préparation des origines est limitée à la phase G1 (licensing) et n'est plus possible en phase S. Les pré-RCs sont démantelés une fois que la réplication démarre et il existe des mécanismes empêchant leur reformation au cours de la phase S.

- ***Inhibition de la réinitiation par les CDKs***

Au cours de la phase G1, le niveau de CDK est bas, ce qui permet la formation du pré-RC. Lors de la transition vers la phase S, le niveau de CDK augmente, ce qui a deux conséquences importantes: d'une part l'activation des origines entraine le désassemblage du pré-RC et d'autre part le niveau élevé d'activité CDK inhibe la formation de nouveaux pré-RCs. Ainsi, dans les cellules humaines, la phosphorylation de CDC6 entraine sa relocalisation dans le cytoplasme au cours de la phase S (Delmolino et al. 2001). De même, la phosphorylation de CDT1 entraine sa dégradation (Liu et al. 2004), la phosphorylation des MCMs a pour conséquence leur exclusion du noyau (Liku et al. 2005) et la phosphorylation de ORC2 et ORC6 empêche le réassemblage du pré-RC (Nguyen et al. 2001). Le niveau de CDK reste élevé jusqu'à la transition M/G_1, où les cyclines sont dégradées, ce qui permet un nouveau cycle d'assemblage des pré-RCs.

- ***Inhibition de CDT1 par la GEMININE et par CUL4-DDB1***

Les métazoaires possèdent, avec la GEMININE, un deuxième type de mécanisme permettant d'éviter la re-réplication. La GEMININE forme un complexe avec CDT1 sur la chromatine (Xouri et al. 2007) qui pourrait empêcher la réactivation d'une origine au cours d'un même cycle. Il a été proposé que ce ne soit pas directement la formation du complexe qui inhibe la re-réplication mais plutôt une augmentation progressive du niveau de Géminine au cours de la phase S qui va modifier la stœchiométrie du complexe

CDT1/Géminine, et ainsi inhiber le recrutement des MCMs aux origines (Lutzmann et al. 2006). Il a par ailleurs été proposé que MCM9, une autre protéine nécessaire au chargement de MCM2-7 sur les origines, agisse comme régulateur de la stœchiométrie CDT1/Géminine en se fixant sur CDT1 et en empêchant la fixation d'un excès de Géminine (Lutzmann and Mechali 2008). De plus l'E3 ligase CUL4-DDB1 va dégrader CDT1 en phase S (Kim and Kipreos 2007). Il a été montré par ailleurs que l'absence de CUL4 entraine une accumulation de γ-H2AX en phase S (Olma et al. 2009). Il a été proposé que l'homologue chez la levure soit impliqué dans l'activation de la RH dans le redémarrage des fourches de réplication arrétées chez la levure (Duro et al. 2008).

1.4 Elongation de la réplication

L'élongation a lieu au niveau de fourches de réplication qui progressent de façon bidirectionnelle à partir de chaque origine et qui avancent à la même vitesse (Conti et al. 2007). Chaque fourche est associée à un ensemble de protéines appelé le réplisome. Le brin avancé et le brin retardé sont répliqués de façon coordonnée au sein de ce complexe, même si le brin retardé est synthétisé dans le sens contraire de la progression de la fourche.

1.4.a. Changement de polymérases et fragments d'Okazaki

Le changement de polymérases entre POLα d'une part et POLδ et POLε d'autre part permet d'augmenter la vitesse et la fidélité de la réplication. Les polymérases δ et ε ont une plus grande processivité et possèdent une activité exonucléase permettant une « relecture » et donc un taux d'erreur plus faible que POLα. L'homotrimère PCNA est nécessaire à la processivité de ces protéines. PCNA forme un anneau autour de l'ADN qui permet de lier topologiquement l'ADN à la polymérase. Elle sert aussi de plateforme pour coordonner la réplication avec plusieurs autres mécanismes (Figure 3) (Moldovan et al. 2007), et activer la réparation de l'ADN (voir partie suivante). Le « clamp » de PCNA est chargé à la chromatine par un « clamp loader », appelé RFC. POLε est responsable de la synthèse du brin avancé (Pursell et al. 2007) alors que POLδ est impliquée dans la synthèse du brin retardé

(Nick McElhinny et al. 2008). La réplication du brin retardé se fait en plusieurs étapes: initiation par POLα grâce à son activité ARN primase, élongation limitée de l'amorce ARN par l'activité ADN polymérase de POLα, changement de polymérase avec le remplacement de POLα par POLδ, élongation par POLδ et maturation du fragment d'Okazaki. La maturation est le déplacement de l'amorce d'ARN par POLδ, l'excision par l'endonucléase FEN1 et la ligation des deux brins par l'ADN ligase (Garg et al. 2004; Rossi and Bambara 2006).

Œuvre non reproduite par respect du droit d'auteur

Figure 3. Liste de protéines interagissant avec PCNA. Ici est listé une sélection d'activités dépendantes de PCNA et les protéines correspondantes interagissant avec PCNA. Les protéines en orange contiennent un domaine conservé PIP (PCNA interacting protein) box, qui leur permet de venir se fixer spécifiquement sous la boucle connectant plusieurs domaines signalé en orange sur PCNA. *(Figure tirée de Moldovan et al, Cell 2007)*

1.4.b. Les protéines du réplisome

En plus des ADN polymérases, toute une série de protéines participent à l'élongation de la réplication au sein du réplisome. Certaines font le lien entre réplication et d'autres fonctions liées à l'ADN comme le checkpoint de phase S ou l'établissement de la cohésion entre chromatides sœurs.

- ***Le complexe CMG***

Le complexe CMG (CDC45, MCM2-7 et GINS) fait partie intégrante du réplisome (Pacek et al. 2006). CMG est considéré comme l'hélicase réplicative au cours de la réplication, CDC45 et GINS servant de cofacteurs (Moyer et al. 2006). GINS pourrait aussi servir de lien entre les MCM et CDC45 au sein de ce complexe (Gambus et al. 2006).

- ***MCM8***

MCM8 est une protéine uniquement décrite chez les eucaryotes supérieurs. Contrairement aux autres MCM, elle ne serait pas requise pour l'initiation, mais serait nécessaire pour la progression des fourches (Maiorano et al. 2005).

- ***Topoisomerase 1 (TOP1)***

Cette protéine est nécessaire pour relâcher les super-tours positifs de l'ADN générés par l'avancée de la fourche de réplication (Kim and Wang 1989 ; Tuduri et al. 2009). Son inactivation chez la levure n'a d'influence sur la réplication que si elle est combinée à la mutation de TOP2 (Bermejo et al. 2007), ce qui indique que la topoisomérase 2 est également impliquée dans la réplication (Lucas et al. 2001). Chez l'Homme, TOP1 joue également un rôle supplémentaire pour limiter l'interférence entre réplication et transcription (Tuduri et al. 2009).

♦ ***Complexe CLASPINE-TIMELESS-TIPIN (MRC1-TOF1-CSM3 chez la levure)***

MRC1/CLASPINE a été initialement découvert comme étant un médiateur de l'activation du checkpoint de phase S chez la levure (Alcasabas et al. 2001) et les métazoaires (Kumagai and Dunphy 2000). Il a par ailleurs été montré que MRC1 est nécessaire à la progression normale des fourches de réplication, indépendamment de sa fonction checkpoint (Szyjka et al. 2005; Tourriere et al. 2005). MRC1 est également nécessaire au redémarrage des fourches bloquées par des agents génotoxiques (Tourriere et al. 2005). TOF1 et CSM3 sont également impliqués dans l'arrêt programmé des fourches de réplication au niveau de sites naturels de pause chez la levure (Calzada et al. 2005). TOF1 et CSM3, ainsi que leurs homologues chez les mammifères, forment un complexe tout au long de la phase S (Yoshizawa-Sugata and Masai 2007). Les fonctions de ces protéines chez la levure et l'Homme seront détaillées dans la deuxième partie de l'introduction.

♦ ***CTF4***

Cette protéine, chez la levure, est impliquée dans l'établissement de la cohésion entre chromatides-sœurs (Hanna et al. 2001). Elle interagit avec POLα (Zhou and Wang 2004) et le réplisome au cours de l'élongation (Gambus et al. 2006). Dans des cellules humaines, cette protéine interagit directement avec les polymérases réplicatives et est nécessaire à la progression des fourches de réplication (Gambus et al. 2009; Bermudez et al. 2010).

♦ ***FACT***

C'est un complexe chaperon d'histone essentiel pour la transcription car il facilite le passage des RNA polymérases en facilitant la déstabilisation et le réassemblage des nucléosomes (Belotserkovskaya et al. 2003). Chez la levure, FACT est présent au niveau du réplisome (Gambus et al. 2006), où il interagit avec les MCMs après ubiquitinylation par l'E3 ligase RTT101 (Han et al. 2010).

- ***MCM10***

Cette protéine, nécessaire au chargement de POLα lors de l'initiation, est également impliquée dans l'élongation chez la levure (Ricke and Bielinsky 2004). En revanche, dans des cellules humaines, elle ne semble plus être présente à la fourche au moment de l'élongation (Izumi et al. 2004).

1.5 Le programme de réplication

1.5.a. Programme temporel d'activation des origines

Il est connu depuis longtemps que les génomes eucaryotes présentent des profils de réplication étalés dans le temps, chaque région du génome étant répliquée à un moment précis de la phase S. Chez la levure *S. cerevisiae*, il a été montré que ce programme temporel est contrôlé au niveau de l'activation des origines. Certaines origines sont activées très précocément au cours de la phase S alors que d'autres sont activées plus tardivement (Raghuraman et al. 1997). Chez *S. cerevisiae* des études pan-génome ont permis de montrer que les origines sont activées tout au long de la phase S, avec un pic en milieu de S (Raghuraman et al. 2001). Chez la levure, le timing d'activation des origines est déterminé dès la phase G1 (Raghuraman et al. 1997), en grande partie par le contexte chromatinien des origines (Vogelauer et al. 2002). Le checkpoint de réplication contrôle aussi le programme temporel de réplication au cours d'une phase S normale (Shirahige et al. 1998)

Les expériences utilisant des puces à ADN ne permettent pas de différencier le temps et l'efficacité d'activation d'une origine (Raghuraman et al. 2001). Malgré cela, il a été montré par peignage moléculaire que l'activation des origines dans une région donnée varie entre deux cellules chez la levure (Tuduri et al. 2010), comme dans des cellules humaines (Lebofsky et al. 2006). Il a été proposé un modèle dans lequel l'activation des origines est stochastique mais chaque origine a une probabilité d'activation propre et cette probabilité augmente au cours de la phase S (Rhind et al. 2010). Une origine avec une forte probabilité d'activation aura tendance à être activée précocement alors qu'une origine avec une faible probabilité d'activation aura tendance à s'activer plus tardivement ou à être répliquée passivement.

Par ailleurs, une grande partie des origines ayant formé un pré-RC en G1 ne s'activent pas au cours d'une phase S normale et sont répliquées passivement par des fourches issues d'origines adjacentes. Ces origines sont appelées origines dormantes. Les mécanismes définissant ces origines comme dormantes sont actuellement très mal connus. En revanche, ces origines peuvent s'activer en réponse au ralentissement des fourches de réplication (Courbet et al. 2008) ou lors de l'activation du checkpoint de phase S (Ge et al. 2007; Ibarra et al. 2008; Tuduri et al. 2009). Elles sont nécessaires à la survie des cellules en condition de stress (Ge et al. 2007).

1.5.b. Programme de réplication et transcription

De nombreuses observations montrent que l'euchromatine est généralement répliquée précocement et que l'hétérochromatine est plutôt répliquée en fin de phase S. Cette corrélation entre timing de réplication et expression génique ne se retrouve pas chez *S. cerevisiae* (Raghuraman et al. 2001). En revanche, elle est observée chez *D. melanogaster* (MacAlpine et al. 2004) et dans des cellules humaines (Woodfine et al. 2005), où il a été montré récemment une corrélation entre sites de démarrage de la réplication et de la transcription (Cadoret et al. 2008; Karnani et al. 2010). Il est vraisemblable que cette corrélation reflète une plus grande accessibilité de la chromatine au niveau des gènes actifs, ce qui favoriserait l'initiation précoce de la réplication (Hansen et al. 2010).

1.5.c. Corrélation avec le niveau de compaction de la chromatine

Il est maintenant bien établi que les régions répliquées précocement correspondent à des zones de chromatine ouverte (Gilbert et al. 2004 ; Hiratani et al. 2008). Ainsi, l'accessibilité de la chromatine mesurée par des expériences de cartographie de la sensibilité à la DNase I a montré une forte corrélation entre euchromatine et réplication précoce (Hansen et al. 2010). Par contre, on ne sait toujours pas si l'hétérochromatine est une cause ou une conséquence de la réplication tardive. La réplication en fin de phase S pourrait en effet servir de repère pour l'établissement de l'hétérochromatine en fin de phase S (Farkash-Amar and Simon 2010).

1.5.d. Plasticité au cours du développement et de la différenciation

Chez les eucaryotes, développement et différenciation sont souvent synonymes de changement de timing de réplication. Chez les métazoaires, le développement embryonnaire, entraine des changements massifs dans l'expression génique, souvent accompagnés d'un remodelage de la chromatine. Il a ainsi été montré dans le cas du gène codant la chaine lourde des immunoglobulines un changement de profil d'activation des origines au cours du développement des lymphocytes B, avec activation séquentielle de clusters d'origines associée à des changements dans la structure chromatinienne et dans l'activité transcriptionnelle (Norio et al. 2005). Cela a aussi été montré à l'échelle du génome dans des cellules souches embryonnaires de souris lors de leur différenciation en précurseurs neuronaux, où de grands domaines de plusieurs mégabases changent de façon coordonnée de timing de réplication dans 20% du génome (Hiratani et al. 2008). Il a par ailleurs été montré que différents types cellulaires humains présentaient des variations dans leur profil de réplication touchant jusqu'à 50% du génome (Hansen et al. 2010).

2 Mécanismes de surveillance de l'intégrité du génome

2.1 Les différents types de checkpoints chez les mammifères

Il est crucial pour la cellule de transmettre à sa descendance une copie complète et fidèle du patrimoine génétique. Pour cela, il existe plusieurs mécanismes de contrôle, appelés checkpoints, dont la fonction est de surveiller l'intégrité du patrimoine génétique. Il existe plusieurs voies de checkpoints capables de bloquer le cycle lorsque la cellule détecte des dommages de l'ADN. Ces checkpoints activent des cascades de signalisation qui peuvent bloquer la progression du cycle cellulaire, mais aussi ralentir la progression de la phase S lorsque l'ADN est endommagé. La réponse aux lésions de l'ADN se déroule selon un schéma précis : des **senseurs** détectent des structures anormales de l'ADN (Shiloh 2003; Paulsen and Cimprich 2007) et transmettent un signal via des **adaptateurs** qui vont agir sur un certain nombre d'**effecteurs** et induire une réponse adéquate (Stracker et al. 2009). Par exemple, ce checkpoint peut induire un blocage du cycle cellulaire et activer des voies de réparation de l'ADN, ou encore activer l'apoptose afin d'éliminer la cellule dont le génome est trop endommagé. Les protéines impliquées dans ces voies sont conservées de la levure à l'Homme. Les checkpoints de G1/S, S et G2/M sont fonctionnellement distincts mais partagent des senseurs communs. Il s'agit par exemple des protéines de la famille des « phosphoinositide 3-kinase-related kinases» (PIKKs), dont les kinases « ataxia-telangiectasia-mutated (ATM) » et « ATM-RAD3-related (ATR) », qui sont des régulateurs principaux de la réponse aux dommages de l'ADN (Abraham 2001).

Le checkpoint de G1/S entraine un arrêt provisoire ou définitif des cellules en G1. Il implique les voies ATR/CHK1, ATM/CHK2 et P53/MDM2-P21 (Lukas et al. 2004). L'activité d'ATM/CHK2 est constante tout au long de G1, alors que l'activité ATR/CHK1 n'augmente qu'à la transition G1/S. Les voies ATM et ATR agissent sur la voie P53, qui inhibe la kinase CDK2/cycE et permet la transition G1/S. Le checkpoint de phase S est activé en réponse à des dommages de l'ADN au cours de la phase S. Il comprend principalement les voies ATR/CHK1 et ATM/CHK2. Ce checkpoint permet l'arrêt réversible de la phase S, la

stabilisation des fourches de réplication et l'inhibition des origines de réplication tardives. (Ces fonctions vont être détaillées dans les paragraphes suivants). Le checkpoint de G2/M permet d'arrêter le cycle cellulaire avant la ségrégation des chromosomes. Il dépend des protéines de la famille des PIKKs, ATM, ATR et DNA PK, qui entrainent l'activation d'une voie de signalisation inhibant CDK1, le régulateur principal de l'entrée en mitose (Lukas et al. 2004). Ce mécanisme est assez mal connu, même s'il a été montré récemment l'importance de deux classes d'ubiquitine ligase, SCF et APC/C, dans la régulation de différentes protéines de checkpoint, et notamment CLASPINE (Bassermann et al. 2008).

2.2 Activation du checkpoint de phase S

Dans des conditions normales de croissance, les fourches progressent à partir d'origines de réplication jusqu'à ce qu'elles rencontrent d'autres fourches progressant en sens opposé. Si elles rencontrent des obstacles d'origine exogènes ou endogènes, leur progression peut être ralentie ou bloquée. Ces arrêts de fourches sont détectés par le checkpoint de phase S, à condition qu'un nombre suffisant de fourches soient impliquées (Shimada et al. 2002).

2.2.a. Obstacles naturels de la fourche de réplication

- ***Stress oxydatif***

Le stress oxydatif est généré par différentes sources exogènes et endogènes. La principale source endogène est liée au métabolisme aérobie, qui produit au sein même de la cellule des espèces oxygénées (ROS) hautement réactives (radicaux libres oxygénés, ions superoxyde) lorsque la balance oxydation-réduction n'est plus à l'équilibre. Ces espèces réactives oxygénées peuvent alors notamment attaquer la molécule d'ADN. Dans ce cas, ceci conduit à la déamination des bases par hydrolyse (dépurination et dépyrimidination), formant ainsi des sites apuriques ou apyrimidiques, qui peuvent perturber la réplication. Les ROS peuvent aussi produire des oxydations des bases sur certains sites nucléophiles.

♦ ***Interférence avec la transcription***

Il a été montré chez la levure que la réplication de gènes fortement transcrits peut causer une instabilité génétique (Aguilera and Gomez-Gonzalez 2008). Ce phénomène, appelé recombinaison induite par la transcription (TAR), peut être causé par deux types d'évènements. Il s'agit d'une part de collisions entre machinerie de transcription et de réplication. Ces collisions peuvent entrainer un désassemblage ou une réversion de la fourche de réplication. D'autre part, l'interférence entre réplication et transcription peut être causée par des hybrides ADN/ARN appelés R-loops. Les R-loops sont formées lors de la transcription lorsque le brin d'ARN naissant n'est pas rapidement assemblé en particule nucléoprotéique et se réassocie avec l'ADN (Aguilera and Gomez-Gonzalez 2008; Tuduri et al. 2009). Ces structures peuvent entrainer des arrêts et des cassures de la fourche de réplication, qui sont ensuite réparées par recombinaison homologue (Gottipati et al. 2008). Alternativement, la formation de R-loops laisse le brin non codant sous forme d'ADN simple brin, qui est donc plus vulnérable et peut alors subir des lésions ou former des structures secondaires (Figure 4). Ces données pourraient expliquer qu'une partie du génome humain soit organisé de façon colinéaire pour la réplication et la transcription afin de limiter ce type d'interférence (Huvet et al. 2007).

Œuvre non reproduite par respect du droit d'auteur

Figure 4. Modèles d'interférences entre réplication de l'ADN et transcription. **A**. Collision directe entre le réplisome et la polymérase qui peut causer une pause de la fourche, puis une dissociation du réplisome et/ou une réversion de la fourche. Cela implique que la réplication et la transcription soit simultanées. **B**. Dans le cas de formation de R-loops, les hybrides ADN-ARN formés durant la transcription vont interférer avec la progression de la fourche de réplication et induire du TAR. Cependant, il n'est pas connu si c'est l'hybride ADN-ARN lui-même qui bloque la fourche ou si c'est l'ADN simple brin complémentaire qui est plus succeptible d'accumuler des lésions et donc de bloquer les fourches *(Figure tirée de Poveda et al., Transcription 2010)*

♦ ***Autres types de barrières de réplication***

Il a été montré chez la levure *S. cerevisiae* que d'autres types d'obstacles naturels interfèrent avec la progression des fourches de réplication. Les mieux connus sont les barrières localisées en amont des gènes codant pour les ARN ribosomiques (Rothstein et al. 2000). Il s'agit ici d'arrêts de fourche programmés, qui dépendent de la protéine FOB1 et qui n'activent pas le checkpoint de phase S. Ces barrières sont polaires et arrêtent uniquement les fourches qui progressent en sens opposé de la machinerie de transcription. D'autres sites de pause ont aussi été identifiés au niveau des tRNAs, des centromères ou des origines de réplication inactives (Greenfeder and Newlon 1992; Tourriere and Pasero 2007). Des structures secondaires formées par l'ADN peuvent aussi bloquer la fourche de réplication. Cela est souvent dû à des répétitions de séquences d'ADN entrainant la formation de structures secondaires stables comme des structures en épingle à cheveux (hairpins) ou des triplexes ou des quadriplexes d'ADN (Hyrien 2000).

2.2.b. Agents génotoxiques bloquant la fourche de réplication

Dans ce paragraphe, je présenterai quelques inhibiteurs des fourches de réplication couramment utilisés au laboratoire ou en clinique, que j'ai utilisé au cours de ma thèse.

♦ ***Inhibiteurs de synthèse de l'ADN : Hydroxyurée (HU) et Aphidicoline***

L'HU est un inhibiteur de la Ribonucléotide Réductase (RNR), qui est l'enzyme assurant la réduction des ribonucléotides en désoxyribonucléotides (dNTPs) utilisables pour la synthèse d'ADN. L'HU accapare les radicaux tyrosyl libres présents sur les ribonucléotides et entraine alors une diminution du pool de dNTPs disponible pour la réplication. Ainsi l'HU induit un ralentissement des fourches pouvant les arrêter à forte dose. La concentration utilisée dans mes expériences (100 µM pendant 2 h) induit un ralentissement conséquent des fourches de réplication, sans les bloquer complètement. Il est à noter qu'à des concentrations plus importantes et des temps plus longs, l'HU induit des cassures double brin dans des

cellules de mammifères (Saintigny et al. 2001). L'aphidicoline est un compétiteur du dCTP pour la fixation sur les polymérases réplicatives. Cette drogue bloque ainsi le processus d'élongation de la réplication sans interférer avec la synthèse de l'ARN ou des protéines. L'aphidicoline provoque le découplage entre l'activité hélicase associée au complexe CMG et les polymérases (Pacek et al. 2006). L'arrêt induit par l'aphidicoline est réversible.

- ***Les rayonnements ultra-violets (UV)***

Les rayonnements UV peuvent être divisés en trois types : les UV-A, qui ont un spectre d'émission entre 320 et 400 nanomètres, les UV-B (entre 280 et 320 nm) et les UV-C qui émettent entre 200 et 280 nm. Les UV-A sont les plus génotoxiques car ils induisent la formation d'espèces oxygénées dans les cellules (ROS) qui ont les mêmes conséquences que les radicaux libres d'origines endogènes. Les UV-B et UV-C, sont directement absorbés par l'ADN et induisent des réactions de dimérisation de pyrimidines adjacentes, avec formation d'une liaison covalente entre les bases. Deux types de photoproduits sont observables: les 6-4 photoproduits reliant une cytosine et une thymine et les dimères de thymine. Ces pontages provoquent une distorsion de la double hélice d'ADN qui empêche le passage de la machinerie réplicative.

- ***Oxaliplatine***

L'oxaliplatine est un agent anticancéreux de synthèse du groupe des agents dérivés de platine. Cette drogue agit en formant des adduits de platine sur l'ADN, majoritairement des ponts intra brins entre guanines adjacentes, ce qui inhibe la synthèse de l'ADN. L'oxaliplatine offre l'avantage de former des adduits sur l'ADN plus stables que d'autres dérivés du platine car moins bien reconnu par certains mécanismes de réparation (Chaney et al. 2005).

2.3 Cascade d'activation du checkpoint de phase S

La cellule a mis en place des voies de signalisation pour répondre aux dommages de l'ADN et préserver l'intégrité de son génome. Ces voies de signalisation sont organisées en un réseau complexe de protéines qui, par des jeux de modifications post-traductionnelles, ralentissent ou stoppent la progression du cycle cellulaire. Selon l'importance des lésions, cela peut soit conduire les cellules en sénescence ou en apoptose, soit permettre la survie des cellules en activant des mécanismes tels que la transcription, la réparation ou la tolérance des lésions. Nous allons maintenant détailler les voies ATR/CHK1 (checkpoint de réplication) et ATM/CHK2 (checkpoint de dommages à l'ADN), qui sont les principales voies de signalisation de ce checkpoint en phase S (Figure 5). Ces deux voies sont étroitement liées et très complémentaires. Même si elles ne sont pas activées par les mêmes types de dommages, il est fréquent qu'elles soient activées en parallèle, soit parce qu'une drogue entraine plusieurs types de dommages soit qu'un type de dommage est converti en un deuxième type, activant ainsi la deuxième voie. De plus, elles ne sont pas actives au même moment, ATR/CHK1 étant surtout efficace en fin de G1 et en phase S alors qu'ATM/CHK2 peut être activé tout au long du cycle cellulaire. En revanche, la majorité des mécanismes activés par ces voies sont communs. Nous insisterons plus particulièrement sur la voie ATR/CHK1, pour laquelle nous comparerons les connaissances actuelles chez la levure et chez les mammifères.

Œuvre non reproduite par respect du droit d'auteur

Figure 5. Schéma global des voies d'activation des checkpoints après cassure double brin ou arrêts de fourche de réplication. **A**. L'apparition d'une cassure double brin de l'ADN entraine le recrutement d'ATM. Le signal produit par l'activation d'ATM est alors amplifié par les protéines médiatrices (MDC1, 53BP1, MRN et BRCA1) puis transmis aux protéines effectrices CHK2 et p53. Cela permet la phosphorylation de CDC25A qui va être dégradé. En conséquence, CDK2 n'est plus phosphorylé et reste inactive, ce qui inhibe la transition G1/S. Une autre voie met en jeu le facteur de transcription p21, qui est directement stabilisé par ATM et entraine la transcription des inhibiteurs de CDKs. **B**. En cas d'arrêts de fourches de réplication et d'apparition d'ADN simple brin, ATR est recruté au niveau de la cassure puis activé grâce à TOPBP1, RAD17 et le complexe 9-1-1. Puis grâce à la présence des médiateurs (Claspine, Timeless, Tipine et BRCA1), CHK1 va être phosphorylé et donc activé, ce qui permet la dégradation de CDC25A et une inhibition de la progression en phase S car CDK2 n'est plus phosphorylé. **C**. Lorsqu'une cassure double brin est résectée, cela entraine l'apparition d'ADN simple brin ce qui mène à l'activation d'ATM et d'ATR et de leurs voies de transduction respectives. *(Figure adaptée de Löbrich et Jeggo, Nature review cancer 2007)*

2.3.a. Voie ATM/CHK2

Le gène ATM lorsqu'il est muté chez des patients atteints de la maladie ataxia-telangiectasia, entraine une forte sensibilité aux radiations, un vieillissement prématuré, et une forte prédisposition aux cancers.

♦ ***Détection de la cassure et recrutement des médiateurs***

Cette voie est activée en réponse aux cassures doubles brins dans le génome. L'événement le plus précoce de cette voie est le recrutement du complexe MRN, composé des protéines MRE11, RAD50 et NBS1 (Mirzoeva and Petrini 2001). Cela permet le recrutement d'ATM au niveau de la cassure et sa monomérisation. La protéine ATM existe sous forme multimérique qui se dissocie en monomères lors de son activation (Bakkenist and Kastan 2003). Il a été montré que l'induction de cassures doubles brins entraine l'autophosphorylation de la Serine 1981 et la monomérisation d'ATM (Bakkenist and Kastan 2003). Cependant, l'importance fonctionnelle de cette autophosphorylation à été remise en cause par la suite chez la souris (Pellegrini et al. 2006). ATM activé phosphoryle ensuite la Serine 139 du variant d'histone H2AX sur plusieurs mégabases autour de la cassure (Fernandez-Capetillo et al. 2004). MRN et H2AX phosphorylé (γ-H2AX) permettent l'amplification du signal en recrutant d'autres protéines médiatrices (Berkovich et al. 2007). Il a été proposé que ce recrutement au niveau de γ-H2AX permette d'augmenter la concentration locale de ces protéines à la cassure. ATM est aussi acétylé au niveau de la Ser-3016 par l'acétyl transférase TIP60 et son cofacteur TRRAP (Sun et al. 2005; Sun et al. 2007). Ceci permet ensuite le recrutement des protéines médiatrice BRCA1 et 53BP1 (Murr et al. 2006). TIP60 est recruté à la cassure par MRN, via son interaction avec l'histone H3 triméthylé sur la lysine K9 (Sun et al. 2009). La phosphorylation de H2AX permet quand à elle, le recrutement de la protéine médiatrice MDC1 (Stucki et al. 2005). MDC1 activé participe au recrutement d'autres protéines médiatrices de cette voie : RNF8, UBC13, CK2, NBS1 et RAP80 et Abraxas, qui forment un complexe avec BRCA1 (Reinhardt and Yaffe 2009). MDC1, phosphorylée par ATM et CK2, augmente la fixation du complexe MRN et d'ATR à la cassure, formant une boucle d'auto amplification d'ATM. MDC1 et 53BP1 jouent

un rôle dans la réparation de l'ADN par recombinaison homologue (RH) pour MDC1 (Xie et al. 2007) ou liaison des extrémités non homologues (NHEJ) pour 53BP1 (Dimitrova et al. 2008)

♦ ***Fonctions d'ATM***

Une fois activée, ATM va avoir principalement trois fonctions : contrôle du cycle cellulaire, activation des mécanismes de réparation de l'ADN et gestion des télomères.

Les principales protéines phosphorylées par ATM pour le contrôle du cycle cellulaire sont P53, MDM2 et CHK2. P53 est une protéine suppresseur de tumeur qui joue un rôle central dans la décision d'une cellule d'entrer ou non en apoptose après un stress génotoxique, une hypoxie ou l'activation d'oncogènes. P53 joue un rôle critique dans la gestion de la transition G1/S (Kastan et al. 1991). La phosphorylation de P53 et de MDM2 permet l'activation de P53 et l'induction de ses gènes cibles, comme par exemple p21, un inhibiteur du complexe CDK2/cycE bloquant l'entrée en phase S (Bartek and Lukas 2001). S'il y a trop de cassures et que l'accumulation de P53 dépasse un certain seuil, P53 active alors des gènes pro-apoptotiques comme Bax, Puma ou le récepteur Fas, entrainant l'apoptose de la cellule (Roos and Kaina 2006).

En phase S, la phosphorylation de CHK2 par ATM induit sa multimérisation et son autophosphorylation, ce qui augmente son activité. CHK2 phosphoryle CDC25A, ce qui induit la dégradation de cette phosphatase activatrice de CDK2, et empêche ainsi l'activation de nouvelles origines de réplication. De même, l'activation d'ATM est nécessaire à l'arrêt des cellules en G2/M (Lavin and Khanna 1999), CHK2 entrainant la dégradation des phosphatases CDC25B et C, qui sont nécessaires pour activer la kinase mitotique CDK1/cycB.

Un autre rôle de la voie ATM/CHK2 est d'activer les mécanismes de réparation des cassures double brin de l'ADN. Il a été montré que lorsqu'on induit des cassures doubles brins en absence d'ATM, ces cassures persistent, ce qui entraine une hypersensibilité aux agents génotoxiques (Foray et al. 1997). Pour réparer ces cassures, la cellule possède deux types de mécanismes : la RH et le NHEJ. Le choix du mécanisme utilisé dépend de nombreux paramètres comme le type de cellule ou l'étape du cycle cellulaire au cours de laquelle va avoir lieu la réparation. Chez la levure, le principal mécanisme utilisé est la RH, alors que le NHEJ est plus utilisé chez les eucaryotes supérieurs. Par ailleurs, comme la RH utilise

préférentiellement les chromatides sœurs pour réparer, elle est surtout efficace en phase S et G2. De plus, la liaison de BRCA2 avec CHK1, qui est indispensable à la RH, est régulé par phosphorylation par une CDK (Esashi et al. 2005) et donc ne peut avoir lieu qu'en phase S. Les voies de RH et NHEJ ont de nombreuses protéines en commun, comme PARP-1, RAD18 ou DNA-PKcs, une PI3K kinase également impliquée dans la réparation par NHEJ. Certaines protéines de la voie ATM/CHK2 sont aussi impliquées dans la RH et le NHEJ comme ATM ou H2AX (Shrivastav et al. 2008). Il a été proposé récemment que DNA-PKcs et ATM pourraient co-réguler la RH et le NHEJ (Shrivastav et al. 2008). CHK1 et CHK2 régulent la liaison entre BRCA1 et RAD51, étape indispensable du processus de la RH (Bahassi et al. 2008). Pour finir, la voie ATM/CHK2 est également impliquée dans le maintien des télomères, qui s'apparentent à des cassures double brin (Sabourin and Zakian 2008). C'est aussi le cas du complexe MRN, qui est retrouvé associé aux télomères (Zhu et al. 2000).

2.3.b. Voie ATR/CHK1

- ***Activation d'ATR***

Les ADN polymérases réplicatives de mammifères s'arrêtent lorsqu'elles rencontrent un obstacle ou lorsque leur activité enzymatique est inhibée. Dans ces conditions, l'hélicase réplicative continue pendant une courte période à séparer les brins parentaux. Ce découplage hélicase/polymérase génère de l'ADN simple brin (ssDNA), qui est reconnu par la kinase ATR comme un signal de stress réplicatif (Byun et al. 2005). La protéine RPA se fixe sur l'ADN simple brin ainsi généré, ce qui permet le recrutement d'ATR au niveau de la fourche de réplication bloquée via la protéine ATRIP (Cortez et al. 2001). RPA-ssDNA est suffisant pour recruter le complexe ATR-ATRIP, mais pas pour l'activer. La colocalisation avec le complexe RAD9-RAD1-HUS1 (9-1-1) est également nécessaire. Il a été montré chez la levure que 9-1-1, qui est un complexe en forme d'anneau, se fixe à la jonction entre l'ADN simple brin couvert par RPA et l'ADN double brin (Majka et al. 2006). La présence du complexe RAD17-RFC est nécessaire au chargement du 9-1-1 (Ellison and Stillman 2003). L'activation totale du checkpoint nécessite enfin l'interaction d'ATR-ATRIP avec TOPBP1. Cette interaction stimule l'activité kinase d'ATR dans des extraits d'œufs de Xénope et de cellules humaines (Kumagai et al. 2006). Elle est favorisée par la localisation de TOPBP1 aux fourches arrêtées via son interaction avec le complexe 9-1-1 (Figure 6) (Delacroix et al. 2007;

Lee et al. 2007). Il a de plus été montré récemment que TOPBP1 est nécessaire au chargement de 9-1-1 et de POLα à la fourche arrêtée, et que POLα est aussi nécessaire au chargement de 9-1-1 (Yan and Michael 2009). Il est à noter que la fonction « activation du checkpoint » de TOPBP1 est distincte de la fonction « initiation de la réplication » (Yan et al. 2006). En conclusion, l'activation d'ATR nécessite deux types de signaux indépendants, afin d'éviter une activation inappropriée de la voie ATR/CHK1. Le premier signal est la présence d'ADN simple brin recouvert de RPA. Le deuxième signal est la fixation du complexe 9-1-1 et de TOPBP1 pour stimuler l'activité kinase d'ATR.

ATR peut aussi être activée suite à des cassures doubles brins, mais uniquement en phase S et en G2, alors qu'ATM peut être activée dans n'importe quelle phase du cycle. Cette différence est liée au fait que l'activation d'ATR nécessite au préalable une résection de la cassure afin de générer de l'ADN simple brin. Cette résection étant elle-même dépendante de l'activité des CDKs de phase S et G_2/M, ATR est donc peu active en G_1. (Figure 6)

Œuvre non reproduite par respect du droit d'auteur

Figure 6. Modèle d'activation d'ATR. **A**. ATR/ATRIP et TopBP1 sont recrutés de manière indépendante au niveau de l'ADN simple brin sur lequel est fixé RPA. **B**. TopBP1 recrute POLα, qui va synthétiser une amorce. **C**. TopBP1 et Rad17-RFC permettent le recrutement du complexe 9-1-1 et à la jonction double brin/simple brin créée par l'amorce. **D**. Stabilisation de l'interaction TopBP1/9-1-1. **E**. Un complexe se forme au niveau de l'ADN simple brin fixé par RPA, constitué par ATR, ATRIP, TopBP1 et 9-1-1, ce qui permet l'activation de ATR. *(Figure tirée de Yan et Michael, Cell cycle 2009)*

♦ ***Cibles d'ATR***

La liste des substrats phosphorylés par ATR est très longue (Matsuoka et al. 2007). La cible la plus connue est la kinase CHK1, qui est phosphorylée par ATR au niveau des Serines 317 et 345 (Zhao and Piwnica-Worms 2001), ce qui permet de diffuser le signal de stress au reste du noyau (Smits et al. 2006). ATR phosphoryle aussi plusieurs protéines de la fourche de réplication, le rôle de ces phosphorylations étant le plus souvent inconnu. Chez le Xénope, la phosphorylation de MCM2 par ATR permet la fixation de PLX1 (l'homologue de la kinase PLK1), qui est impliqué dans l'extinction du checkpoint (Trenz et al. 2008). Par ailleurs, ATR phosphoryle RAD9, RAD17, une sous-unité de RPA et TOPBP1. Ceci induit une boucle d'activation positive qui permet d'augmenter la fixation de TOPBP1 et de 9-1-1, d'augmenter l'activité d'ATR et d'inhiber la dégradation de TOPBP1.

La protéine CLASPINE est un médiateur essentiel de cette voie de checkpoint de phase S, car elle permet de faire le lien entre ATR et CHK1 (Kumagai and Dunphy 2000). CLASPINE interagit avec CHK1 lors de dommages à l'ADN, et cette interaction nécessite la phosphorylation de CLASPINE sur au moins deux sites. Il s'agit des Ser864 et 895 chez le Xénope (Kumagai and Dunphy 2003) et la Thr916 et Ser945 chez l'Homme (Clarke and Clarke 2005). Ces phosphorylations sont dépendantes de ATR mais non effectuées par la PI3KK elle-même. Il a aussi été observé que la kinase CDC7 est nécessaire pour activer efficacement CHK1 (Kim et al. 2008). La liaison de CLASPINE avec RAD17 et BRCA1 est aussi importante pour activer CHK1 de façon efficace (Lin et al. 2004; Wang et al. 2006). Il est important de noter que CHK1 est également nécessaire au maintien de la stabilité de CLASPINE (Chini et al. 2006)

En plus de CLASPINE, le complexe TIMELESS-TIPIN (TIMELESS interacting protein) est important pour médier l'activation de CHK1 par ATR (Errico et al. 2007; Unsal-Kacmaz et al. 2007). Ce complexe associé aux fourches de réplication faciliterait également le chargement de CLASPINE à la chromatine lors d'un stress réplicatif (Yoshizawa-Sugata and Masai 2007).

2.3.c. Cibles de la kinase effectrice CHK1

La voie Mec1/Rad53, qui est l'homologue fonctionnel chez *S. cerevisiae* de la voie ATR/CHK1 humaine, a été largement étudiée chez la levure. Les principales cibles de cette voie sont présentées ci-dessous. (Figure 7).

Œuvre non reproduite par respect du droit d'auteur

Figure 7. Voie de signalisation ATR/Chk1. Lorsque la fourche de réplication rencontre un obstacle (ici sur le brin avancé), cela entraine un découplage entre hélicase et polymérase. Cela mène à l'accumulation d'ADN simple brin ce qui, par l'intermédiaire de RPA, permet le recrutement d'ATR/ATRIP, entrainant le recrutement des autres protéines médiatrices de cette voie nécessaires à l'activation d'ATR et à la phosphorylation de Chk1. L'activation de Chk1 via sa phosphorylation permet d'inhiber l'activation des origines tardives, stabilise les fourches de réplication arrêtées, facilite leur redémarrage et bloque la progression du cycle cellulaire. (*Figure tirée de Paulsen et Cimprich, DNA Repair 2007*)

♦ ***Stabilisation de la fourche de réplication***

Le maintien de la stabilité des fourches est le rôle le plus important du checkpoint en situation de stress réplicatif (Tercero et al. 2003). Ce processus consiste à maintenir associés à la fourche tous les composants du réplisome afin d'éviter la formation de structures d'ADN aberrantes et de permettre le redémarrage des fourches (Lopes et al. 2001). Chez *S. cerevisiae*, il a ainsi été montré par microscopie électronique que les mutants du checkpoint de phase S accumulent de l'ADN simple brin et des fourches reversées (Sogo et al. 2002). Parmi les cibles de RAD53, on retrouve ainsi POLα (Pellicioli et al. 1999) et RPA (Brush et al. 1996). De même, MEC1 est nécessaire pour le maintien de POLα et POLε au niveau des fourches arrêtées en HU (Cobb et al. 2005). Cependant, il est intéressant de noter qu'un mutant non phosphorylable du médiateur Mrc1, appelé *mrc1*^{AQ}, est incapable d'activer Rad53 mais permet néanmoins de préserver l'intégrité des fourches en présence d'HU (Szyjka et al. 2005; Tourriere et al. 2005). Dans le même ordre d'idée, le complexe MRC1/TOF1/CSM3 joue un rôle clé dans le maintien de la stabilité du réplisome en couplant l'activité des hélicases et des polymérases en situation de stress réplicatif, indépendamment du checkpoint (Katou et al. 2003). Les mécanismes de stabilisation des fourches de réplication par la voie Mec1/Rad53 restent donc encore mal connus.

Chez les eucaryotes supérieurs, la voie ATR/CHK1 est également impliquée dans le maintien de la stabilité des fourches arrêtées (Zachos et al. 2003). Parmi les cibles de cette voie, on retrouve par exemple les MCMs (Cortez et al. 2004; Ishimi et al. 2004). Ce processus dépend aussi des protéines TIMELESS et TIPIN. Ainsi, la déplétion de TIPIN dans des extraits d'œufs de Xénope empêche le redémarrage des fourches arrêtées par l'Aphidicoline (Errico et al. 2007). De même, une instabilité génétique a été observée dans des cellules HeLa déplétées en TIPIN, ce qui suggère un problème de stabilité des fourches (Chou and Elledge 2006).

♦ ***Recombinaison***

Chez la levure, les mutants de gènes impliqués dans la recombinaison homologue sont hypersensibles au stress réplicatif, suggérant que la RH joue un rôle majeur dans le redémarrage des fourches (Chang et al. 2002). En revanche il a été montré que le checkpoint de réplication inhibe la formation de foyers de RH (Lisby et al. 2004; Meister et al. 2005) Le checkpoint inhibe l'étape de résection de la RH en cas de stress réplicatif, ce qui

permet d'inhiber la RH potentiellement toxique, sans interférer avec le redémarrage des fourches où cette résection est inutile car l'ADN simple brin est déjà présent (Alabert et al. 2009). Chez les mammifères, il a été montré que les processus de NHEJ et de RH sont également importants pour la réparation de dommages à l'ADN associés à une inhibition de la réplication (Saintigny et al. 2001). Comme chez la levure, il y a formation de foyers de recombinaison même en absence de cassures double brin (Hanada et al. 2007). CHK1 phosphoryle RAD51, une protéine centrale dans le processus de recombinaison homologue (Sorensen et al. 2005). CHK1 phosphoryle également BRCA2, ce qui permet son interaction avec RAD51 et leur relocalisation au site de dommage (Bahassi et al. 2008). CHK2 est aussi impliqué dans ce mécanisme, spécifiquement lors de cassures double brin (Bahassi et al. 2008).

♦ ***Arrêt du cycle cellulaire***

Après un endommagement de l'ADN, un des rôles du checkpoint de phase S est d'éviter l'entrée en mitose tant que l'ADN n'est pas réparé et complètement répliqué. Pour cela, le checkpoint agit sur les CDKs qui permettent l'entrée en mitose. Dans ce but, CHK1 phosphoryle CDC25A et entraine sa dégradation par le protéasome par l'intermédiaire de $SFC^{\beta TRCP}$ (Jin et al. 2003). En fin de phase S, CDC25A permet le maintien de la stabilité de CDK1/CycB, qui est par la suite indispensable à l'entrée en mitose. La dégradation de CDC25A par le checkpoint entraine la dégradation de CDK1/cycB. Il est à noter que CDC25A stimule l'activité CDK2/CycE, et que sa dégradation en G1 induit un arrêt des cellules avant l'entrée en phase S (Bartek and Lukas 2001).

♦ ***Inactivation des origines tardives***

Il a été montré chez la levure *S. cerevisiae* que l'arrêt des cellules en début de phase S bloque l'activation des origines tardives, suivant un mécanisme actif dépendant des kinases MEC1 et RAD53 (Santocanale and Diffley 1998). Ce mécanisme semble conservé dans des cellules humaines (Chastain et al. 2006). La répression des origines tardives passerai par l'inhibition du complexe CDC7/DBF4 par la voie ATR/CHK1 et la dégradation de

CDC25A, ce qui empêcherai le recrutement de CDC45 aux origines et donc leur activation (Weinreich and Stillman 1999; Bartek et al. 2004).

- ***Activation des mécanismes de réparation et de tolérance des lésions***

Un autre rôle du checkpoint est d'activer différents mécanismes de réparation et de contournement des lésions de l'ADN pour éviter le blocage irréversible des fourches de réplication. Une protéine clé impliquée dans ce processus est PCNA, qui est modifiée post-traductionnellement par différents mécanismes. Ainsi, l'ubiquitinylation de PCNA suite à un stress réplicatif permet le recrutement de polymérases translésionnelles (Lehmann et al. 2007), qui peuvent répliquer à travers les lésions en incorporant un nucléotide, correct ou incorrect, en face de la lésion. Cette ubiquitinylation par les protéines RAD6 et RAD18 au niveau de la lysine 164 (Hoege et al. 2002), dépend de CHK1, CLASPINE et TIMELESS mais pas d'ATR (Yang et al. 2008). PCNA peut aussi être SUMOylé, même en absence de dommages exogènes sur un de ces sites d'ubiquitinylation, ce qui inhibe la RH (Pfander et al. 2005).

L'ubiquitinylation de PCNA permet aussi l'activation de nombreux mécanismes de réparation. Par exemple, il a été montré que PCNA est impliqué dans les mécanismes de réparation des mésappariements de bases ou « Mismatch repair » (MMR). Le MMR permet d'enlever des bases erronées sur le brin néo-synthétisé, ce qui augmente la fidélité globale de la réplication. PCNA serait aussi nécessaire au recrutement des protéines de la réparation par excision de base (BER), qui permet la réparation de bases nucléotidiques ayant subi des altérations chimiques telles que des alkylation, des oxydations ou des déamination (Sancar et al. 2004). Un autre moyen de réparation utilisé est l'excision de nucleotide (NER), qui est souvent utilisé dans le cas de lésions de l'ADN causées par des radiations. PCNA semble aussi avoir un rôle dans la coordination et le recrutement des protéines nécessaire a ce mécanisme mais ce rôle reste à préciser. (Figure 3)

2.3.d. Régulation de l'arrêt du checkpoint

Une fois les dommages réparés, des mécanismes actifs impliquant CLASPINE et PLK1 permettant à la cellule « d'éteindre » le checkpoint afin de redémarrer le cycle cellulaire (Gewurz and Harper 2006). Ainsi, PLK1 phosphoryle CLASPINE (Yoo et al. 2004), ce qui provoque sa dégradation par l'E3 Ubiquitine ligase $SCF^{\beta TRCP}$ (Mailand et al. 2006; Mamely et al. 2006; Peschiaroli et al. 2006). La dégradation de CLASPINE entraine une diminution de la phosphorylation de CHK1, la réaccumulation de CDC25 et la dégradation de WEE1, ce qui induit la réactivation des CDKs et l'entrée en mitose (Figure 8). Lors d'une phase S normale, PLK1 est présente au niveau de la chromatine, liée aux complexes MCMs (Tsvetkov and Stern 2005a). Elle est activés en G2 par phosphorylation en T210 par la kinase Aurora ce qui permet l'entrée en mitose. En cas de dommages à l'ADN, PLK1 est inhibé par deux mécanismes. Il s'agit d'une part de la suppression de sa phosphorylation en T210 (Tsvetkov and Stern 2005b) et d'autre part de sa dégradation par l'APC/C (Bassermann et al. 2008). Les mécanismes qui activent PLK1 pour éteindre le checkpoint en phase S ne sont pas connus.

Œuvre non reproduite par respect du droit d'auteur

Figure 8. Mécanisme simplifié du blocage et de l'inhibition du checkpoint. La partie gauche du schéma représente la voie d'activation du checkpoint précisé précédemment. Lors de l'inactivation du checkpoint, la phosporylation de Wee1 (qui est la kinase qui inhibe Cdk1, entrainant l'arret du cycle) et de Claspine par Plk1 entraine leur dégradation par $SCF^{\beta TRCP}$. La dégradation de Claspine stoppe l'activation de Chk1 ce qui permet une réaccumulation de Cdc25 A et donc l'activation du complexe Cdk1/cycline B permettant le passage en mitose. A noter qu'il s'agit de la même protéine $SCF^{\beta TRCP}$ qui dégrade Cdc25A pour l'activation du checkpoint et qui dégrade Claspine pour son inhibition *(Figure tirée de Bartek et al, Curr Op Cell Biol, 2007).*

2.4 Rôles des protéines du checkpoint en phase S normale

Le checkpoint de phase S a été principalement étudié en présence d'agents génotoxiques. Son importance lors de la phase S normale n'a été décrite qu'assez récemment. Les protéines ATR ou de CHK1 sont essentielles pour la viabilité chez les mammifères (Brown and Baltimore 2000; Liu et al. 2000). L'absence de ces protéines entraine l'apparition de stress et de dommages spontanés de l'ADN, ainsi qu'une instabilité génétique (Syljuasen et al. 2005; Maya-Mendoza et al. 2007). Ces protéines du checkpoint sont impliquées dans au moins deux processus en phase S normale : l'activation des origines et la progression des fourches.

2.4.a. Rôle dans l'activation des origines

L'inhibition de ATM et ATR augmente la fréquence d'activation des origines, ce qui suggère que ces kinases régulent le nombre d'origines actives au cours d'une phase S normale (Marheineke and Hyrien 2004; Shechter et al. 2004). Cette fonction dépend de CHK1 et de CLASPINE, via l'inhibition des CDKs et DDKs (Sorensen et al. 2004). Elle dépend aussi de l'ADN simple brin formé par la réplication en cours, car cela nécessite la présence de RPA et du complexe 9-1-1. Il a été confirmé récemment par des analyses de peignage moléculaire que la régulation des origines par CHK1 passe bien par la voie CDC25-CDK2, mais il semblerait que concernant CLASPINE le mécanisme soit indépendant de cette voie (Scorah and McGowan 2009). Par ailleurs, il a aussi été montré que les origines supplémentaires activées dans le cas de l'inhibition de CHK1 le sont dans des régions en cours de réplication et non dans des régions tardives (Maya-Mendoza et al. 2007). Ainsi, le checkpoint aurait une action d'inhibition « locale » des origines au sein d'un réplicon actif durant une phase S normale.

2.4.b. Rôles dans la progression des fourches de réplication

Les médiateurs du checkpoint de réplication (CLASPINE, TIMELESS, TIPIN) sont associés à la fourche de réplication pendant toute la durée de la phase S. En effet, CLASPINE, interagit avec PCNA en absence de dommage (Brondello et al. 2007) ainsi qu'avec CDC45, RPA et POLε chez le Xénope (Lee et al. 2005). De leur coté, TIMELESS et TIPIN interagissent avec les MCMs, RPA, POLε et POLα (Chou and Elledge 2006; Gotter et al. 2007). Cette liaison de CLASPINE, TIMELESS et TIPIN à la fourche de réplication avait déjà été montrée chez la levure (Gambus et al. 2006). Chez *S. cerevisiae,* ces protéines ont un rôle dans le maintien de la stabilité des fourches en coordonnant l'activité des hélicases et des polymérases (Katou et al. 2003). Cette fonction structurale, qui est indépendante de la phosphorylation par MEC1, est nécessaire à la viabilité des cellules en condition de stress (Tourriere et al. 2005). En conséquence, l'absence de ces protéines entraine un défaut de progression des fourches de réplication. (Figure 9)

Dans les cellules HeLa, l'inhibition de CHK1 entraine une diminution de moitié de la vitesse des fourches (Petermann et al. 2006). Il est à noter que cela n'a pas de conséquence globale sur le cycle cellulaire car cette diminution de vitesse est compensée par une augmentation de l'activation des origines. L'absence de TIMELESS et de TIPIN entraine aussi un ralentissement des fourches de réplication en absence de dommage, avec un effet plus marqué pour TIMELESS que pour TIPIN (Unsal-Kacmaz et al. 2007). En revanche l'absence de TIPIN semble avoir plus de conséquence sur la croissance des cellules que l'absence de TIMELESS (Yoshizawa-Sugata and Masai 2007). Un ralentissement des fourches existe aussi dans les cellules où l'expression de CLASPINE a été inhibée, avec un effet plus marqué dans les lignées cancéreuses que dans des cellules primaires (Petermann et al. 2008). Cependant, on ne sait pas si ces ralentissements de fourches en absence de CLASPINE/TIMELESS/TIPIN sont liés à une fonction structurale de ces protéines à la fourche, comme c'est le cas chez la levure. Cette question constitue précisément un aspect de mon projet de thèse.

D'autre part, il a été montré que l'absence de TIMELESS ou de TIPIN lors d'arrêt de fourches entrainait une instabilité génétique, visualisée par une augmentation de γ–H2AX, de la fréquence d'échanges entre chromatides sœurs (SCE) et de RH (Chou and Elledge 2006; Urtishak et al. 2009). L'inhibition de CLASPINE entraine aussi l'expression des sites fragiles communs en présence d'aphidicoline (Focarelli et al. 2009). CLASPINE

forme un anneau avec une très forte affinité pour les jonctions simple-double brin et les jonctions de Holliday *in vitro* (Sar et al. 2004). Toutes ces données suggèrent que TIMELESS/TIPIN/CLASPINE sont importants pour le maintien de la stabilité des fourches chez les métazoaires.

Le rôle de CLASPINE dans la prolifération des cellules (Lin et al. 2004) pourrait ainsi être lié à la régulation de la progression des fourches de réplication. Cette fonction est encore mal connue chez les mammifères, mais on peut émettre l'hypothèse que ce rôle soit comparable à celui de MRC1 chez la levure. Par ailleurs, on ne sait pas si cette fonction structurale putative est aussi importante que sa fonction de médiateur du checkpoint de réplication.

Œuvre non reproduite par respect du droit d'auteur

Figure 9. Rôle de Mrc1 à la fourche de réplication chez la levure. **A**. Mrc1, ainsi que d'autres facteurs, est recruté à la fourche de réplication au niveau des hélicases, qu'il aide à connecter à la polymérase ε du brin avancé. En l'absence de Mrc1, la progression de la fourche de réplication est ralentie, peut-être à cause de l'absence de lien physique entre la polymérase ε et les MCMs. **B**. En présence d'HU, les fourches progressent très lentement. En absence de Mrc1, la polymérase ε est déstabilisée aux fourches, ce qui pourrait entrainer une progression plus rapide du reste du réplisome par rapport à la synthèse d'ADN. (Tirée de *Labib 2008, Mol cell*).

3 Checkpoint et cancer

Six caractéristiques communes des cancers ont été proposées par Hanahan et Weinberg: l'augmentation de l'angiogenèse, l'invasion tissulaire et la formation de métastases, l'échappement à l'apoptose, la prolifération indépendante des signaux de croissance, l'insensibilité aux signaux d'arrêt de croissance et un potentiel prolifératif illimité (Hanahan and Weinberg 2000). Récemment, d'autres caractéristiques ont été proposées par S. Elledge : l'échappement à la surveillance immunitaire et la présence de stress métaboliques, protéotoxiques, mitotiques, oxydatifs et de dommages à l'ADN (Luo et al. 2009) (Figure 10). Ces phénotypes sont obtenus en réactivant les programmes cellulaires normalement utilisés au cours du développement, qui contrôlent la prolifération, la migration, la polarité, l'apoptose ou la différenciation. D'autre part, la progression tumorale passe par l'apparition de changements épigénétiques et de mutations aléatoires qui vont modifier ces programmes. La conséquence est l'obtention par sélection clonale de cellules qui pourront survivre et proliférer dans des conditions délétères.

Des mutations dans trois types de gènes sont sélectionnées par les cellules tumorales : les oncogènes, les gènes suppresseurs de tumeurs et les gènes gardiens de la stabilité du génome (caretakers). Les oncogènes sont des accélérateurs de la prolifération cellulaire. L'activation constitutive des oncogènes peut résulter d'une translocation chromosomique, d'une amplification du gène ou de mutations intragéniques affectant des résidus qui régulent l'activité du produit du gène. Les suppresseurs de tumeurs, eux sont des régulateurs négatifs de la prolifération cellulaire. Les mutations qui les affectent réduisent l'activité du produit du gène. De telles inactivations proviennent de mutations qui résultent en une protéine tronquée, ou qui conduisent à la suppression du gène ou à des insertions dans sa région régulatrice ou codante. Le suppresseur de tumeur le plus célèbre est la protéine P53. Une mutation dans un de ces deux types de gènes a des conséquences physiologiquement similaires : cela favorise la division des cellules ou inhibe la mort cellulaire ou induit l'arrêt du cycle cellulaire, entrainant une prolifération aberrante. Cela peut passer par divers mécanismes comme l'activation de gènes du cycle cellulaire, l'inhibition de l'apoptose ou l'augmentation de l'angiogenèse. Les caretakers, lorsqu'ils sont mutés, favorisent la tumorigenèse d'une autre manière. Les caretakers regroupent les gènes responsables de la réparation de mutations ponctuelles, comme les gènes du MMR, NER, et BER, ainsi que des

gènes responsables de la stabilité des chromosomes à plus grande échelle, comme les gènes responsables de la ségrégation des chromosomes en mitose, les gènes importants pour la cohésion des chromatides sœurs ou pour la condensation des chromosomes. On trouve aussi dans ce groupe des gènes issus des différents checkpoints. Ces gènes permettent de maintenir à un niveau faible le taux de mutation et l'instabilité génétique en général dans la cellule. L'inactivation de caretakers va donc conduire à une augmentation dans le nombre de mutations touchant les gènes des deux autres groupes. L'instabilité génétique joue donc un rôle central dans la progression tumorale. Elle est quasi systématiquement présente dans les cancers et elle semble nécessaire pour accumuler les mutations indispensables pour générer une cellule cancéreuse.

Œuvre non reproduite par respect du droit d'auteur

Figure 10. Marqueurs du cancer. Les 6 symboles du haut représentent les 6 marqueurs originalement proposés par Hanahan et Weinberg (*Cell, 2000*) : augmentation de l'angiogenèse, invasion tissulaire et formation de métastases, échappement à l'apoptose, indépendance des signaux de croissance, insensibilité aux signaux d'arrêt de croissance et potentiel réplicatif illimité. A ceux là ont été ajouté l'échappement à la surveillance immunitaire proposé par Kroemer et Pouyssegur (*Cancer Cell, 2008*) ainsi que 5 autres marqueurs proposé par le laboratoire de S. Elledge (*Luo et al, Cell, 2009)*. Il s'agit de stress métabolique, protéotoxique, mitotique, oxydatif et liés aux dommages à l'ADN. Il existe des interactions entre ces différents marqueurs qui sont précisées au centre du cercle. (*Figure tirée de Luo et al, Cell 2009*)

3.1 Instabilité génétique

Deux types d'éléments jouent un rôle clé dans l'instabilité génomique. Il y a tout d'abord les éléments agissant en *trans* pour limiter l'instabilité comme les protéines de la réplication, du checkpoint ou de la réparation. Il y a aussi des éléments agissant en *cis*, comme les points chauds d'instabilité que sont les sites fragiles ou les régions fortement transcrites (Aguilera and Gomez-Gonzalez 2008). Nous allons voir que suivant l'élément entrainant l'instabilité génomique, celle-ci se manifestera différemment. En effet il existe plusieurs types d'instabilité génétique que je vais détailler ci-dessous :

3.1.a. Différents types d'instabilité génétique

L'instabilité génétique regroupe toute une gamme d'altérations allant de la mutation ponctuelle aux réarrangements de chromosomes entiers. L'instabilité liée aux mutations, qui comprend les substitutions de bases, les micro insertions et micro délétions, est dûe à des problèmes de réplication ou de réparation, ainsi qu'à la synthèse par certaines polymérases translésionnelles moins fidèles, qui entrainent des mutations.

Le deuxième mécanisme d'instabilité est celui lié aux séquences micro et mini satellites (MIN). Il s'agit d'expansions ou de contractions du nombre de certaines répétitions d'ADN dû à un défaut de réplication, un problème de MMR ou par RH. Les exemples les mieux documentés concernent les cancers héréditaires tels que le cancer du colon sans polypose (HNPCC), certains cancers du sein ou de la peau, qui sont dûs à des mutations dans la lignée germinale de gènes impliquées dans les voies de réparation, de recombinaison ou de réplication du génome.

Une autre forme d'instabilité présente dans les cancers est l'instabilité chromosomique (CIN). Elle se réfère à un changement dans le nombre ou la structure des chromosomes. Les modifications numéraires sont dûes à des défauts de transmission des chromosomes en mitose ou des défauts de checkpoint mitotique (Lengauer et al. 1997).

Enfin, un dernier type d'instabilité génétique est celle entrainant des réarrangements de la structure des chromosomes (délétions, duplications, inversions ou translocations). Cette instabilité trouve sa source au niveau de cassures doubles brins. Les réarrangements sont causés par de la RH entrainant un échange inégal entre chromatides sœurs ou par de la NHEJ. Dans les cancers somatiques, les causes de cette instabilité génétique sont peu claires du fait de l'accumulation de nombreux réarrangements au cours du processus de cancérisation. Le point commun à la plupart de ces réarrangements est qu'ils seraient liés à du stress réplicatif, ce qui met en lumière l'importance du checkpoint de phase S pour limiter ce phénomène. Cependant tous les GCR ne sont pas liés à des cassures dépendantes de la réplication. Par exemple, certains réarrangements sont dûs à des fusions de télomères ou des défauts de cohésion entrainant des échanges inégaux de chromatides sœurs.

3.1.b. Les points chauds d'instabilité génétique.

- ***Les régions fortement transcrites***

Comme je l'ai déjà décrit précédemment, il a été observé une augmentation de l'instabilité génétique dans les sites où le taux de transcription est élevé, dû principalement à des collisions entre machinerie de transcription et de réplication, et à la présence de R-loops. Ces deux phénomènes entrainent un type de recombinaison homologue appelée TAR (transcription-induced recombinaison) (Aguilera and Gomez-Gonzalez 2008; Gottipati et al. 2008).

- ***Les sites fragiles***

Il existe deux types de sites fragiles : les sites fragiles communs (CFS), présents naturellement dans le génome de tous les mammifères et les sites fragiles rares, qui apparaissent lors de mutations conduisant à des expansions de répétitions d'ADN. Les sites fragiles communs sont souvent des régions riches en A-T contenant des grands gènes (Zlotorynski et al. 2003; Helmrich et al. 2006). Ces sites sont fréquemment retrouvés au point de cassures de réarrangements observés dans certaines tumeurs. Ils sont souvent responsables de délétions de gènes suppresseurs de tumeurs, comme c'est le cas pour le gène FHIT dans le site fragile FRA3B, ou de translocations entrainant une dérégulation d'un gène comme MYC

à FRA8C dans le cas du lymphome de Burkitt (Popescu 2003). Ils sont aussi impliqués dans des phénomènes d'amplification d'oncogènes suite à de multiples cassures au niveau des CFS. Finalement, ils sont aussi des sites préférentiels d'intégration de virus oncogéniques comme le papillomavirus humain ou le virus de l'hépatite B (Popescu 2003).

Les CFS sont des régions du génome qui subissent préférentiellement des cassures doubles brin lorsque la réplication est partiellement inhibée. En effet, l'instabilité de ces régions, entrainant des délétions, des cassures et des réarrangements, augmente fortement par rapport au reste du génome lorsque des cellules sont traitées avec des inhibiteurs de la réplication (Glover 2006). Les CFS ont été localisés à la jonction entre régions chromosomiques répliquant précocement et tardivement (El Achkar et al. 2005). Il a été proposé que les CFS soient les régions répliquées en dernier juste avant l'entrée en mitose et que le fait de ralentir la réplication par le traitement à l'aphidicoline engendrerait une réplication incomplète de ces régions, conduisant à des cassures en métaphase (El Achkar et al. 2005). Le fait que les sites fragiles sont stables dans les cellules normales et instables dans les cellules tumorales pourrait être la marque d'une réplication perturbée dans les cellules cancéreuses.

3.1.c. Rôle des checkpoints de phase S dans le maintien de l'intégrité du génome.

L'équipe de R. Kolodner a montré chez la levure que les protéines du checkpoint de phase S sont essentielles pour limiter l'instabilité génétique. En effet par un test génétique mesurant le taux de GCR, ils ont pu mettre en évidence que les protéines du checkpoint de phase S sont celles qui génèrent le plus de GCR (Myung et al. 2001). A noter que les protéines des checkpoints de G1 et de G2 sont beaucoup moins impliqués dans la régulation de l'instabilité génétique (Myung et al. 2001). Le fait que le checkpoint de phase S soit extrêmement conservé au cours de l'évolution et que plusieurs de ses composants se comportent comme des suppresseurs de tumeurs va dans le même sens (Aguilera and Gomez-Gonzalez 2008). Il s'agit principalement des protéines de la voie ATR/CHK1, qui sont importantes pour la stabilité des fourches. Chez les mammifères, il a en effet été montré que l'absence de TIPIN, TOPBP1 et CHK1 entraine une augmentation de γ–H2AX, signe de stress réplicatif susceptible d'entrainer de l'instabilité génétique (Kim et al. 2005; Chou and Elledge 2006; Durkin et al. 2006). De même, il a été montré qu'en absence de TIMELESS il

y avait une augmentation de γ–H2AX et l'apparition de cassures doubles brins générant de la RH et de l'échange entre chromatides sœurs (Urtishak et al. 2009). Le maintien de la stabilité de la fourche est donc une des étapes clés pour éviter l'instabilité chromosomique.

D'autre part, la stabilité des sites fragiles aussi dépend de la présence des checkpoints de phase S. En effet ces CFS sont plus fortement exprimés dans des cellules déficientes pour différentes protéines impliquées dans la gestion des fourches de réplication arrêtées telles qu'ATR, CHK1, TOPBP1, BRCA1, ou les membres du complexe FANC (Casper et al. 2002; Kim et al. 2005; Durkin et al. 2006). Il est intéressant de noter que la voie du checkpoint ATR/CHK1 semble plus importante que la voie ATM/CHK2 pour le maintien de la stabilité des sites fragiles. En effet, la présence de CHK2 n'est pas nécessaire à la stabilité des sites fragiles (Durkin et al. 2006) et il semblerait que ATM ne soit nécessaire qu'en absence de ATR (Ozeri-Galai et al. 2008). Cela est probablement lié au rôle de la voie ATR/CHK1 dans le maintien de la stabilité des fourches.

3.2 Un nouveau modèle pour le développement et la progression des cancers : « l'instabilité génomique » induite par des oncogènes

Au vue de la complexité et de l'hétérogénéité des mutations observées dans des tumeurs d'origines variées, un des problèmes les plus importants qu'il reste à éclaircir est de distinguer les mutations qui sont le moteur de la progression tumorale des mutations qui ne sont que passagères et conséquentes des premières. Deux événements majeurs ont ainsi été observés dans les tumeurs. Il s'agit d'une part de l'instabilité génomique et d'autre part de la mutation quasi systématique de la protéine P53. Le modèle proposé par J. Bartek et T. Halazonetis a permis de proposer un lien entre ces deux événements au cours de la progression tumorale. (Figure 11)

En 2005, il a été observé de façon concomitante par les laboratoires de J. Bartek et T. Halazonetis, que dès les stades les plus précoces de la tumorigenèse, les protéines du checkpoint de phase S étaient activées de façon constitutive (Bartkova et al. 2005; Gorgoulis et al. 2005). En effet, dans des cellules précancéreuses, c'est-à-dire des cellules avec une prolifération dérégulée mais sans capacité invasive, l'activation d'Atm, Chk2, H2AX et p53 a

été observée. Cette activation du checkpoint de phase S précède l'apparition d'instabilité génomique. Ces auteurs ont aussi montré que l'activation d'oncogènes tels Cycline E, E2F1A et Cdc25A générait un stress réplicatif activant le checkpoint de phase S (Bartkova et al. 2005). Ceci a pour conséquence l'activation de p53 et l'entrée en apoptose de ces cellules néoplasiques, empêchant ainsi l'expansion de la tumeur mais fournissant une pression de sélection pour l'inactivation de p53. Le fait que l'apoptose disparaisse au cours de la progression tumorale va dans le même sens (Gorgoulis et al. 2005). La présence de stress réplicatif a été confirmée par la présence de perte d'hétérozygotie spécifiquement au niveau des sites fragiles communs, qui sont hypersensibles au stress réplicatif (Gorgoulis et al. 2005).

L'année suivante, ces deux groupes et celui de F. d'Adda di Fagagna ont montré que la sénescence induite par les oncogènes, jusque là attribuée à la dérégulation des suppresseurs de tumeurs $P16^{INK4A}$ et ARF, était également dépendante de l'activation du checkpoint de dommages à l'ADN (Bartkova et al. 2006; Di Micco et al. 2006). Ces auteurs ont observé qu'après l'induction d'un oncogène dans des cellules primaires, il y a d'abord une période d'hyperprolifération qui est suivie par l'entrée en sénescence des cellules. Ils ont aussi montré que l'inhibition du checkpoint de phase S (siRNA contre CHK2, ATM ou P53) supprime cette entrée en sénescence et que l'absence de CHK2 favorisait la transformation cellulaire par l'oncogène Ras. Au cours de la progression tumorale, la sénescence diminue de façon concomitante avec l'activation du checkpoint de phase S.

ATR et CHK1 sont aussi activées dans les cellules précancéreuses (Di Micco et al. 2006), mais il ne semble pas que la suppression des protéines de cette voie favorise la prolifération des cellules cancéreuses (Negrini et al. 2010). En effet, le maintien de cette voie serait nécessaire pour la stabilité des fourches et pour protéger les cellules cancéreuses contre des dommages excessifs de l'ADN (Luo et al. 2009).

Toutes ces études ont aussi permis de confirmer, notamment par peignage moléculaire, que l'activation d'oncogènes dérégulait le timing de réplication et induisait des arrêts de fourches. Ceci a pour conséquence la formation de cassures double brins et l'activation du checkpoint de phase S. Suite aux observations faites dans ces quatre articles, il a été proposé un modèle d'instabilité génomique induite par les oncogènes. Ce modèle stipule que la réponse aux dommages à l'ADN constitue une barrière contre la progression tumorale en entrainant l'apoptose ou la sénescence des cellules. Cependant, l'activation chronique de ce checkpoint crée une pression de sélection permettant à tout clone présentant un défaut de ce checkpoint d'être sélectionné positivement. Des altérations dans les protéines du

checkpoint pourraient ainsi réduire la mort cellulaire et augmenter l'instabilité génétique, favorisant ainsi la progression tumorale. L'échappement à cette barrière corrèle d'ailleurs bien avec les mutations de p53 dans les cancers. Ce modèle s'appuie aussi sur des données *in vivo* puisque l'activation des protéines du checkpoint se retrouve dans des tissus prétumoraux du poumon, du sein, du colon ou de la vessie (Bartek et al. 2007). De plus, lors de la progression tumorale, on observe la perte de la capacité des cellules à entrer en apoptose ou en sénescence. Ce phénomène a été observé dans de multiples types de tumeurs mais avec certaines différences. Par exemple dans le cas du colon, le tissu normal présente un index de prolifération très élevé, qui diminue lorsque la cellule devient précancéreuse à cause de l'augmentation de la sénescence, puis cet index de prolifération remonte lors de la transformation en carcinome. Dans le cas du cancer du poumon, l'index de prolifération et l'apoptose sont très bas dans le tissu sain, puis les deux augmentent fortement dans les cellules prétumorales avant que l'apoptose ne baisse fortement lors de la transformation en carcinome. (Figure 12)

Ainsi, ce modèle se différencie des modèles antérieurs, suggérant que les cellules précancéreuses ont un taux de mutation très élevé du fait de leur instabilité génétique intrinsèque, ce qui entrainerait des mutations aléatoires sélectionnées par la suite (Loeb 1991). Selon cette hypothèse, tous les gènes « caretakers » devraient être fréquemment mutés dans les tumeurs. Or il se trouve que des études récentes à l'échelle du génome dans un nombre important de cancers ont montré que la fréquence de mutation de ces gènes est assez faible (Negrini et al. 2010). Les deux seuls gènes mutés à une fréquence élevée sont les gènes codant p53 et Atm, ainsi que les gènes qui affectent la croissance cellulaire, ce qui est plutôt en accord avec le modèle d'instabilité génomique induite par les oncogènes.

Œuvre non reproduite par respect du droit d'auteur

Figure 11. Modèle "Instabilité génomique induite par l'activation d'oncogènes" pour le développement et la progression tumorale. L'instabilité génomique et le checkpoint de phase S activé sont déjà présents dans les lésions précancéreuses avant leur transformation en cellules tumorales. Cette instabilité et l'activation du checkpoint sont dû au stress réplicatif induit par l'activation d'oncogènes. Tant que le checkpoint sera fonctionnel (représenté par ATM, ATR et p53 sur le schéma) il va constituer une barrière contre la progression tumorale en entrainant l'apoptose ou la sénescence des cellules cancéreuses. Mais son inhibition va constituer une rupture de la barrière et favoriser la progression tumorale (*Figure tirée de Halazonetis et al, Science 2008*).

Œuvre non reproduite par respect du droit d'auteur

Figure 12. Barrière à la progression tumorale constituée par le checkpoint dans des lésions pré tumorales. L'index de prolifération (IP, en vert), d'apoptose ou de sénescence (IA/S, en violet) et d'activation du checkpoint (ICS, en orange) dans du tissu normal, précancéreux (PréCA) et cancéreux. (*Figure adapté de Halazonetis et al, Science 2008*)

3.3 Dérégulation de l'expression des protéines du checkpoint et de la réplication

Même si nous avons vu qu'à l'exception de CHK2, ATM et de P53, les protéines du checkpoint de phase S n'ont pas leurs gènes fréquemment mutés dans les cancers sporadiques (Negrini et al. 2010), il a quand même été observé des dérégulations de l'expression de certaines de ces protéines. Récemment, l'analyse du niveau d'ARN messagers de 48 gènes de la réplication, du checkpoint et de la réparation dans des tumeurs colorectales a montré que la plupart des gènes impliqués dans l'initiation de la réplication sont surexprimés (Pillaire et al. 2010). En ce qui concerne les gènes du checkpoint, il se dégage deux catégories : d'un coté les gènes codant des protéines senseurs de dommages à l'ADN en phase S et d'autre part les gènes codant des protéines médiatrices du checkpoint. Les gènes « senseurs » (Atm, 53BP1, Rad17, Rad9) voient leur expression diminuer dans les tumeurs colorectales alors que les gènes « effecteurs » (Chk1, Chk2) sont surexprimés. Dans le cas de Claspine, sa surexpression a été montrée par immunohistochimie dans des carcinomes épithéliaux (Tsimaratou et al. 2007b) ainsi que dans différentes lignées cancéreuses (Lin et al. 2004). Il a aussi été montré que les gènes de mêmes catégories ont tendance à être régulés de façon concomitante chez un même patient. C'est surtout le cas pour les polymérases translésionnelles ainsi que pour certains gènes du checkpoint. Par exemple, les sous expressions de Atm, Rad9 et Rad17 sont significativement corrélés, alors que les surexpressions de Chk1 et Chk2 sont complètement indépendantes (Pillaire et al. 2010). Toujours au cours de la même étude, il a été montré que le taux de mortalité plus élevé est corrélé à la surexpression combinée de 3 gènes de l'initiation et de la polymérase TLS PolQ. Le taux de mortalité est aussi fortement corrélé à la surexpression de Mcm7.

Il a par ailleurs été montré que, dans plusieurs types de tumeurs primaires, la probabilité de faire des métastases était corrélée avec une surexpression des gènes de réparation de l'ADN, voir de certains gènes de la réplication (Winnepenninckx et al. 2006; Sarasin and Kauffmann 2008; Chibon et al. 2010)

La dérégulation de l'expression de gènes de la réplication, de la réparation et du checkpoint de manière précoce au cours de la tumorigenèse montre l'importance positive ou négative de ces mécanismes dans la progression tumorale. Nous avons au cours de ma thèse tenté de mettre en évidence un mécanisme dans lequel les cellules tumorales utiliseraient à leur

avantage certaines protéines de la réplication et du checkpoint en dérégulant leur expression afin de favoriser la progression tumorale et l'adaptation au stress réplicatif.

CHAPITRE 2 : MATERIELS & METHODES

Modèles cellulaires

J'ai utilisé au cours de ma thèse différents types de lignées cellulaires humaines. La plus utilisée fut la lignée cellulaire HCT116 : il s'agit d'une lignée établie en 1981 issue d'un carcinome épithélial du colon. Ce sont des cellules adhérentes, chromosomiquement stables. A noter que p53 n'est pas muté dans ces cellules, mais le proto-oncogène Ras est muté (Ras^{K13}) et constitutivement activé.

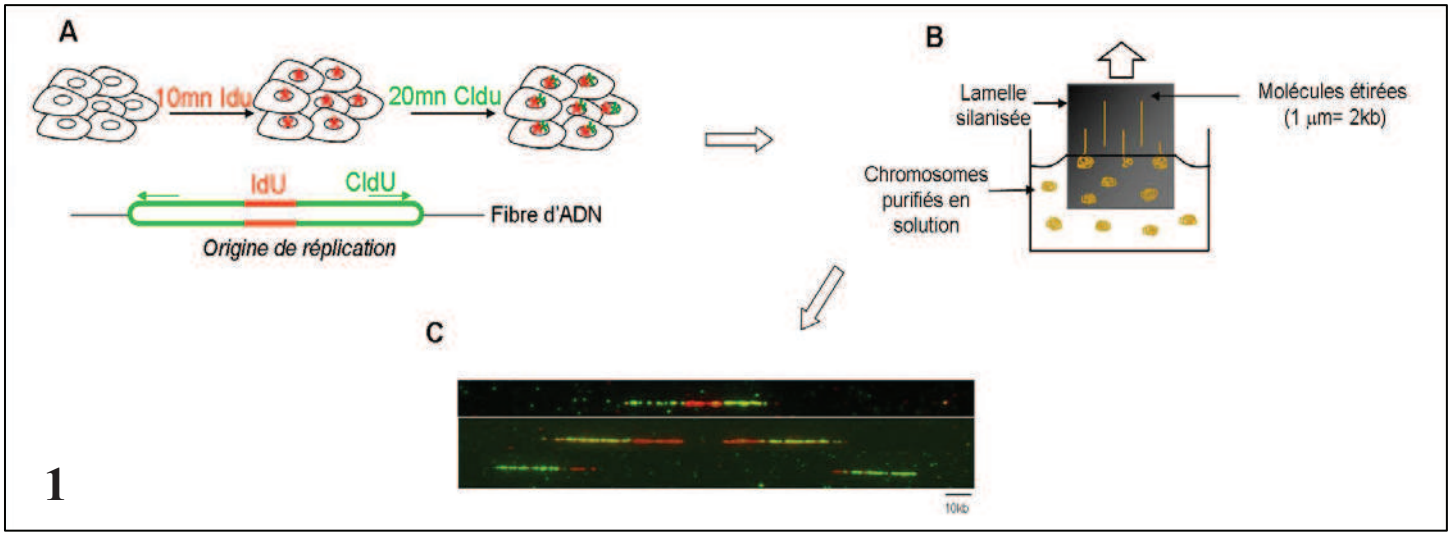
A partir de ces cellules, nous avons construit des lignées dans lesquelles nous avons diminué de façon permanente l'expression de Claspine ou de Timeless. Pour cela nous avons utilisé des shRNA (short hairpin RNA, mission TRC shRNA Sigma) ciblés contre notre gène d'intérêt, qui ont été intégrés dans le génome par infection lentivirale. Nous avons aussi infecté des cellules avec un lentivirus comportant un shRNA non spécifique, ne ciblant aucun gène connu (mission TRC shRNA Control, Sigma), afin de nous servir de ces cellules comme d'une lignée contrôle. La population de cellules infectées est sélectionnée grâce à l'intégration, avec le shRNA, d'un gène de résistance à un antibiotique : la Puromycine. La pression de sélection est maintenue par la suite en traitant en permanence à la Puromycine à 1µg/ml.

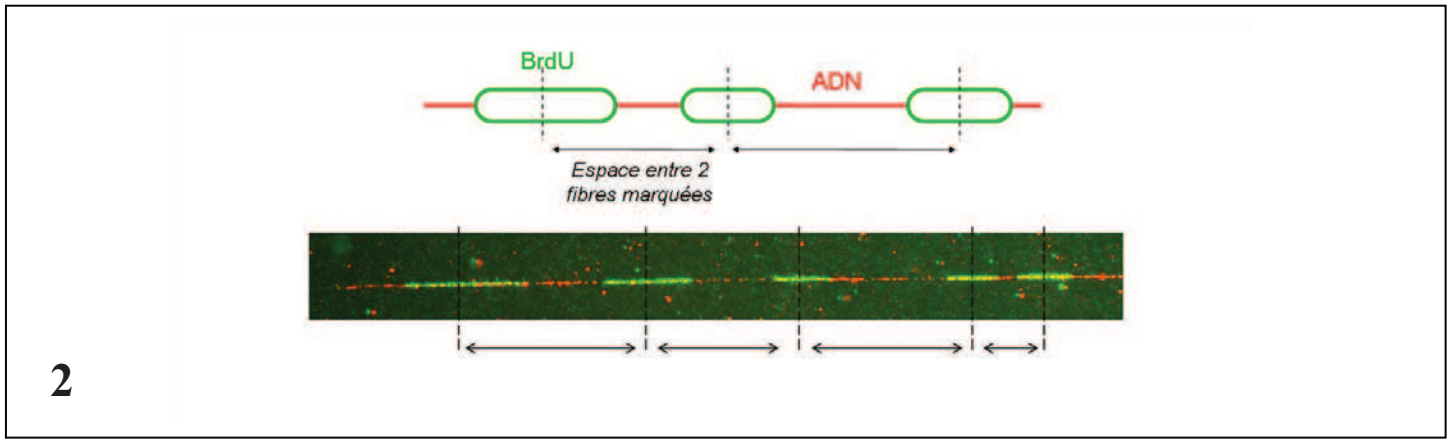
Nous avons aussi utilisé comme lignées cancéreuses des cellules HeLa, qui sont issues d'un carcinome du col de l'utérus, et des cellules U2OS, issues d'un ostéosarcome humain.

Nous avons aussi utilisé des lignées établies de fibroblastes fœtaux, les IMR90, qui sont des cellules primaires, entrant en sénescence après environ 58 doublements.

Toutes ces cellules ont été cultivées dans du DMEM contenant 10% de sérum de veau fœtal (SVF) et 1% d'un mélange d'antibiotiques (Péniciline-streptomycine).

Peignage Moléculaire





Cette technique permet d'étirer des fibres d'ADN de grande taille sur des lamelles de verre afin de suivre la réplication sur molécule unique (Michalet et al. 1997).

Les cellules asynchrones sont incubées 10 min avec de l'Iododéoxyuridine (IdU à 25 µM final) puis 20 min avec du Chlorodéoxyuridine (CldU à 250 µM final) (Schéma 1.A), qui vont s'insérer dans l'ADN néorépliqué à la place du nucléotide Thymidine. Les fourches qui répliquent vont incorporer séquentiellement les deux analogues. Ces deux analogues sont ajoutés directement dans le milieu de culture.

Les cellules sont ensuite trypsinisées et récupérées dans du milieu, lavées une fois dans du PBS froid et gardées à 4°C. Elles sont ensuite resuspendues dans du PBS froid à 2.10^6 cellules/ml. Le même volume de LMP agarose 1% préchauffé à 42°C est ajouté aux cellules.

100 µl de ce mélange est utilisé pour faire des blocs qui sont ensuite traités pendant 48 h dans du tampon PK (10 mM Tris pH 7.5, 50 mM EDTA, 1% Sarkosyl (Sigma), 2 mg/ml proteinase K (Roche)) afin de digérer les protéines cellulaires et libérer l'ADN. Les blocs sont ensuite rincés 5 fois 1 à 2 min dans du TE50 (10 mM Tris-HCl, pH 7.0, 50 mM EDTA). Un bloc est ensuite fondu 30 min à 65°C dans une solution de tampon MES à pH 5.7, puis l'agarose est digéré sur une nuit en présence de β agarase (3 unités/bloc). La solution d'ADN est ensuite transvasée dans un réservoir en téflon où une lamelle silanisée est trempée pendant 15 min, puis est remontée à la vitesse constante de 200 µM/sec. Une extrémité des molécules d'ADN va s'accrocher sur la lamelle silanisée et le ménisque formé entre l'eau et l'air lors de la remontée de la lamelle va permettre un déroulement et un étirement constant de la fibre d'ADN (1.B). Les molécules d'ADN sont ensuite fixées sur la lamelle par cuisson (2 h à 60°C). Les lamelles sont collées sur des lames qui sont trempées dans des bains successifs de 2 min d'éthanol 70%, 90% 100%. Après dénaturation à la soude 1 M (22 min), 5 lavages au PBS et saturation dans un tampon: PBS-0,1% Triton-BSA 1%, les fibres marquées sont immuno-détectées : l'IdU est détecté avec un anticorps de souris anti BrdU (1/20, clone B44, Becton Dickinson), et le CldU avec un anticorps de rat anti BrdU (1/20, clone BU 1/75 Abcys). Même si ces anticorps sont censés reconnaître tout les deux le BrdU, en pratique chacun reconnaît spécifiquement l'analogue choisi. Après 3 lavages au PBS-0,1% Triton, on ajoute les anticorps secondaires dilués au 1/50^{e} : anti rat couplé Alexa 488 (vert) pour le CldU et anti souris IgG1 couplé Alexa 546 (rouge) pour l'IdU (1.C). L'ADN peut aussi être détecté ensuite en utilisant comme anticorps primaire un anticorps anti ssDNA de souris d'Isotype IgG2a (Chemicon) et comme anticorps secondaire un anti souris IgG2a couplé Alexa 647 (bleu).). 20 µl de milieu de montage (Antifade Invitrogen) est ajouté et laissé polymériser sur la nuit. Les dilutions d'anticorps se font dans du PBS-0,1% triton et les incubations sont effectuées dans une chambre humide à 37°C.

Pour mesurer la vitesse en présence d'HU, celle-ci est ajoutée en même temps que le CldU, et les deux sont laissés pendant 2 h.

Pour mesurer la distance entre fourches, les cellules sont uniquement traitées au BrdU pendant 20 min. L'immunodétection se fait avec l'anticorps rat anti-BrdU (vert) et l'ADN est immunodétecté en utilisant le même anticorps primaire que précédemment et un anticorps secondaire anti souris couplé Alexa 546 (rouge) (Voir schéma 2).

L'acquisition se fait sur un microscope à fluorescence en utilisant un objectif 40X à immersion, les mesures des signaux sont réalisées avec le logiciel Métamorph et les analyses statistiques avec le logiciel Graph Pad Prism en utilisant le test de Mann Whitney.

Western blot

Les cellules sont prélevées directement dans du tampon Laemmi, puis traitées à la Benzonase (1 unité pour 10000 cellules, 30 min à 37°C) afin de dégrader l'ADN qui gênerait la migration. Les protéines sont ensuite séparées par électrophorèse en gel de polyacrylamide (gels commerciaux Invitrogen, NuPAGE® Tris acétate 3-8%), puis transférées sur une membrane de nitrocellulose en Tris-glycine-20% éthanol 2 h à 300 mA. La protéine d'intérêt est ciblée grâce à un anticorps primaire spécifique puis un anticorps secondaire couplé à la peroxydase, la détection se faisant par chimioluminescence. Anticorps : anti-claspine fourni par le laboratoire de T. Halazonetis (Peschiaroli et al. 2006), anti-Timeless (Santa Cruz, sc-12374), anti-Chk1 (abcam, ab22610), anti-phospho Chk1 S317 (Cell Signaling, 2344) anti-cdc25A (Santa Cruz, sc-7389), anti-γH2AX (Upstate, 07-627), anti-tubuline (YOL 1/34, abcam, ab6161), anti-actine (AC-40, Sigma,A 4700).

Cytométrie de Flux

On utilise des cellules marquées 30 min avec du BrdU 10 µM. Les cellules sont récoltées, lavées au PBS-1% BSA, puis resuspendues dans 200 µl de PBS-EDTA 3 mM. Les cellules sont ensuite fixées par ajout sur le vortex goutte à goutte de 5 ml d'Ethanol 70% sur la nuit à -20°C. Après centrifugation 5 min à 1000 rpm, le culot de cellules est traité avec 1 ml d'HCL (2 M, 30 mn à température ambiante) afin de dénaturer l'ADN. Après centrifugation 5 mn à 1000 rpm le culot est incubé avec 1 ml de 0.1M $Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$, pH 8.5 afin de neutraliser l'acide puis centrifugé 5 min et resuspendu à la concentration de 2.10^7 cellules/ml de PBS-1%BSA-0,5% tween20. Le BrdU est ensuite détecté avec un anticorps primaire souris anti BrdU (1/10, clone BD44, Becton Dickinson) et un anticorps secondaire anti souris couplé FITC (1/200). On ajoute aussi de l'iodure de propidium (10 µg/ml) pour détecter l'ADN total. L'acquisition se fait en utilisant un FACS Calibur (Becton Dickinson) et l'analyse avec le logiciel CellQuest (Becton Dickinson).

Tri par cytométrie de flux

Les cellules sont récoltées, lavées au PBS et resuspendues dans du PBS-EDTA 3 mM. Elles sont ensuite fixées à l'Ethanol 70%-PBS (30 min sur glace), puis lavées successivement dans de l'Ethanol 50%-PBS, 30%-PBS, puis du PBS. Les cellules sont ensuite resuspendues dans une solution de PBS EDTA (3 mM) contenant de l'Iodure de propidium (50 µg/ml), de la RNAse A (1 mg/ml) et 0.05% de NP40. Les cellules sont ensuite triées grâce au FacsAria (Becton Dikinson).

Tests de croissance et de viabilité cellulaire

Un même nombre de cellules est déposé dans des puits de plaques 96 puits. 24 h après, des doses croissantes de drogues sont ajoutées. 48 ou 72 h après l'ajout de drogue, le nombre de cellules vivantes est détecté en utilisant un kit colorimétrique au sel de tétrazolium (Cell Proliferation reagent WST-1 de ROCHE) et mesuré au luminomètre. Chaque point est fait en triplicat.

BrdU-IP- chip

Les cellules sont traitées 24 h avec 0.5 mM de Mimosine afin de les synchroniser en fin de G1. Elles sont relâchées, en les lavant 3 fois au PBS, en présence ou non de drogue (HU 10 mM), et 2 h avant le prélèvement on ajoute 100 µM de BrdU. Les cellules sont prélevées, lavées au PBS et l'ADN est extrait en utilisant un tampon de lyse (100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCL pH 8, 25 mM EDTA et 0.5 % SDS) et de la proteinase K (0.5 mg/ml), en incubant une nuit à 45°C. L'ADN est ensuite purifié en utilisant du Phénol/Chloroforme suivi d'une précipitation à l'éthanol en présence d'acétate de sodium (pH5.2). Le culot d'ADN immunoprécipité est ensuite traité à la RNAse et soniqué de façon à obtenir des fragments de 300 à 600 pb.

On utilise 10 µg d'ADN pour réaliser l'IP BrdU selon le protocole de *Chen et al* (Chen et al. 2010). L'ADN est dénaturé 5 min à 95°C et conservé ensuite sur glace. On utilise un anticorps de souris anti BrdU (clone B1/75 Becton Dikinson) pour immunoprécipiter l'ADN ayant incorporé le BrdU, en le mettant en contact avec la solution contenant l'ADN

pendant 20 min sur roue à température ambiante. Un anticorps secondaire anti souris IgG (SIGMA, M 7023) est ajouté à la solution et le tout est mis sur roue 20 min à température ambiante. Le complexe ADN-anticorps forme des agrégats qui seront isolés grâce à la formation d'un culot après centrifugation (15 min, 18500 g, 4°C). Les anticorps sont ensuite dégradés grâce à un traitement de 2 h à 55°C dans un tampon contenant de la protéinase K (Tris-HCL pH 8 50 mM, EDTA 10 mM, SDS 0.25% et proteinase K 0.25 mg/ml). L'ADN ainsi immunoprécipité est purifié sur colonne Minelute de Qiagen. Il est ensuite amplifié en utilisant le kit WGA2 GenomePlex Complete Whole Genome Amplification kit (Sigma) avec ajout de 0,1 mM de dUTP dans la réaction d'amplification. 7 µg d'ADN amplifié sont fragmentés et marqués en utilisant le kit GeneChip WT Double-Stranded DNA Terminal Labelling kit (Affymetrix, PN 900812). L'ADN est alors hybridé sur des puces Affymetrix « Gene chip human tiling 2.OR A Array » couvrant les chromosomes 1 et 6 en utilisant le kit GeneChip Hybridization, Wash, and Stain Kit (Affymetrix, PN 900720). Les puces sont scannées avec the Genechip scanner 3000 7G grâce à la plateforme Affymetrix de l'IRB à Montpellier dirigé par J. De Vos. L'analyse des résultats se fait ensuite en utilisant le logiciel « Tiling analysis software » d'Affymetrix.

Etalement métaphasique et Fish de FRA3B

Les cellules sont traitées 24 h à de faibles doses d'Aphidicoline (1 µg/ml), puis lavées au PBS et remises dans du milieu pendant 8 h avant prélèvement. Du nocodazole (5 µM) est ajouté pendant les deux dernières heures, afin d'augmenter le nombre de cellules en métaphase. Les cellules sont ensuite récoltées et mises dans une solution hypotonique (KCL 0.01 M + 15% SVF) avant d'être fixées par un mélange d'éthanol 100% (3 volumes) et d'acide acétique (1 volume) et laissées 24 h à 4°C. La préparation est ensuite étalée en laissant tomber une goutte de suspension cellulaire sur une lame. Après avoir laissé sécher, l'ADN est marqué à l'aide de 2 sondes, une dirigée contre le centromère du chromosome 3 et une deuxième dirigée contre le site fragile FRA3B. Pour la sonde centromérique il s'agit d'une sonde commerciale (Zytolight de Zytovision), alors que la sonde dirigé contre FRA3B nous a été fournie par A. Coquelle du laboratoire de C. Theillet à l'IRC à Montpellier. Pour le marquage, les lames sont lavées 30 min à 37°C avec du tampon 2X SSC, pH 7 contenant de l'Igepal (0.5%), puis déshydratées dans des bains progressifs d'Ethanol. En parallèle, on mélange 1 µl de sonde dirigée contre FRA3B et 9 µl de sonde centromérique, mélange que

l'on dénature 5 min à 95°C, puis 10 µL est mis entre la lame et une lamelle. Le tout est dénaturé 2 min à 80°C puis laissé sur la nuit à 37°C dans une chambre humide. Le lendemain les lames sont lavées dans du tampon de lavage (0.5X SSC, 0.1% SDS), puis marquées au DAPI (une goutte de solution à 1 µg/ml pendant 10 min) puis la lame est définitivement montée en mettant du milieu de montage entre lame et lamelle. Après avoir laissé séchée à température ambiante au moins 24 h, les lames sont observées au microscope à l'objectif 63X à immersion.

Quantification de l'expression des gènes

Pour l'extraction des ARN totaux, les sections de tissus tumoral ou normal congelées sont homogénéisées immédiatement dans du tampon de lyse du kit RNeasy et les ARN totaux sont extraits à l'aide du kit RNeasy (Qiagen). La qualité des ARN totaux est vérifiée sur un bioanalyseur Agilent 2100® en utilisant le kit RNA NanoLab® chip and RNA 6000 Nano Assay® kit (Agilent Technologies). 1 à 2 µg d'ARN totaux sont reverse transcrits grâce au kit High-Capacity cDNA Archive Kit (Applied Biosystems). Tous les gènes étudiés sont amplifiés en triplicat et les réactions de PCR ont été réalisées avec la technologie TaqMan Low Density Array (Applied Biosystems) et le système 7900HT fast real time PCR pour le cancer du colon et du sein, et la technologie Fluidigm Array pour le cancer du poumon. Pour normaliser l'expression des gènes, 16 gènes de ménage ont été évalués en utilisant le système LD Endogeneous Control Arrays (Applied). Le logiciel QBase (http://medgen.ugent.be/qbase/) a été utilisé pour tester la stabilité de l'expression des gènes de ménage.

CHAPITRE 3 : RESULTATS

Ce projet de thèse s'inscrit dans la continuité de travaux de l'équipe concernant l'identification d'une nouvelle fonction des homologues de CLASPINE et TIMELESS chez la levure *S. cerevisiae.* Les protéines MRC1 et TOF1 ont initialement été identifiées comme des médiateurs du checkpoint de réplication puisque leur absence entraine un défaut de phosphorylation de la kinase RAD53 (Alcasabas et al. 2001; Foss 2001). Cependant, des expériences de ChIP-chip ont montré que l'absence de MRC1 et TOF1 entrainait un découplage entre le réplisome et le site de synthèse d'ADN en présence d'HU, suggérant que ces protéines jouent aussi un rôle structural à la fourche de réplication (Katou et al. 2003). Il a été montré ensuite par notre laboratoire et par d'autres que cette fonction était indépendante de l'activation du checkpoint de réplication (Szyjka et al. 2005; Tourriere et al. 2005). Nous avons ainsi montré que les protéines MRC1 et TOF1 sont non seulement nécessaires au redémarrage des fourches après relâchement d'un arrêt HU mais aussi pour la progression normale des fourches en absence de stress exogène (Tourriere et al. 2005). MRC1 et TOF1 forment un complexe avec CSM3, une protéine impliquée comme TOF1 dans l'arrêt programmé des fourches au niveau de sites naturels de pause (Calzada et al. 2005). Toutes ces données indiquent que ce complexe MRC1-TOF1-CSM3 a une fonction structurale à la fourche nécessaire à la progression normale des fourches et à leur redémarrage après un stress réplicatif.

Au moment ou j'ai démarré ma thèse, le rôle de CLASPINE, TIMELESS et TIPIN dans l'activation du checkpoint de phase S venait d'être caractérisé (Kumagai and Dunphy 2000; Chini and Chen 2003; Unsal-Kacmaz et al. 2005; Yoshizawa-Sugata and Masai 2007). Cependant le rôle éventuel de ce complexe dans le maintien de la structure des fourches de réplication n'avait pas encore été étudié. Certaines données suggéraient que le rôle structural de ce complexe mis en évidence chez la levure pouvait être conservé chez les eucaryotes supérieurs. En effet, CLASPINE et TIMELESS interagissent avec de nombreuses protéines de la fourche de réplication, et ce même en absence de stress. L'interaction de CLASPINE avec des facteurs de réplication a surtout été caractérisée chez le Xénope, où CLASPINE interagit avec CDC45, POLε et RPA (Lee et al. 2005). Chez les mammifères, TIMELESS et TIPIN interagissent avec les MCMs, RPA, POLε et POLδ (Chou and Elledge 2006; Gotter et al. 2007). Il est aussi connu que l'absence de CLASPINE ou de TIPIN entraine des dommages de l'ADN en phase S (Chou and Elledge 2006; Liu et al. 2006) pouvant être causés par des défauts de réplication.

Par ailleurs, il a été montré que la prolifération cellulaire est affectée par la déplétion de CLASPINE et qu'elle est favorisée par la surexpression de ce même facteur (Lin et al. 2004; Yoshizawa-Sugata and Masai 2007). Ces données suggèrent que CLASPINE jouerait à la fois un rôle de suppresseur de tumeur via sa fonction checkpoint et un rôle d'oncogène du fait de son rôle positif sur la prolifération cellulaire lorsque cette protéine est surexprimée dans les lignées tumorales (Lin et al. 2004).

Ainsi afin d'expliquer cette apparente contradiction, nous avons émis l'hypothèse que CLASPINE et TIMELESS pourraient, en plus de leur fonction checkpoint, jouer un rôle structural à la fourche, comme nous l'avons montré chez la levure. Il est alors possible d'envisager que la surexpression de CLASPINE et TIMELESS dans les lignées tumorales puisse favoriser la prolifération cellulaire via la stabilisation des fourches, indépendamment du checkpoint de réplication. Ces cellules sont en effet soumises à un stress réplicatif permanent qui limite leur prolifération et active les checkpoints de phase S (Bartkova et al. 2005; Gorgoulis et al. 2005). Dans ce contexte, la surexpression de CLASPINE et TIMELESS pourrait aider les cellules tumorales à répliquer leur génome instable.

Le but de mon projet de thèse est donc d'une part de déterminer si le complexe CLASPINE / TIMELESS / TIPIN est nécessaire pour la progression et le maintien de la stabilité des fourches comme c'est le cas chez la levure, et d'autre part de déterminer dans quelle mesure la surexpression de ces facteurs est nécessaire pour la prolifération des cellules cancéreuses. Pour ce faire, nous avons utilisé la lignée cellulaire HCT116, issue d'une tumeur du colon, dans laquelle nous avons introduit par transduction lentivirale une construction exprimant un shRNA dirigé contre Claspine ou Timeless afin de diminuer le niveau d'expression de ces protéines. Nous disposons ainsi d'un modèle cellulaire dans lequel le niveau d'expression de ces protéines est ramené à un niveau plus proche de celui retrouvé dans des cellules primaires, mais dans le contexte de cellules cancéreuses, c'est-à-dire présentant une réplication potentiellement perturbée et un génome réarrangé.

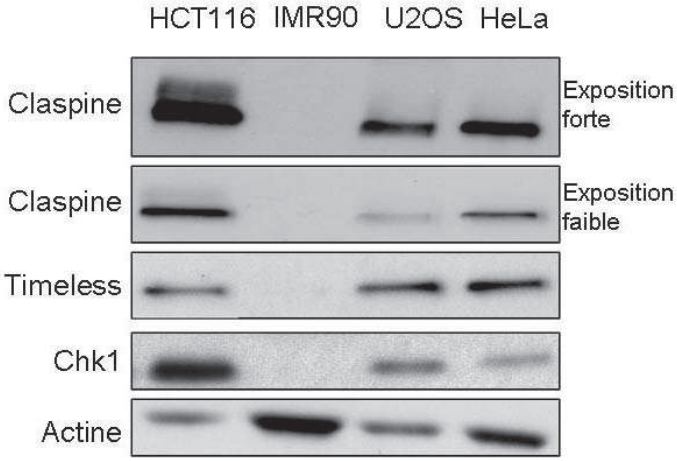
Grâce à ce modèle, nous avons observé que la surexpression de CLASPINE et TIMELESS dans la lignée HCT116 est importante pour la réplication efficace du génome et pour limiter l'instabilité génétique, indépendamment du checkpoint de réplication. Pour finir, notre équipe a été impliquée dans un projet collaboratif coordonné par Christophe Cazaux dans le cadre du Cancéropôle Grand Sud Ouest visant à mesurer le niveau d'expression de nombreux gènes impliqués dans la réplication, la réparation et la recombinaison de l'ADN

dans des tumeurs primaires du colon, du sein et du poumon. Cette étude a permis de confirmer que CLASPINE et dans une moindre mesure TIMELESS, sont surexprimées dans ces cancers. Ces travaux nous permettent d'intégrer notre hypothèse dans un modèle plus général d'expression des gènes des 3R dans différents cancers.

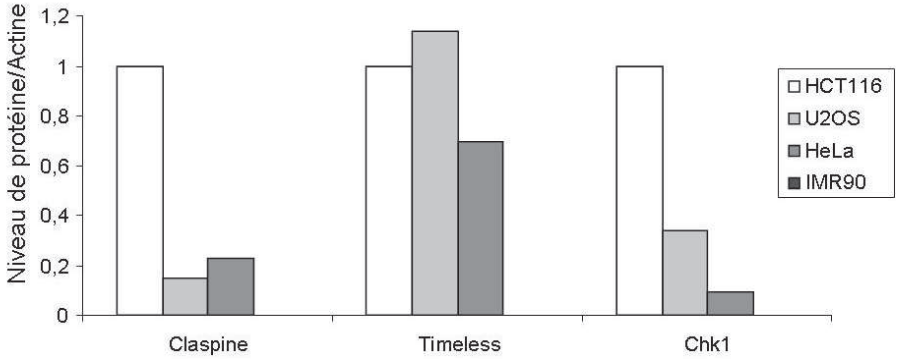
1 Caractérisation des lignées shRNA Claspine et Timeless.

Il a été montré que CLASPINE est fortement surexprimée dans certaines lignées cancéreuses par rapport aux cellules saines (Lin et al. 2004). En revanche, le niveau d'expression de TIMELESS dans des cellules cancéreuses est plus mal connu. Dans un premier temps, nous avons mesuré le niveau d'expression de ces protéines dans différentes lignées cancéreuses couramment utilisées au laboratoire. Nous pouvons voir que dans toutes les lignées cancéreuses testées (U2OS, HCT116 et HeLa), CLASPINE, TIMELESS et CHK1 sont très largement surexprimées par rapport aux cellules IMR90, qui sont des fibroblastes primaires dans lequel les niveaux de CLASPINE et TIMELESS sont indétectables par western blotting (Fig. 1A). Ce niveau d'expression varie entre les différentes lignées cancéreuses (Fig. 1B), comme cela a déjà été observé pour CLASPINE (Lin et al. 2004). CLASPINE, TIMELESS et CHK1 sont plus fortement exprimées dans les cellules HCT116. Nous avons observé que les lignées cancéreuses présentent deux à trois fois plus de cellules en phase S que les fibroblastes primaires (Fig. 1C). Même si CLASPINE est exprimée majoritairement en phase S, cette différence est cependant largement inférieure à la différence d'expression de CLASPINE entre cellules saines et cellules tumorales. Il est important de noter que CHK1 est aussi surexprimé dans les trois lignées cancéreuses (Fig. 1A et B), confirmant ce que nous avons observé dans des tumeurs primaires du colon (Pillaire et al. 2010).

A



B



C

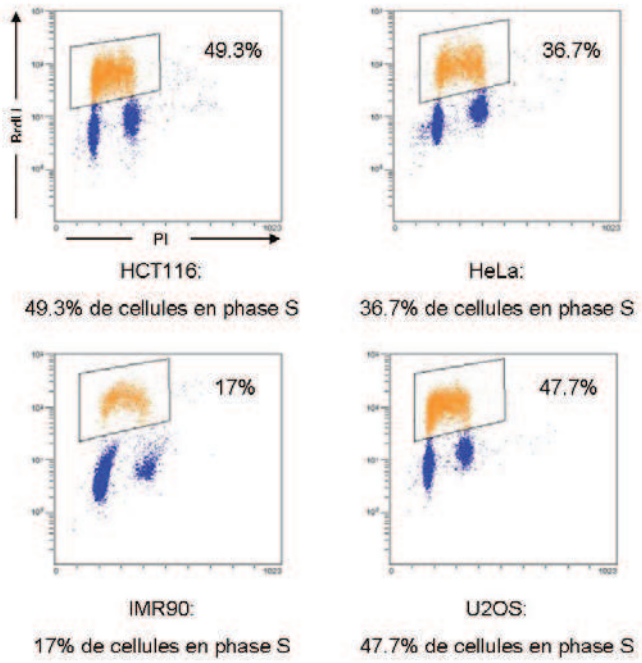
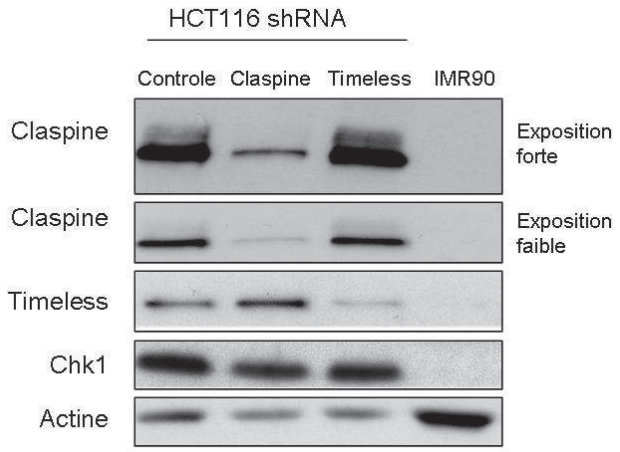


Figure 1. Comparaison du niveau d'expression de CLASPINE et TIMELESS dans différentes lignées cancéreuses (HCT116, U2OS, HeLa) et dans des fibroblastes primaires (IMR90). **A**. Mesure par western blot du niveau d'expression de CLASPINE, TIMELESS et CHK1 dans les cellules cancéreuses HCT116, HeLa et U2OS et dans des fibroblastes primaires IMR90. **B**. Quantification du niveau de CLASPINE, TIMELESS et CHK1 normalisé par rapport au niveau de l'ACTINE. **C**. Pourcentage de cellules en phase S mesuré par cytométrie de flux dans des cellules asynchrones marquées pendant 30 min avec 10 µM de BrdU.

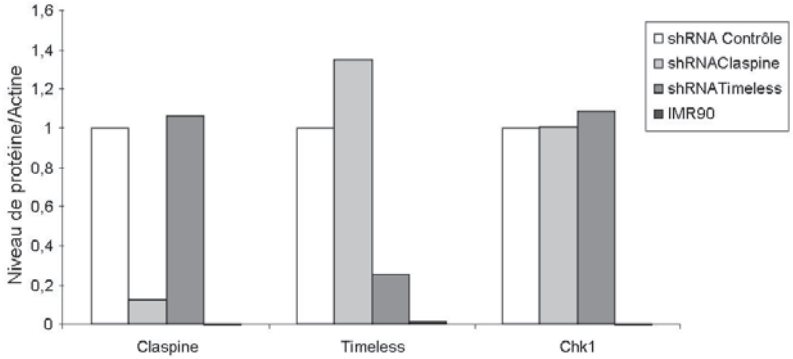
Pour la suite du projet, nous avons choisi de travailler avec la lignée HCT116, qui présente une expression de CLASPINE et TIMELESS particulièrement forte. Ces cellules ont également un niveau de prolifération élevé et un génome assez stable comparé à d'autres lignées cancéreuses. Afin de diminuer artificiellement le niveau d'expression de CLASPINE et TIMELESS dans ces cellules, nous les avons infectées avec un lentivirus exprimant un shRNA dirigé contre Claspine ou Timeless, ainsi qu'un shRNA contrôle. L'infection lentivirale permet d'infecter une très forte proportion de cellules et la sélection antibiotique du vecteur lentiviral nous permet d'éliminer les cellules n'ayant pas intégré le shRNA. Nous avons choisi de travailler avec une population hétérogène exprimant le shRNA d'intérêt. Ceci permet de s'affranchir de l'utilisation d'une population clonale, qui pourrait présenter des caractéristiques liées à la sélection du clone plutôt qu'à l'expression du shRNA. Par la suite j'utiliserai la dénomination shRNA Claspine, Timeless ou Contrôle pour parler de la lignée HCT116 exprimant un shRNA dirigé contre ces gènes.

Nous avons ensuite mesuré le niveau d'expression de CLASPINE et TIMELESS dans ces lignées shRNA, d'une part pour vérifier l'efficacité des shRNA, et d'autre part pour comparer le niveau de ces protéines dans ces lignées shRNA avec celui des cellules primaires (Fig. 2A). Nous pouvons voir une diminution de 87% de CLASPINE et de 74% de TIMELESS dans leurs lignées shRNA respectives, par rapport à la lignée shRNA Contrôle (Fig. 2B). La lignée shRNA Claspine présente deux à trois fois plus de cellules en phase S que les IMR90. Même si CLASPINE est majoritairement exprimée en phase S (Fig. 2C), cette différence reste largement inférieure à la différence d'expression entre les cellules shRNA Claspine et les IMR90, dont le niveau d'expression est en dessous du seuil de détection. A noter que la diminution de l'expression de ces protéines ne semble pas affecter globalement le cycle cellulaire puisque nous observons par cytométrie de flux la même proportion de cellules en phase S dans les shRNA Claspine, Timeless et contrôle (Fig. 2C). Nous disposons donc d'un système cellulaire dans lequel le niveau de CLASPINE ou de TIMELESS peut être ramené à un niveau proche de celui observé dans les cellules primaires, sachant que ces cellules cancéreuses ont la contrainte de répliquer rapidement un génome constamment soumis à un stress réplicatif.

A



B



C

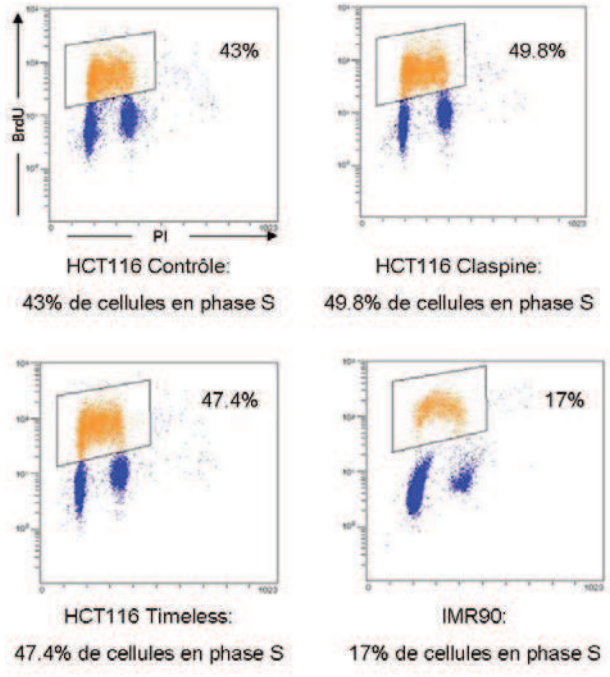


Figure 2.**A**. Mesure du niveau d'expression de CLASPINE, TIMELESS et CHK1 dans les cellules IMR90 et HCT116 infectées avec shRNA Contrôle, Claspine et Timeless. **B**. Quantification du niveau d'expression de CLASPINE, TIMELESS et CHK1 normalisé par rapport à l'ACTINE. **C**. Pourcentage de cellules en phase S mesuré par cytométrie de flux dans des cellules asynchrones traitées 30 min avec 10 µM de BrdU.

2 Activation du checkpoint de phase S

Nous avons ensuite caractérisé l'efficacité d'activation du checkpoint de phase S dans ces lignées, CLASPINE et TIMELESS étant des médiateurs du checkpoint de réplication. Pour cela, nous avons mesuré la phosphorylation de CHK1 sur la Serine 317, qui est représentative de l'activation de cette kinase via le checkpoint de phase S (Niida et al. 2007). Nous avons traité les cellules avec 10 mM d'HU, ce qui entraine une forte phosphorylation de CHK1 dès 1 h de traitement, et qui se maintient après 6 h de traitement (Fig. 3B). Nous pouvons voir que dans les shRNA Claspine et Timeless (Fig. 3A), la phosphorylation de CHK1 est aussi forte que dans les cellules shRNA Contrôle (Fig. 3B). La diminution des niveaux de CLASPINE et TIMELESS induite par les shRNA ne semble donc pas affecter l'activation de la voie ATR/CHK1 (Fig. 3B). Des résultats similaires ont été obtenus en mesurant la phosphorylation de CHK1 sur la Serine 345, lors de cinétiques plus courtes et en utilisant de plus faibles doses d'HU (résultats non montrés). Ces résultats contrastent avec des travaux précédents, montrant que la déplétion de CLASPINE réduit la phosphorylation de CHK1 (Chini and Chen 2003; Chini et al. 2006; Liu et al. 2006; Petermann et al. 2008). Il est important de noter que ces résultats ont été obtenus avec des lignées différentes de la notre et en utilisant des siRNA, permettant peut être une meilleure déplétion transitoire de CLASPINE. Le rôle de TIMELESS dans l'activation de CHK1 chez les mammifères est plus controversé et varie selon les modèles utilisés (Chou and Elledge 2006; Unsal-Kacmaz et al. 2007).

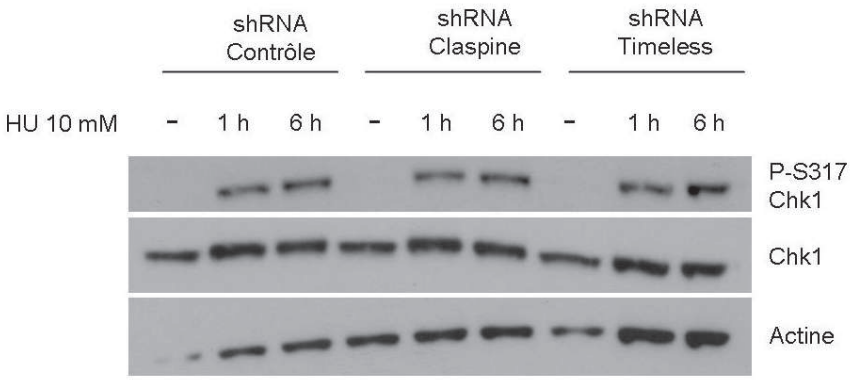
Une autre manière de mesurer l'efficacité du checkpoint de réplication est de mesurer son effet sur ses cibles biologiques. Ainsi CHK1 phosphoryle la phosphatase CDC25A en réponse au stress réplicatif et entraine sa dégradation (Jin et al. 2003). CDC25A est nécessaire au maintien de l'activité de CDK1/Cycline B, un complexe CDK nécessaire à l'entrée en mitose. Nous avons donc mesuré la dégradation de CDC25A en phase S dans nos différents shRNA, en réponse à un traitement HU (Fig. 3.C). Pour augmenter la proportion de cellules en phase S nous avons préalablement traité les cellules 24 h à la mimosine afin de les synchroniser à la transition G1/S. Nous les avons ensuite relâchées pendant 6 h en présence ou non d'HU et d'UCN01, un inhibiteur de CHK1 agissant en aval de la phosphorylation de la Sérine 317 (Graves et al. 2000). Dans cette expérience, nous pouvons voir que CDC25A est présente dans les cellules asynchrones, mais est absente dans les cellules traitées à la

mimosine, qui sont à la transition G1/S. Lors du relâchement de l'arrêt mimosine en présence d'HU, le checkpoint est activé, ce qui a pour conséquence la dégradation de CDC25A. En revanche lorsqu'on traite les cellules simultanément avec HU et UCN01, l'activation de CHK1 est inhibée et CDC25A n'est pas dégradé. Nous observons le même profil de dégradation de CDC25A induite par l'HU dans les cellules shRNA Contrôle, Claspine, et Timeless. Cette dégradation est bien dépendante de CHK1 puisqu'elle est supprimée par UCN01. Le checkpoint de réplication est donc bien fonctionnel dans ces lignées où l'expression de CLASPINE ou TIMELESS est réduite et la forte surexpression de ces protéines dans les cellules HCT116 n'est pas nécessaire à l'activation de ce checkpoint.

A



B



C

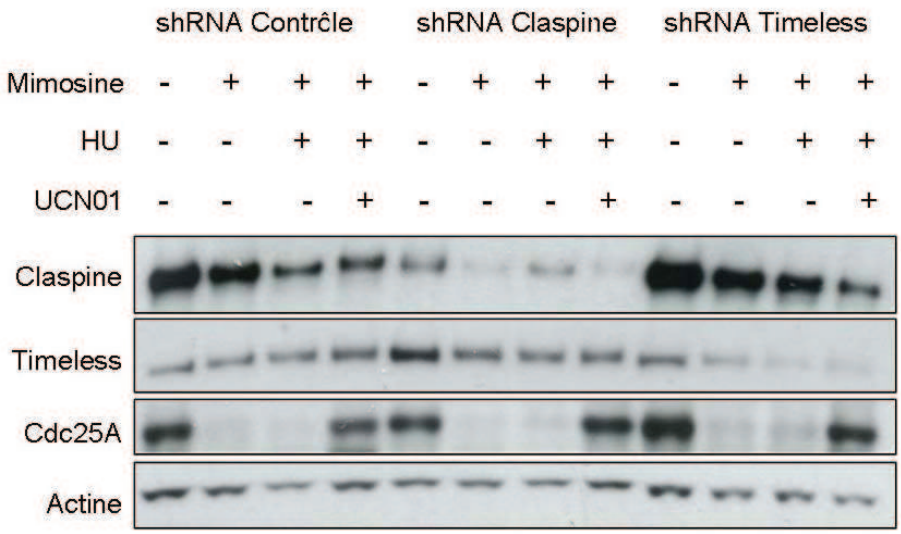


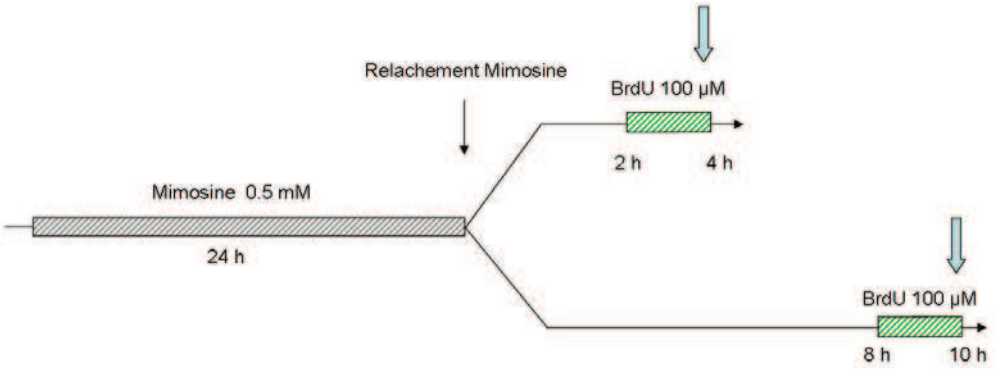
Figure 3. Activation du checkpoint de phase S dans des cellules déplétées en Claspine ou Timeless. **A**. Vérification de l'efficacité des shRNA. Analyse par western blot du niveau de CLASPINE et TIMELESS dans des HCT116 shRNA Claspine et Timeless. **B**. Analyse de la phosphorylation de la Serine 317 de Chk1 par western blot sur des cellules HCT116 shRNA Claspine et Timeless non traitées ou traitées 1 h ou 6 h avec de l'HU 10mM. **C**. Mesure du niveau d'expression de CLASPINE, TIMELESS et CDC25A dans des HCT116 shRNA Contrôle, Claspine et Timeless. Les cellules HCT116 shRNA Contrôle, Claspine and Timeless sont synchronisées à la transition G1/S avec 0,5 mM de mimosine pendant 24 h, puis relâchées 6 h en présence d'HU (10 mM) et d'UCN01 (300 nM).

Il a été montré chez la levure que des lésions de l'ADN consécutives à des problèmes de réplication activent une autre branche du checkpoint de phase S, appelée le DNA Damage Checkpoint (DDC). En absence de MRC1, la kinase RAD53 peut donc être activée par une autre voie, dépendante du médiateur RAD9 (Alcasabas et al. 2001). Ainsi, la phosphorylation de RAD53 en réponse au stress réplicatif ne reflète pas uniquement l'activation du checkpoint de réplication. En conséquence, il est important de noter qu'un défaut d'activation de ce checkpoint peut être masqué par l'activation secondaire du DDC. Notre laboratoire vient d'identifier de nouveaux médiateurs du checkpoint de réplication en utilisant la répression des origines tardives comme un marqueur spécifique et quantitatif de l'activation de cette voie de surveillance. En effet, il a été montré chez la levure que la voie MEC1/MRC1/RAD53 inhibe l'activation des origines tardives en présence de stress (Santocanale and Diffley 1998). Grâce à une approche de BrdU-IP-chip, l'analyse pan-génome de toutes les origines tardives dans une trentaine de mutants de levure a permis de montrer que MRC1 est incapable d'activer RAD53 en absence du complexe RFC-CTF18 (Crabbe et al. 2010).

En fonction de ces données, nous avons voulu tester si la dérepression des origines tardives pouvait également être utilisée chez l'Homme pour mesurer des défauts de checkpoint après inhibition de CLASPINE ou TIMELESS. Les données de la littérature concernant le timing de réplication à l'échelle du génome humain ont été obtenues sur des cellules asynchrones et triées par FACS à différents stades de la phase S (Woodfine et al. 2005; Chen et al. 2010; Hansen et al. 2010). Dans ces expériences, l'ADN immunoprécipité avec un anticorps anti-BrdU est hybridé sur des puces de type CGH array ou séquencé. Dans ce projet, nous avons choisi d'utiliser la technique de BrdU-IP-chip avec des tilling arrays Affymetrix couvrant les chromosomes 1 et 6 humain. Ces expériences ont été réalisées avec des cellules synchronisées car la quantité de cellules nécessaire pour l'IP BrdU (2.10^7 cellules) n'était pas compatible avec un tri préalable des cellules par FACS ($0.5x10^5$ cellules/h). Pour synchroniser les cellules en G1, nous les avons tout d'abord privées de sérum comme décrit précédemment (Le Francois et al. 2007). Comme les cellules ne rentraient pas en phase S de manière suffisamment synchrone, nous avons choisi d'utiliser un agent chimique bloquant les cellules de façon réversible à la transition G_1/S. Après avoir testé plusieurs drogues, nous avons opté pour la mimosine, malgré le risque d'induire des dommages à l'ADN (Krude 1999). La Mimosine est un chélateur du fer qui inhibe l'activité enzymatique de la RNR, enzyme essentielle à la synthèse du pool de nucléotides (Gilbert et

al. 1995). Elle arrête les cellules en fin de G_1, plus tôt que la Thymidine ou l'Aphidicoline (Krude 1999; Szuts and Krude 2004). Tout d'abord, nous avons vérifié que les cellules HCT116 se synchronisaient bien en G1 avec cette drogue. Nous avons traité les cellules 24 h à la mimosine (0.5 mM). Nous avons ajouté du BrdU 2 h avant la fin du traitement et l'incorporation de BrdU a été mesurée par cytométrie de flux. Nous obtenons un pic majoritaire de cellules en G1 (70-80%), qui n'incorporent pas le BrdU de façon détectable. Ces données indiquent que la Mimosine bloque le cycle très précocement avant l'entrée en phase S (Fig. 4B). Nous avons ensuite caractérisé la cinétique de relâchement de cet arrêt Mimosine. L'analyse par FACS montre que les cellules commencent à entrer en phase S environ 3 h après le relâchement. Pour visualiser la phase S précoce, nous avons récolté les cellules 4 h après relâchement en ajoutant le BrdU 2 h avant la collecte des cellules (Fig. 4A et B). Dans ces conditions, environ 45% des cellules sont en début de phase S. Pour la phase S tardive, nous avons choisi le temps 10 h, pour lequel environ 50% des cellules sont en fin de phase S (Fig. 4A et B). Suivant ces conditions, l'ADN de cellules shRNA Contrôle est récolté à 4 h et 10 h après relâchement de Mimosine. L'ADN néorépliqué est immunoprécipité à l'aide d'un anticorps dirigé contre le BrdU, puis est hybridé sur puce Affymetrix. Le signal obtenu est normalisé par rapport à l'ADN génomique total. Les pics obtenus correspondent aux régions enrichies lors de l'immunoprécipitation et donc aux régions répliquées (Fig. 5A). La première expérience a été réalisée en absence de stress afin d'une part de comparer le profil de réplication obtenu avec ceux déjà publiés et d'autre part de définir les régions répliquées précocement et tardivement dans les cellules HCT116 (Fig. 5A). Nous avons ainsi observé que le profil de réplication obtenu 4 h après relâchement dans ces cellules correspond au profil de réplication précoce précédemment publié pour les cellules HeLa (Woodfine et al. 2005; Chen et al. 2010). L'analyse détaillée de ces profils montre cependant quelques différences, probablement liées au fait que les cellules HeLa ont été collectées à un stade légèrement plus tardif (voir par exemple les pics à 190 Mb sur le chr. 1 ou 65 Mb sur le chr. 6 ; Fig 5B). Au niveau du bras droit du chromosome 6, les pics sont également plus larges dans les cellules HeLa, ce qui suggère que les fourches de réplication ont progressé plus loin. Dans les cellules HCT116, le profil de phase S tardive (10 h après relâchement) montre de nouvelles régions répliquées, qui n'avaient pas encore initié la réplication dans l'échantillon précoce (Fig. 5A). Inversement, les régions répliquées à 4 h disparaissent sur le profil à 10 h. Nous pouvons donc conclure que cette technique permet de différencier assez finement les régions répliquées précocement et tardivement.

A



B

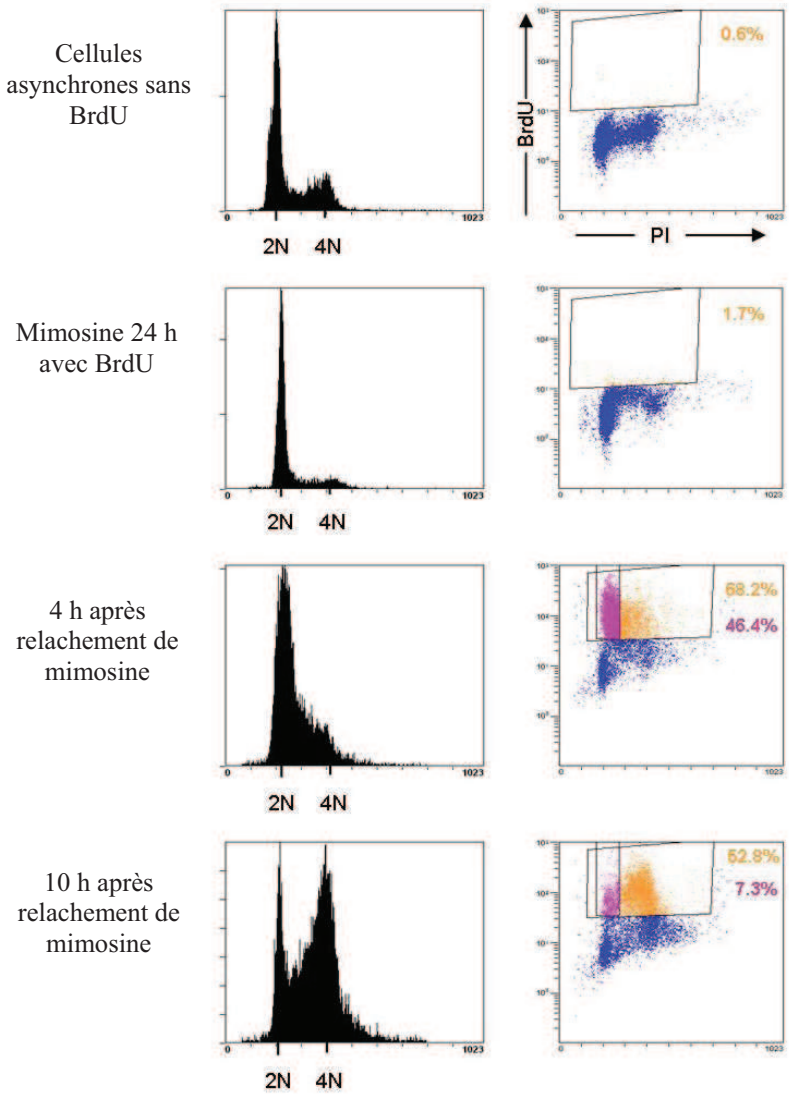
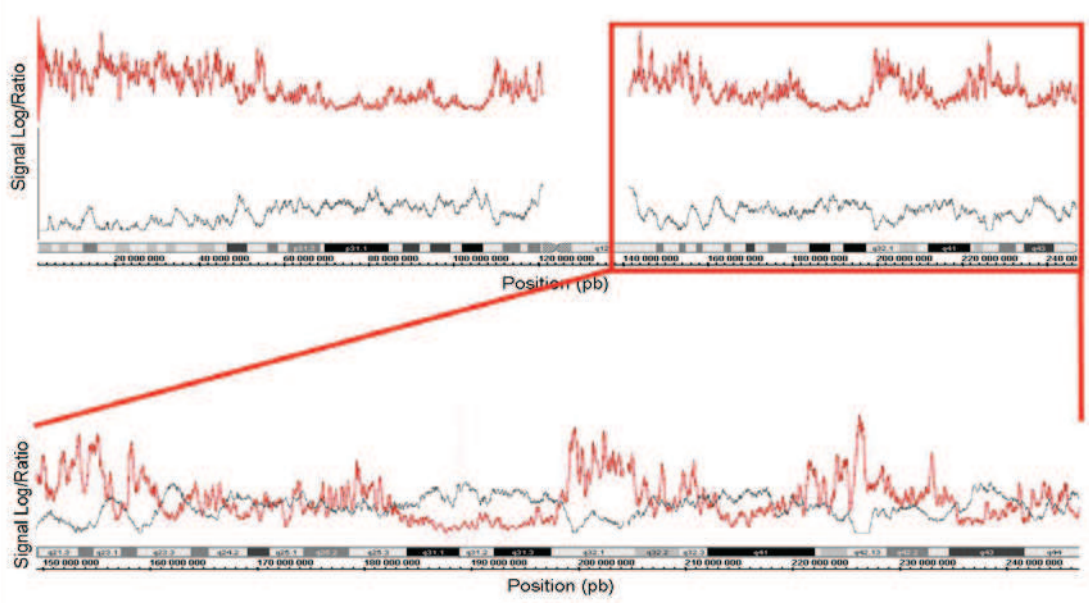


Figure 4. Protocole de synchronisation et de marquage au BrdU utilisé par la suite pour les expériences de BrdU-IP-chip **A**. Procédure de synchronisation des cellules en début et fin de phase S. Les cellules sont traitées 24 h à la mimosine, relâchées en lavant 3 fois au PBS, et récoltées 4 h ou 10 h après relâchement. Le BrdU est ajouté 2 h avant de récolter les cellules afin de marquer l'ADN en cours de réplication. **B**. Vérification des étapes de synchronisation en cytométrie de flux. Colonne de gauche : analyse FACS par marquage en iodure de propidium (PI). Colonne de droite : analyse FACS par marquage en PI et BrdU (ajouté à 10 µM 30 min avant récolte des cellules) Les chiffres en orange représentent le pourcentage de cellules en phase S et les chiffres en rose représentent le pourcentage de cellules en début de phase S.

A



B

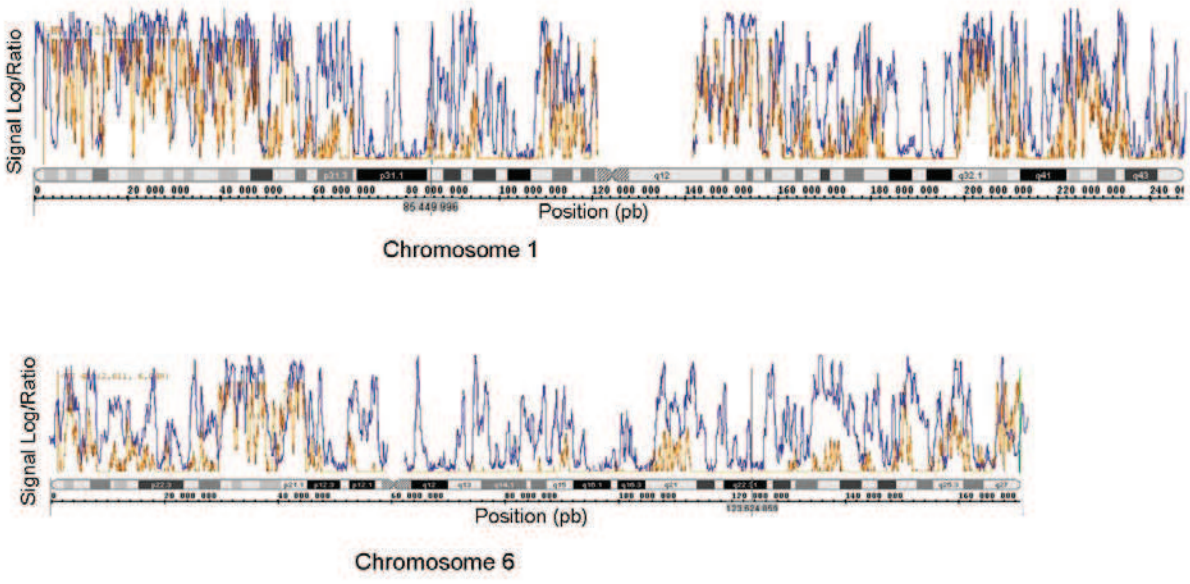
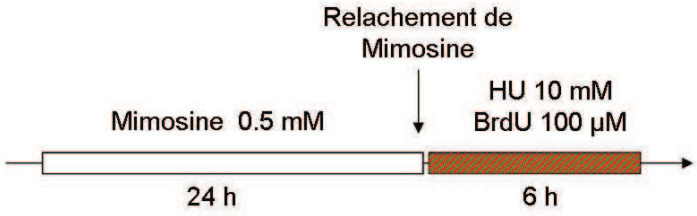


Figure 5. Cartographie par BrdU-IP-chip des régions répliquées précocement et tardivement dans des cellules HCT116 traitées comme décrit à la figure 4. **A**. Profils de réplication du chromosome 1 humain. Nous avons réalisé une expérience de CHIP on chip à partir de cellules HCT116 Contrôle. L'ADN répliqué est immunoprécipité avec un anticorps anti-BrdU et hybridé sur des puces Affymetrix couvrant les chromosomes 1 et 6 humains. En rouge, le profil de phase S précoce (4 h après relâchement de l'arrêt induit par la mimosine) et en gris le profil de phase S tardive (10 h après relâchement). Les pics représentent les régions en cours de réplication au moment du pulse de BrdU. **B.** Comparaison du profil de réplication précoce dans les HCT116 (orange), avec le profil précoce obtenu dans des cellules HeLa (bleu) dans le laboratoire de C. Thermes (Chen et al. 2010).

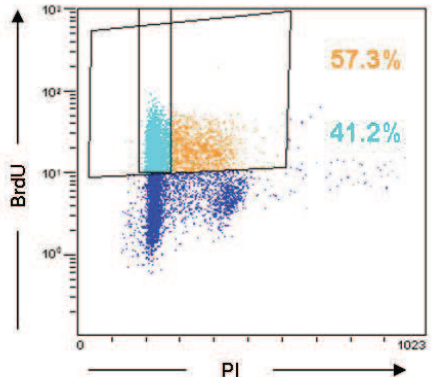
Nous avons ensuite déterminé si le timing de réplication est affecté dans nos lignées lorsque le checkpoint de phase S est activé par l'HU et si ces différences dépendent de CLASPINE ou de TIMELESS. Pour ce faire, les cellules shRNA Contrôle, Claspine et Timeless ont été relâchées de Mimosine pendant 6 h en présence d'HU et de BrdU. Dans ce cas, les cellules restent bloquées pour la majorité en début de phase S (Fig. 6A, B). Dans les cellules shRNA Contrôle, le profil obtenu après BrdU-IP-chip est similaire à celui obtenu en début de phase S sans HU. Il est également identique dans les cellules shRNA Claspine ou Timeless (Fig. 6C). Aucune des zones répliquées tardivement dans la figure 4A n'est répliquée dans les cellules shRNA Claspine et Timeless, ce qui suggère que l'initiation de la réplication dans les régions tardives est correctement réprimée par le checkpoint dans ces cellules. Ainsi, la diminution de l'expression de CLASPINE ou TIMELESS ne semble pas affecter le timing de réplication en présence de stress, ce qui indique que le checkpoint est parfaitement fonctionnel dans ces cellules.

Cette première série d'expériences nous a permis de caractériser les lignées cellulaires que nous avons construites. Nous disposons donc de lignées cancéreuses dans lesquelles le niveau de CLASPINE ou de TIMELESS est ramené à un niveau proche de celui des cellules primaires. Nous avons vu que cette diminution n'affecte pas l'efficacité du checkpoint, puisque CHK1 est toujours phosphorylée, CDC25A est bien dégradé et la réplication des zones tardives est correctement réprimée en présence d'HU. Avec ce système, nous pouvons donc étudier le rôle de CLASPINE et TIMELESS à la fourche indépendamment de leur fonction dans l'activation du checkpoint de phase S.

A



B



Synchronisation 24 h en Mimosine et relâchement 6 h en HU

C

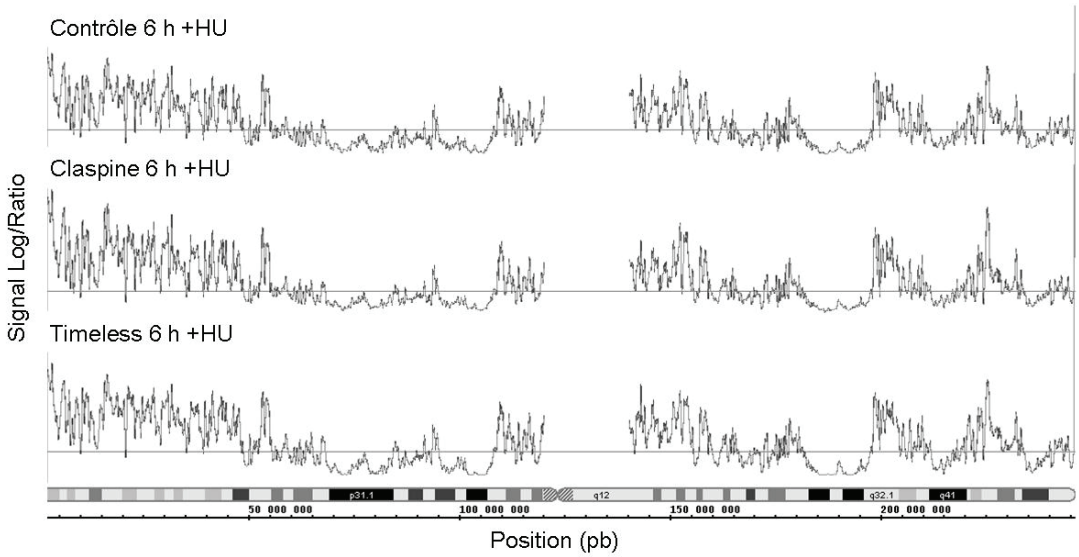


Figure 6. Analyse par BrdU-IP-chip des profils de réplication dans des cellules HCT116 shRNA Claspine et Timeless. **A**. Protocole de synchronisation et de marquage au BrdU des cellules en phase S précoce. Les cellules sont synchronisées 24 h avec de la mimosine et relâchées 6h en présence d'HU (10 mM) et de BrdU (100 µM). **B**. Analyse en cytométrie de flux. 57.3% de cellules traitées comme indiqué en A sont en phase S et 41.2% en phase S précoce. **C**. Profils de réplication obtenus dans les cellules shRNA Contrôle, shRNA Claspine et shRNA Timeless après traitement comme indiqué en A. Les pics se trouvant au dessus de la ligne de base correspondent à des régions enrichies après immunoprécipitation du BrdU et représentent donc les régions répliquées en présence d'HU.

3 Rôle de CLASPINE et TIMELESS au cours de la réplication

Chez la levure *S. cerevisiae*, les homologues de CLASPINE et TIMELESS sont nécessaires au maintien de la stabilité des fourches, et leur suppression affecte la progression des fourches de réplication lors d'une phase S normale. Pour déterminer si c'est aussi le cas dans les cellules humaines, nous avons mesuré la vitesse de progression des fourches dans les cellules HCT116 shRNA Contrôle, shRNA Claspine et Timeless. Pour cela, nous avons utilisé la technique du peignage moléculaire, qui nous permet de mesurer sur des fibres individuelles la vitesse des fourches de réplication et la distance entre deux signaux adjacents. Des cultures asynchrones de cellules HCT116 déplétées en CLASPINE ou TIMELESS (Fig. 7A) ont été incubées 10 min avec de l'IdU et 20 min avec du CldU afin de marquer l'ADN néorépliqué (Fig. 7B). Nous avons ensuite sélectionné les fibres présentant des signaux IdU/CldU contigus et mesuré les signaux de CldU, qui représentent la distance parcourue par les fourches individuelles en 20 minutes. Après analyse d'une centaine de fibres, nous avons déterminé une longueur médiane de 26.7 kb pour les shRNA Contrôle, ce qui correspond à une vitesse de 1.34 kb/min. Pour les cellules déplétées en CLASPINE et TIMELESS, nous obtenons respectivement une vitesse de 1.04 kb/min et 0.98 kb/min. Les fourches sont donc respectivement 29% et 37% plus rapides dans les cellules Contrôle que dans les cellules déplétées en CLASPINE et TIMELESS (Fig. 7D). Cette différence est comparable à celle observée pour les mutants *mrc1Δ* et *tof1Δ* de levure (Tourriere et al. 2005). Un ralentissement similaire a été obtenu par d'autres groupes après déplétion de CLASPINE ou TIMELESS dans des cellules HeLa (Unsal-Kacmaz et al. 2007; Petermann et al. 2008). En revanche, il semblerait que la vitesse de fourche soit moins affectée (de l'ordre de 15%) lorsque CLASPINE est déplétée dans des cellules primaires (Petermann et al. 2008). Cela pourrait s'expliquer par le fait que ces cellules rencontrent moins d'arrêts de fourches et donc nécessite moins de CLASPINE pour répliquer correctement leur génome.

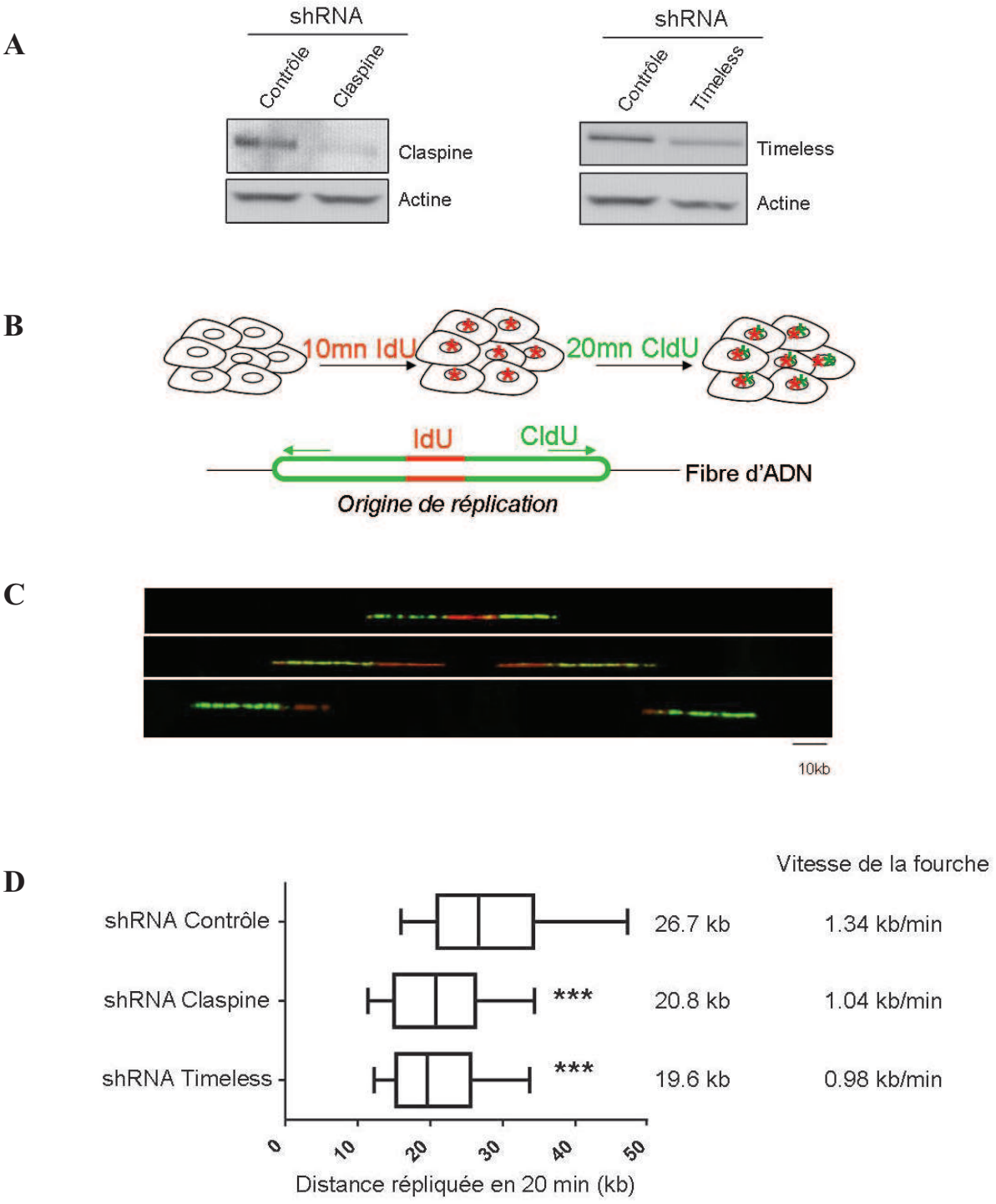
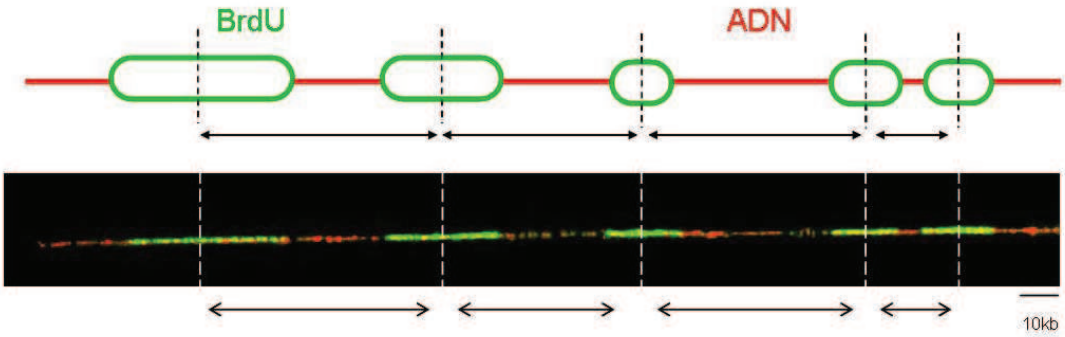


Figure 7. Etude par peignage moléculaire de la progression des fourches de réplication dans les cellules HCT116 infectées par des shRNA Contrôle, Claspine et Timeless. **A**. Vérification de l'efficacité des shRNA par western blot. **B**. Les fourches de réplication actives dans une population de cellules asynchrones sont marquées par un pulse d'IdU de 10 min et de CldU de 20 min. **C**. Exemples de fibres marquées et analysées par peignage moléculaire. Rouge : IdU. Vert : CldU. **D**. Mesure de la vitesse des fourches de réplication dans des cellules HCT116 shRNA Contrôle, Claspine et Timeless par peignage moléculaire. Seules les fibres présentant des signaux rouge/vert contigus sont prises en compte et sur ces fibres seuls les signaux CldU (vert) correspondant à 20 min de réplication sont ensuite mesurés afin de déterminer la vitesse des fourches de réplication. Les boites représentent 25-75% des signaux CldU et la barre verticale représente la médiane exprimée en kb. La différence entre les distributions est déterminée par un test de Mann-Witney ***$P < 0.0001$. Résultat représentatif de 3 expériences indépendantes.

Dans la plupart des cellules, le ralentissement des fourches de réplication est compensé par l'activation de nouvelles origines de réplication (Tuduri et al. 2010). Afin de déterminer si c'est aussi le cas pour les cellules shRNA Claspine et Timeless, nous avons mesuré par peignage moléculaire la distance de centre à centre entre signaux de BrdU dans des cellules asynchrones (Fig. 8A). Nous observons une diminution de la distance entre signaux de BrdU d'environ 15 à 20 % pour les shRNA Claspine et Timeless, ce qui reflète une augmentation significative de l'activation des origines (Fig. 8B).

En conclusion, ces expériences montre que les cellules shRNA Claspine et Timeless conservent un niveau de CLASPINE et TIMELESS suffisant pour activer efficacement la voie ATR/CHK1 du checkpoint de phase S. Cependant, ce niveau est insuffisant pour assurer une progression normale des fourches de réplication. Ce défaut d'élongation est en partie compensé par l'activation d'origines de réplication additionnelles, appelées origines dormantes. La surexpression de CLASPINE et TIMELESS dans ces cellules cancéreuses n'affecte donc pas l'activation du checkpoint de phase S mais est nécessaire pour assurer une progression efficace des fourches de réplication.

A



B

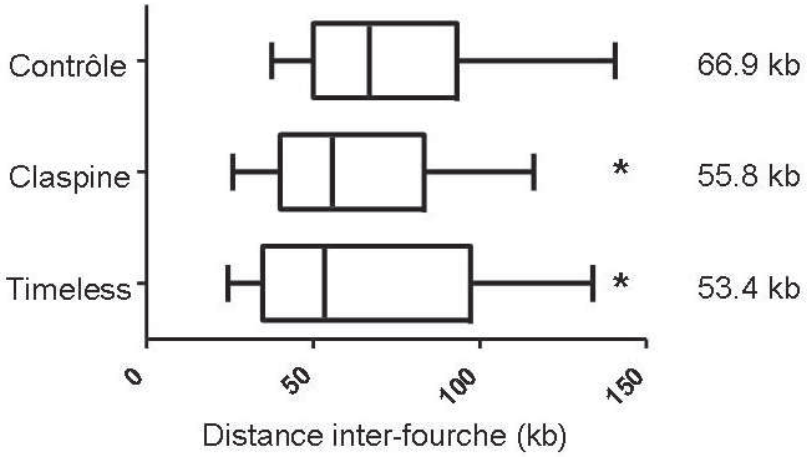


Figure 8. Mesure de la distance moyenne entre deux fourches. **A**. Les cellules asynchrones sont traitées 20 min au BrdU pour mesurer les fourches de réplication actives. L'incorporation de BrdU est détectée avec un anticorps anti-BrdU (vert) et la fibre d'ADN est détectée par un anticorps anti-guanosine (rouge). La distance entre deux signaux de BrdU adjacents est ensuite mesurée pour chacune des fibres. **B**. Distribution des distances entre signaux de BrdU dans les cellules shRNA Contrôle, Claspine et Timeless. La médiane est exprimée en kb. *: P< 0,01.

4 Rôle de CLASPINE et TIMELESS dans le maintien de l'intégrité du génome

Des arrêts de fourches de réplication peuvent se produire spontanément au cours d'une phase S normale lorsque la fourche rencontre des complexes protéiques fortement associés à l'ADN ou des structures particulières d'ADN difficiles à répliquer. Ces sites de pause naturels ont été bien étudiés chez la levure. Ils incluent les centromères, les télomères, et les gènes fortement transcrits, tels que ceux codant les ARNr et ARNt (Ivessa et al. 2003; Prado and Aguilera 2005). L'arrêt de la fourche peut conduire à sa déstabilisation et à la formation de cassures double brin (Osborn et al. 2002; Sogo et al. 2002) qui sont majoritairement réparées par recombinaison homologue. Ce mécanisme de réparation peut avoir pour conséquence de générer de l'instabilité génomique.

L'inhibition de CLASPINE et de TIMELESS entrainant un ralentissement des fourches de réplication, nous avons ensuite voulu déterminer si cela pourrait avoir des conséquences sur la stabilité du génome. Nous avons tout d'abord mesuré si les cellules shRNA Claspine et Timeless accumulent plus d'histone H2AX phosphorylée (γ–H2AX), qui est un marqueur de l'activation du DNA damage checkpoint et de la présence de cassures double brins (Fernandez-Capetillo et al. 2004) (Fig. 9A). Nous pouvons voir que dans les lignées déplétées en Claspine et Timeless, il y a une augmentation de la quantité de γ–H2AX par rapport aux cellules Contrôle, suggérant une accumulation spontanée de cassures de l'ADN dans ces cellules.

Afin de déterminer si la présence de γ–H2AX dans ces cellules est bien dûe à des défauts de réplication, nous avons mesuré le niveau de γ–H2AX au cours du cycle cellulaire. Pour cela, nous avons trié les différentes lignées par cytométrie de flux afin de récupérer spécifiquement des cellules en phase G1, S précoce et S tardive (Fig. 9B). Pour chacune des fractions récupérées, nous avons ensuite déterminé la présence de γ–H2AX par western blotting (Fig. 9C), en normalisant le niveau de γ–H2AX par rapport à la TUBULINE. Nous voyons tout d'abord un enrichissement de γ–H2AX en phase S par rapport à G_1, quelle que soit la lignée. Il y a également une augmentation de γ–H2AX dans les cellules shRNA Claspine et Timeless par rapport aux cellules shRNA Contrôle, indépendamment du stade de la phase S. Finalement, on constate une forte augmentation de γ–H2AX dans les cellules

shRNA Timeless en phase S tardive par rapport à la phase S précoce, cette différence n'étant pas observée dans les cellules shRNA Contrôle ou Claspine (Fig 9D). Il semblerait donc que les cellules shRNA Timeless montrent des signes de stress réplicatif préférentiellement en fin de phase S. Pour confirmer cela, il serait intéressant d'analyser la distribution de γ–H2AX par ChIP-chip dans des cellules asynchrones, afin de vérifier si ce signal est enrichi dans les régions répliquant tardivement.

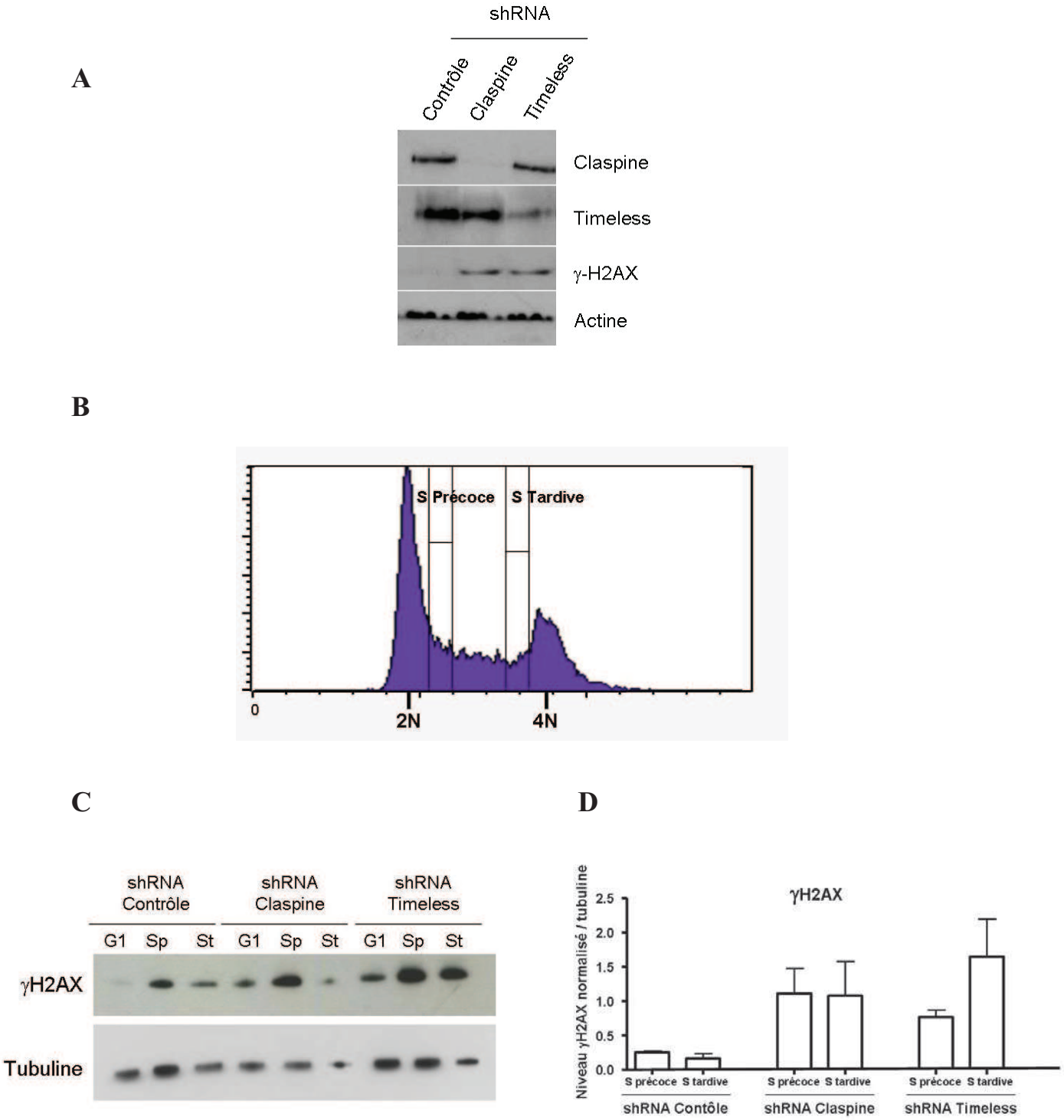
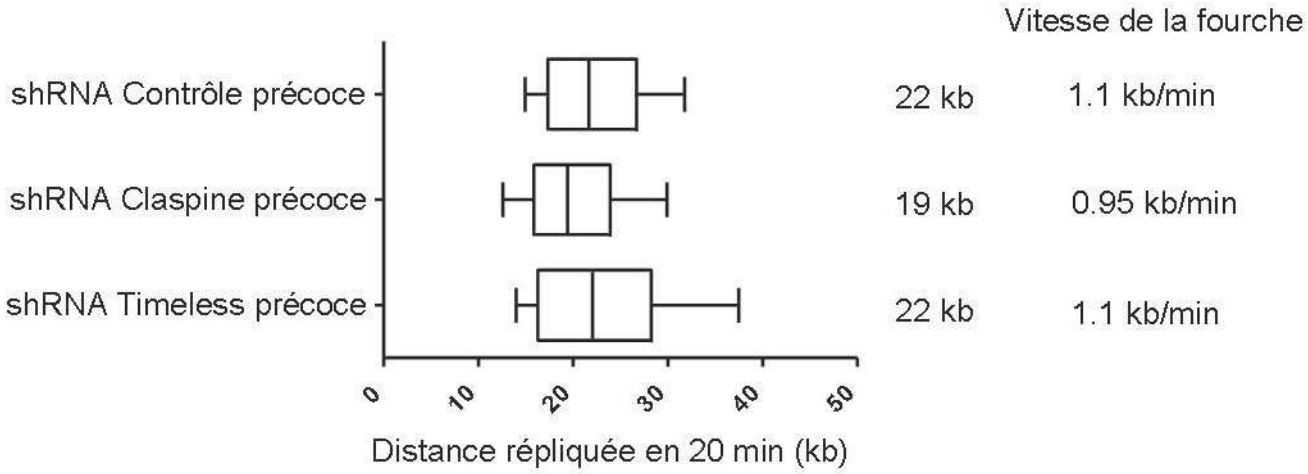


Figure 9. Analyse de la phosphorylation de H2AX (γ–H2AX) dans des cellules HCT116 shRNA Contrôle, Claspine et Timeless. **A**. Analyse par western blot du niveau d'expression de CLASPINE, TIMELESS et γ–H2AX dans une population asynchrone de cellules HCT116 shRNA Contrôle, Claspine et Timeless. **B**. Image représentative des fractions de cellules en phase S précoce et tardive récupérées après tri par FACS suivant leur contenu en ADN déterminé en Iodure de Propidium. **C**. Western blot mesurant la quantité de γ–H2AX dans les fractions G1, S précoce et S tardive récoltées après tri au FACS (comme décrit en B) dans des cellules shRNA Contrôle, Claspine et Timeless. Sp : cellules en phase S précoce. St : cellules en phase S tardive. **D** Quantification du signal γ–H2AX obtenu en western blot en phase S précoce et tardive dans les shRNA Contrôle, Claspine et Timeless normalisé avec la tubuline. Cette quantification représente la somme de 3 expériences indépendantes.

Par la suite, nous avons cherché à déterminer si cette accumulation de γ–H2AX en phase S tardive est liée à des problèmes de réplication. Pour cela, nous avons mesuré la vitesse de réplication en début et en fin de phase S par peignage moléculaire, dans nos trois lignées. Comme précédemment, les cellules sont marquées à l'IdU (10 min) et au CldU (20 min) puis sont triées par cytométrie de flux et collectées en début et en fin de phase S. Les vitesses de fourches de réplication sont ensuite déterminées dans chacune de ces fractions cellulaires par peignage moléculaire. La figure 10 montre le résultat d'une expérience pilote réalisée avec les trois lignées. Nous pouvons voir que, dans les cellules en phase S précoce, il n'y a pas de différence entre les shRNA Contrôle, Claspine et Timeless, la vitesse des fourches oscillant entre 0.95 et 1.1 kb/min. En revanche, les fourches progressent plus vite en fin de phase S dans les cellules shRNA Contrôle (1.5 kb/min) que dans les cellules shRNA Claspine (1.3 kb/min) et shRNA Timeless (1.2 kb/min). Une progression plus rapide des fourches en fin de phase S a déjà été observée dans d'autres types cellulaires (Malinsky et al. 2001; Frum et al. 2009), ce qui suggère que la vitesse de progression des fourches est régulée au cours de la phase S. Cette régulation est perdue préférentiellement dans les cellules shRNA Timeless, ce qui corrèle avec un enrichissement en γ–H2AX en fin de phase S. Ces expériences devront être répétées afin de confirmer que la surexpression de CLASPINE et TIMELESS dans les cellules tumorales facilite la réplication de certaines régions du génome.

A



B

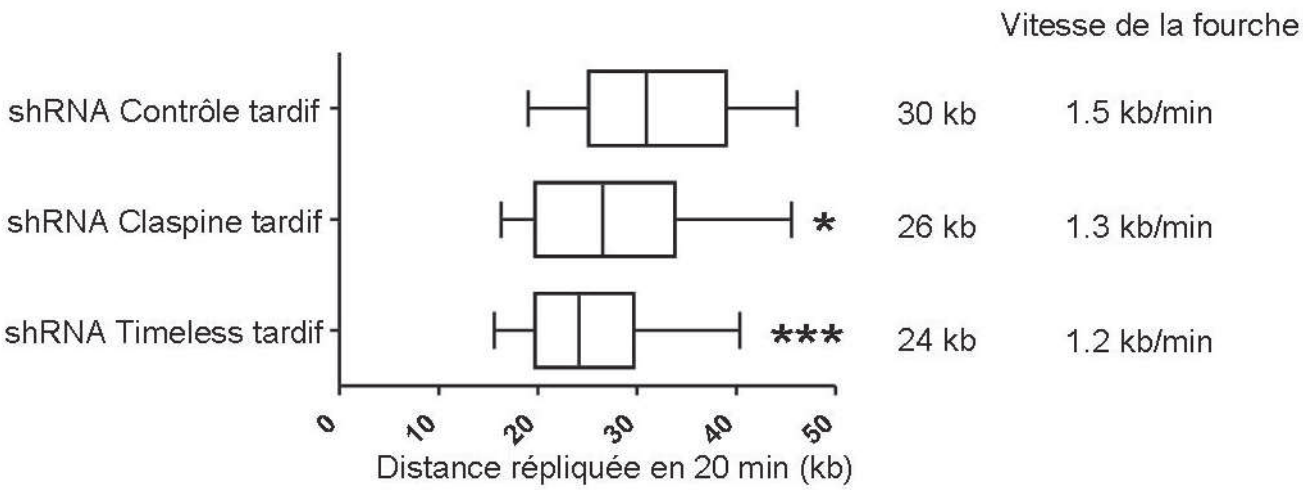
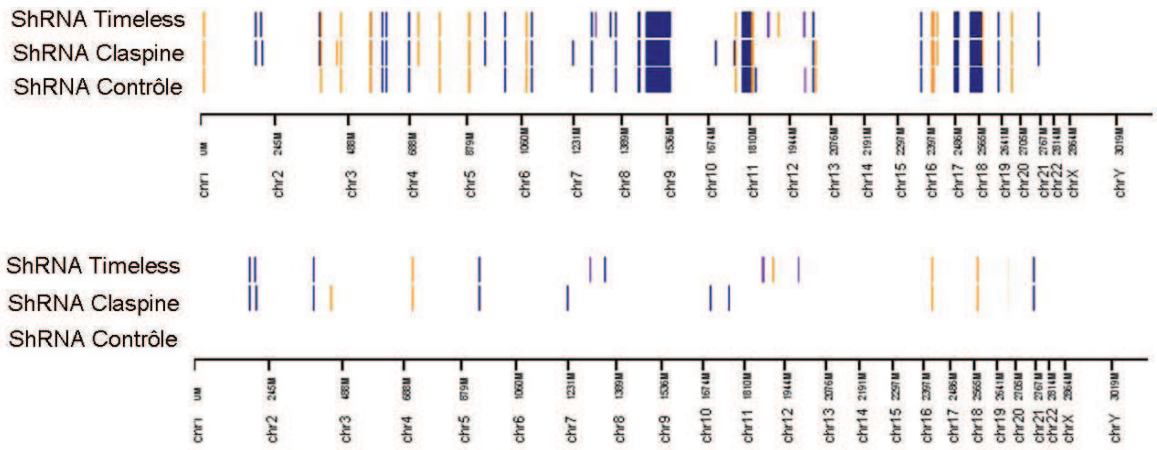


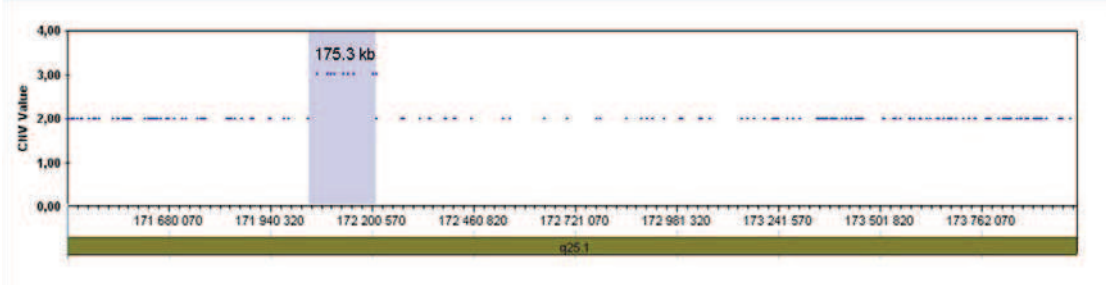
Figure10. Analyse par peignage moléculaire de la vitesse des fourches de réplication dans des cellules shRNA Contrôle, Claspine et Timeless et collectés par FACS en phase S précoce (A) ou tardive (B). Préalablement au tri les cellules asynchrones sont marquées à l'IdU et au CldU suivant le protocole décrit en figure 7B.

Nous avons ensuite mesuré directement les conséquences de la déplétion de CLASPINE et TIMELESS sur la stabilité du génome. Pour cela, nous avons hybridé l'ADN génomique de ces lignées sur des puces SNP-CGH (Human Hap300-Duo Illumina), qui permettent de mesurer les variations de copies de gènes (délétions et amplifications) et les pertes d'hétérozygotie (LOH) à l'échelle du génome avec une résolution moyenne de 90 kb. Grâce à cette approche, nous avons détecté plus de 30 réarrangements dans les cellules Contrôle, que l'on trouve aussi dans les shRNA Claspine et Timeless (Fig. 11A). La plupart de ces réarrangements sont connus et sont spécifiques de la lignée HCT116 (Snijders et al. 2001). Si l'on considère uniquement les réarrangements spécifiques aux lignées shRNA Claspine et Timeless, on en trouve respectivement 14 et 22 (Fig. 11A, C). Certains de ces réarrangements sont spécifiques de la lignée Claspine ou de la lignée Timeless et d'autres sont communs aux 2 lignées. La forte résolution des puces utilisées permet de déterminer avec précision les bornes des réarrangements (Fig. 11B). Dans la majorité des cas, ces réarrangements sont retrouvés à proximité d'un site fragile commun (CFS ; Fig. 11C). Afin de déterminer la fréquence de cassures des CFSs dans nos lignées, nous avons mesuré l'expression du site FRA3B, qui est décrit dans la littérature comme le site fragile le plus actif dans les cellules humaines. Pour cela, nous avons réalisé des étalements métaphasiques à partir de lignées shRNA traitées avec de faibles doses d'Aphidicoline, un inhibiteur des ADN polymérases qui est connu pour induire l'expression des sites fragiles. Les cassures chromosomiques sont visualisées par coloration de l'ADN au DAPI. Le site FRA3B et le centromère du chromosome 3 sont détectés avec des sondes FISH spécifiques. La fréquence de cassures au niveau de FRA3B est ensuite déterminée pour chacune des lignées. Nos premiers résultats indiquent une augmentation du nombre de cassures à FRA3B dans le shRNA Timeless par rapport au shRNA Contrôle de 2 à 3 fois avec ou sans traitement à l'Aphidicoline (Fig. 11D). Il serait aussi intéressant de mesurer l'expression d'autres sites fragiles communs. Concernant Claspine, nous détectons une augmentation de 2,5 fois en absence d'Aphidicoline par rapport aux cellules Contrôle, ce qui a déjà été observé dans d'autres lignées (Focarelli et al. 2009). En revanche, nous n'observons pas d'augmentation de la fréquence de cassures à FRA3B après traitement à l'Aphidicoline.

A



B



C

	Nombre de réarrangements spécifiques	Nombre de site fragiles impliqués	Proportion de réarrangements situés dans les sites fragiles
Claspine	14	8	57%
Timeless	22	12	54%

D

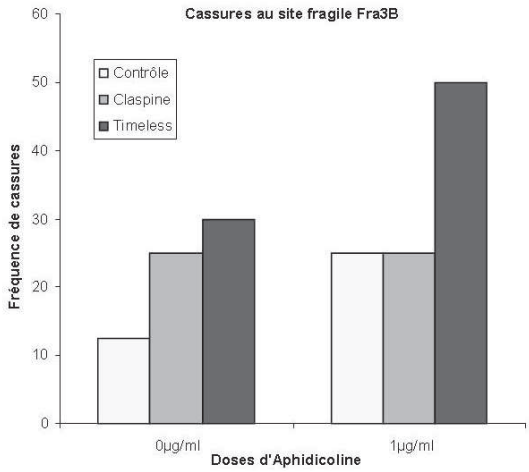


Figure 11. Augmentation des réarrangements chromosomiques dans des cellules shRNA Claspine et Timeless **A**. Analyse par SNP-CGH des réarrangements chromosomiques dans des cellules HTC116 shRNA Contrôle, Claspine et Timeless. L'ADN total des différentes lignées est récupéré et hybridé sur des puces SNP-CGH Illumina, comptant 300000 SNPs soit une résolution moyenne de 90 kb. Celles-ci permettent, en utilisant les SNPs, de mesurer les variations locales du nombre de copies de gènes et d'hétérozygotie à l'échelle du génome. Les gains de matériel génétique sont indiqués en bleu et les pertes en orange. Le panneau inférieur montre les événements spécifiques aux lignées exprimant les shRNA Claspine et Timeless, après soustraction des événements retrouvés dans la lignée Contrôle. **B**. Détail d'une zone de 3 Mb du chromosome I montrant une duplication de 175 kb. **C**. Tableau récapitulant le nombre de réarrangements spécifiques aux HCT116 shRNA Claspine et Timeless, ainsi que le nombre et la proportion de ces réarrangements situés dans ou à proximité d'un site fragile. **D**. Analyse de l'expression du site fragile FRA3B par étalement métaphasique et hybridation *in situ*. Fréquence de cassures au niveau de FRA3B dans les cellules HCT116 shRNA Contrôle, Claspine et Timeless, non traitées ou traitées 24 h à l'Aphidicoline (1µg/ml). Le nombre de cassures est mesuré en comptant le pourcentage de chromosomes 3 ayant au moins une cassure sur un des deux bras. Expérience préliminaire compté sur 50 chromosomes.

5 Rôle de CLASPINE et TIMELESS dans la résistance aux agents anti-tumoraux.

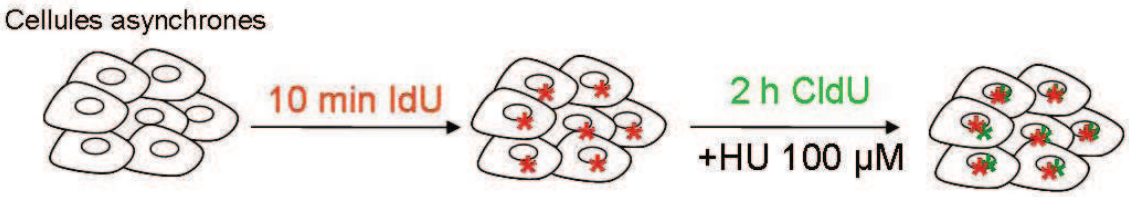
Nos résultats indiquent que CLASPINE et TIMELESS jouent un rôle structural dans le maintien de l'intégrité des fourches de réplication. Lors des stades avancés de la tumorigenèse, et notamment lors de chimiothérapies, cette fonction de protection des fourches pourrait être détournée par les cellules tumorales afin de faciliter la réplication de leur génome. Elle permettrait ainsi aux tumeurs de mieux résister aux agents anti-tumoraux qui ciblent les fourches de réplication. Afin de tester cette hypothèse, nous avons tout d'abord mesuré la vitesse de progression des fourches de réplication par peignage moléculaire, en présence d'HU. Nous avons utilisé une dose d'HU assez faible (100 μM), permettant de ralentir les fourches sans pour autant les bloquer complètement. Différents temps de traitement ont été testés. A partir de 3 h en présence d'HU, les cellules répliquent très lentement et la plupart des signaux de réplication adjacents sont fusionnés. Nous avons donc choisi d'exposer les cellules deux heures à l'HU en présence de CldU (Fig. 12A). Durant cette période, les cellules Contrôle progressent à la vitesse de 0.47 kb/min, soit trois fois plus lentement qu'en absence d'HU. Les cellules shRNA Claspine progressent à la même vitesse que les cellules Contrôle. En revanche, les cellules shRNA Timeless progressent quasiment deux fois plus lentement (0.26 kb/min) que les cellules contrôle et Claspine (Fig 12C). Il est intéressant de noter que la différence de vitesse observée en absence d'HU entre shRNA Contrôle et Claspine n'est plus observée ici. Afin de déterminer si le ralentissement des fourches induit par l'HU affecte la croissance et la viabilité des cellules, nous avons déterminé l'IC50 pour chacune des lignées, ce facteur indiquant la concentration de drogue nécessaire pour inhiber 50% de la croissance des cellules (Fig. 13A). Cette concentration est de 0.37 mM dans les cellules Contrôle après 48 h de traitement. L'IC50 est de 0.31 mM pour les shRNA Claspine, soit 16% plus faible que pour les cellules contrôle. Pour les shRNA Timeless, l'IC50 est de 0.17 mM, soit une augmentation de la sensibilité de 54% (Fig. 13B). Alors qu'en absence de stress, nous n'avons pas observé de défaut de croissance des cellules shRNA Claspine et Timeless, il semble que la surexpression de TIMELESS soit très importante en présence d'HU afin d'éviter des problèmes de réplication affectant la survie des cellules.

Afin de déterminer si la surexpression de CLASPINE et TIMELESS favorise la résistance à d'autres agents génotoxiques utilisés en chimiothérapie, nous avons testé l'effet

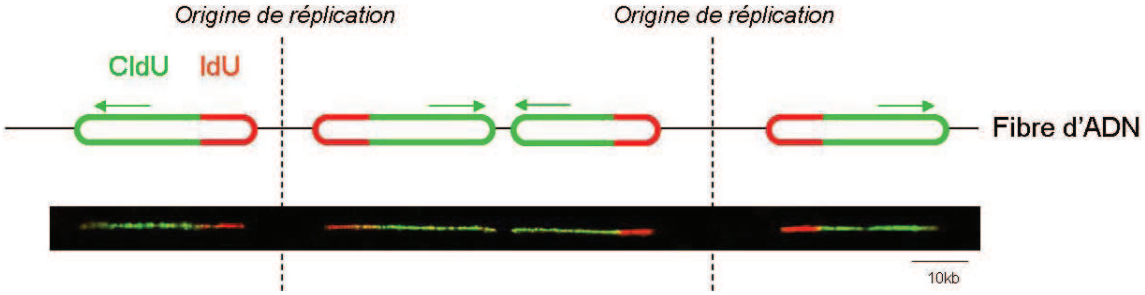
de l'Oxaliplatine sur nos lignées, en collaboration avec l'équipe du Dr JP Delord à l'Institut Claudius Régaud (Toulouse). L'Oxaliplatine forme des adduits sur l'ADN qui bloquent la progression des fourches de réplication. Cette drogue est fréquemment utilisée dans le traitement contre le cancer du colon, traitement pour lequel il existe une proportion importante de résistance. Nous avons pu observer que, contrairement à l'HU, l'Oxaliplatine inhibe sensiblement la croissance des shRNA Claspine après 72 h de traitement (Fig. 13C), puisque l'IC50 diminue de près de 34% (0.83 µM pour les cellules shRNA Contrôle et 0.55 µM pour les cellules shRNA Claspine). La différence de sensibilité est en revanche moins importante entre les cellules shRNA Contrôle et les cellules shRNA Timeless, puis qu'elle est légèrement inférieure à 10% (0.75 µM pour les cellules shRNA Timeless). Nous testons actuellement si cette sensibilisation à l'Oxaliplatine est également due à des problèmes de réplication par des expériences de peignage moléculaire.

En conclusion, nous avons montré que CLASPINE et TIMELESS sont fortement surexprimées dans différentes lignées tumorales et que la diminution de cette surexpression par ARN interférence dans les cellules HCT116 affecte leur résistance à l'HU et à l'Oxaliplatine. Dans le cas de l'HU, nous avons observé une corrélation entre sensibilité à la drogue et défaut de progression des fourches pour les cellules shRNA Timeless. Nos analyses en cours permettront de déterminer si c'est aussi le cas pour CLASPINE et la sensibilité à l'Oxaliplatine. Ces résultats suggèrent que CLASPINE et TIMELESS pourraient jouer des rôles complémentaires en fonction du type de problème rencontré par la fourche de réplication. L'utilisation d'autres types d'agents génotoxiques comme les UVs, l'Aphidicoline, le MMS ou la camptothecine permettra de tester cette hypothèse. Il nous faudra aussi tester si, comme c'est le cas chez la levure, CLASPINE et TIMELESS sont nécessaires au redémarrage des fourches de réplication bloquées.

A



B



C

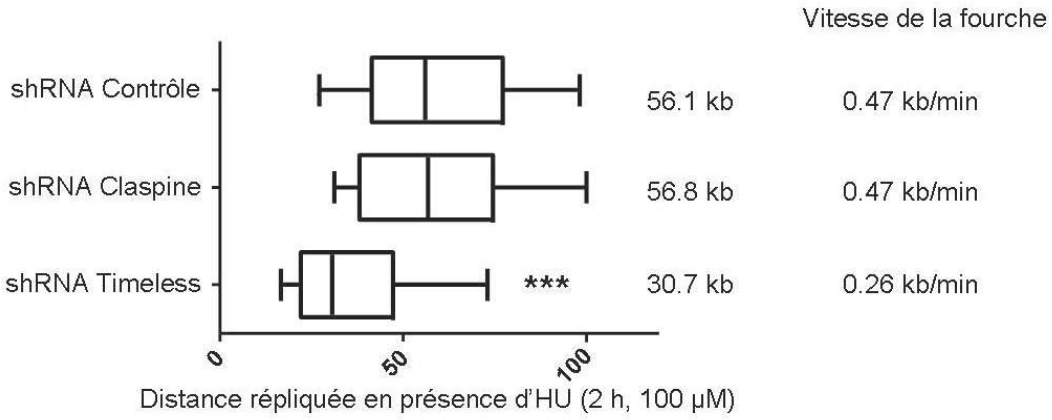
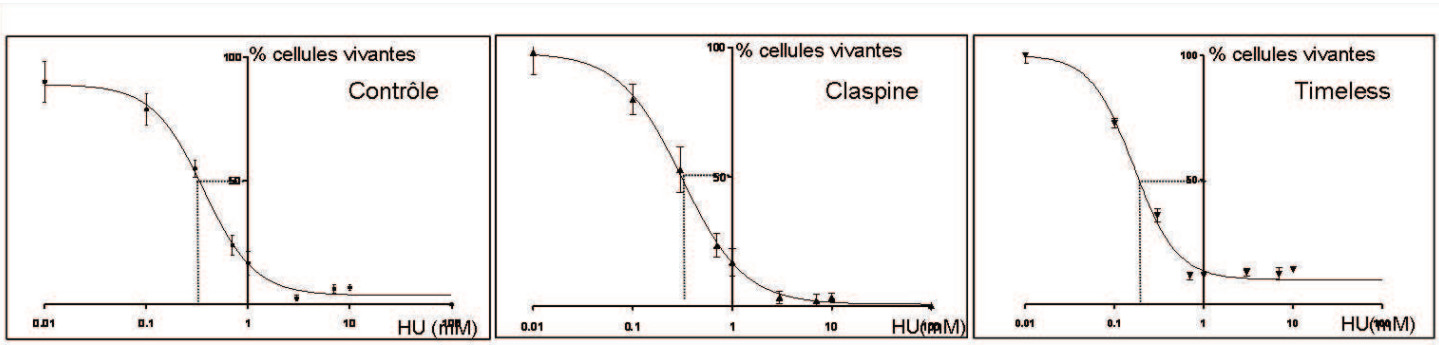


Figure 12. Mesure par peignage moléculaire de la vitesse de progression des fourches de réplication en présence d'HU. **A**. Les Cellules sont traitées 15 min à l'IdU afin d'orienter les fourches, puis exposées 2 h à l'HU (100 µM) en présence de CldU. L'ADN est ensuite peigné et la longueur des signaux CldU est mesurée. **B**. Exemples de fibres marquées Rouge: IdU. Vert: CldU. **D**. Vitesse de la fourche de réplication dans des cellules shRNA Contrôle, Claspine et Timeless en présence de 100 µM d'HU. ***P<0.001.

A



B

	IC 50 HU 48h
shRNA Contrôle	0.37 mM
shRNA Claspine	0.31 mM
shRNA Timeless	0.17 mM

C

	IC 50 Oxaliplatine 72h
shRNA Contrôle	0,83 µM
shRNA Claspine	0,55 µM
shRNA Timeless	0,75 µM

Figure 13. Détermination de la sensibilité à l'HU et à l'oxaliplatine de cellules déplétées en Claspine ou Timeless. **A**. Courbes représentant l'effet de l'HU sur la croissance et la viabilité de nos différentes lignées. Les cellules sont traitées 48 h avec différentes concentrations d'HU (10 µM à 100 mM). On mesure ensuite le nombre de cellules vivantes présentes par rapport à des cellules non traitées. On déduit ainsi la concentration d'HU inhibant 50% de la croissance cellulaire (IC50). **B**. Tableau récapitulatif des IC50 en présence d'HU pour des cellules HCT116 shRNA Contrôle, Claspine et Timeless. **C**. Tableau récapitulatif des IC50 après 72 h de traitement à l'oxaliplatine pour des HCT116 shRNA Contrôle, Claspine et Timeless. (Collaboration avec l'équipe du D[r] JP Delord, Institut Claudius Régaud, Toulouse).

6 *Analyse de l'expression de gènes de la réplication et du checkpoint de phase S dans différents cancers.*

Ce projet vise à comprendre comment CLASPINE et TIMELESS, qui sont par définition des facteurs suppresseurs de tumeur via leur rôle dans l'activation du checkpoint de réplication, peuvent également jouer un rôle oncogénique en favorisant la prolifération des cellules tumorales. Nos travaux sur des cellules en culture indiquent que la surexpression de ces facteurs favorise la progression des fourches de réplication en situation de stress réplicatif, indépendamment du checkpoint de réplication. Parallèlement à cette étude moléculaire, nous avons cherché à valider cette hypothèse dans différents cancers en déterminant le niveau d'expression de Claspine et Timeless. Pour cela, nous nous sommes impliqués dans un projet collaboratif du Cancéropôle Grand Sud Ouest (CGSO) intitulé "Instabilité génétique comme signature péjorative de la maladie". Ce projet, coordonné par C. Cazaux (IPBS, Toulouse), consiste à mesurer par RT-PCR quantitative l'expression d'un ensemble de gènes choisi pour leur implication dans les mécanismes de réplication, réparation, recombinaison (Pillaire et al. 2010) dans des collections de tumeurs primaires du colon, du sein et du poumon (Fig. 14). Ces différents cancers ont été sélectionnés car ils sont très fréquents et ils présentent une augmentation de l'instabilité génétique au cours de la progression tumorale. Dans le cas du cancer du poumon et du colon, 50% des patients rechutent ou présentent des métastases lors du diagnostic. Malgré les progrès constants des traitements et du diagnostic, ces cancers présentent encore un mauvais pronostic vital, un des problèmes les plus importants restant la résistance aux drogues anti-tumorales. Les annotations disponibles pour les collections de tumeurs étudiées comprennent la réponse thérapeutique aux agents génotoxiques ciblant le métabolisme de l'ADN (radiothérapie, chimiothérapie: gemcitabine, irinotecan, mitomycine C, oxaliplatine) et la survie des patients. Dans le cadre de mon projet, ces études nous ont permis de déterminer le niveau d'expression de nombreux gènes de la voie de signalisation ATR/Chk1 et de gènes de la fourche de réplication dans ces trois cancers (Fig. 14 et 15A).

Pour le cancer du colon et du poumon, les variations d'expression ont été déterminées en comparant l'expression de ces facteurs dans le tissu tumoral et le tissu sain du même patient. Pour le cancer du sein, il s'agit des données T/N avec T= valeur d'expression

normalisée dans la tumeur et N= médiane des valeurs d'expression normalisées obtenue dans 7 échantillons de tissu mammaire normal.

Dans le cancer du colon, les gènes senseurs des voies ATR/CHK1 et ATM/CHK2 sont généralement sous exprimés (ATM, RAD9 et RAD17), ou ont un niveau d'expression inchangé (ATR et ATRIP). Par contre, les gènes effecteurs du checkpoint (CHK1, CHK2 et BRCA1) sont systématiquement surexprimés. Il en est de même pour Claspine, qui présente une surexpression dans les cellules tumorales chez une majorité de patients (56 sur 73, Fig. 15A). Nous observons la même tendance dans le cancer du poumon, avec une sous expression des senseurs de checkpoints de phase S (ATR, ATM, RAD9, RAD17 et TOPBP1) et une surexpression des effecteurs et des médiateurs de ces checkpoints. (CLASPINE et CHK1). Nous observons également une surexpression de CDC25A, une cible majeure de CHK1 régulant l'activation des origines de réplication, mais pas de CDC25B. Il est aussi intéressant de noter que PLK1, un régulateur négatif de CLASPINE qui est impliqué dans l'extinction du checkpoint, est aussi surexprimé dans le cancer du poumon. Dans le cancer du sein, CLASPINE et dans une moindre mesure TIMELESS sont surexprimés (Fig. 15B). Globalement, comme pour le cancer du colon et du poumon, dans le cancer du sein l'expression des senseurs du checkpoint est réduite ou inchangée alors que les effecteurs du checkpoint sont surexprimés.

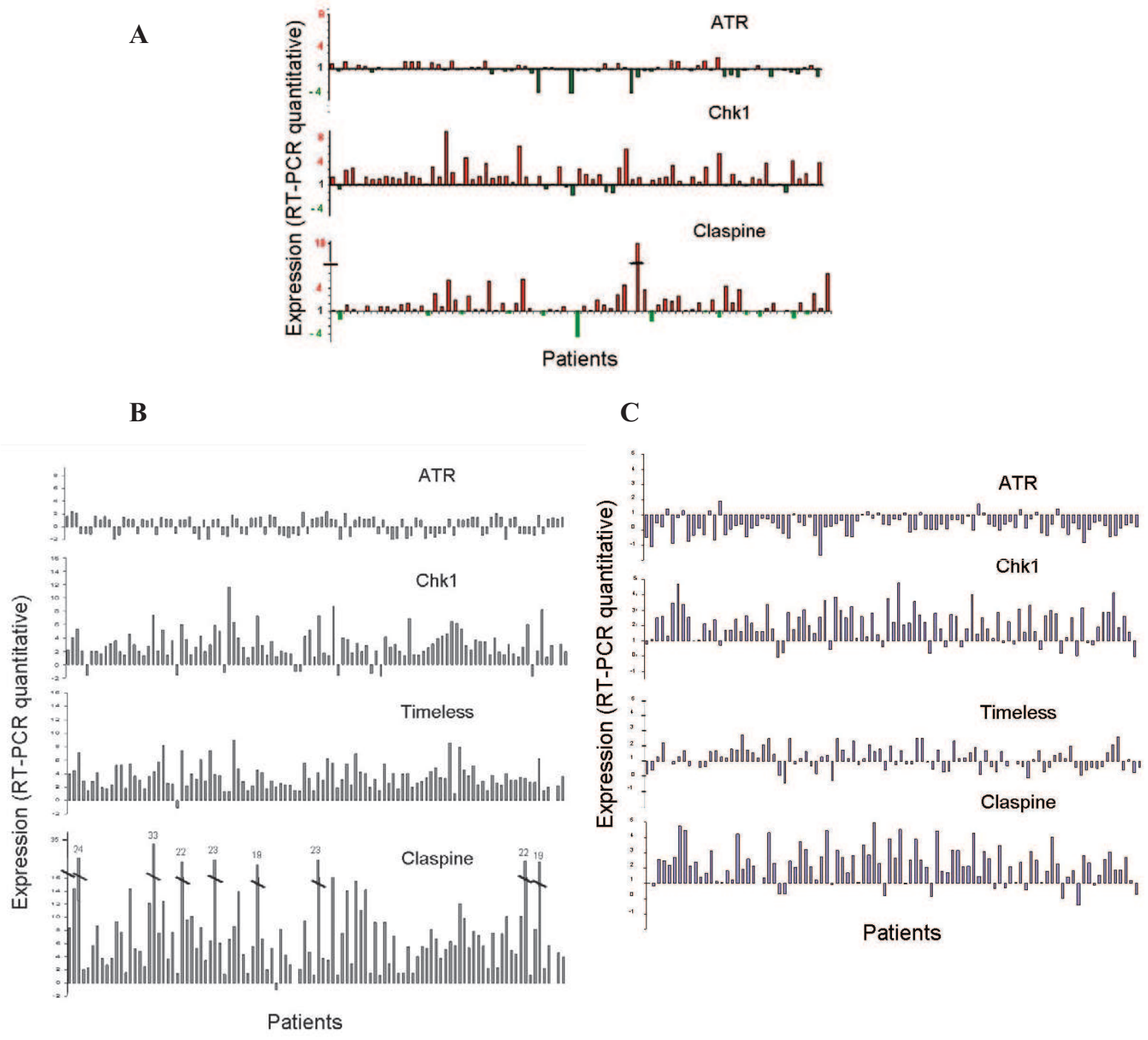


Figure 14. Mesure du niveau d'expression des gènes Atr, Chk1, Timeless et Claspine dans les cancers du colon, du sein et du poumon. **A**. Mesure par RT-PCR quantitative du niveau d'expression des gènes Atr, Chk1 et Claspine dans 74 tumeurs primaires du colon, indiqué par rapport au niveau d'expression du même gène dans le tissu sain adjacent du même patient. Chaque couple d'échantillon (tumeur/tissus sain) est normalisé par qBase en utilisant comme contrôle les deux gènes les plus stables parmi 18S, GAPDH, HPRT et YWHAZ comme indiqué dans *Pillaire et al, Oncogène 2010*. Les patients qui surexpriment Claspine, Atr ou Chk1 sont indiqués en rouge (T/N>1) et ceux qui les sous-expriment sont indiqués en vert(T/N<1). **B.** Niveau relatif d'expression d'Atr, Chk1, Claspine et Timeless dans des tumeurs mammaires. Il s'agit des données T/N (T= valeur d'expression normalisée dans la tumeur et N= médiane des valeurs d'expression .normalisées obtenue dans 7 échantillons de tissu mammaire normal). **C**. Niveau relatif d'expression de Atr, Chk1, Claspine et Timeless dans des tumeurs du poumon comparé à du tissu sain. Ces études ont été réalisées avec le soutien du Cancéropôle Grand Sud Ouest dans le cadre d'une Collaboration avec les équipes Cazaux/Hoffmann (IPBS Toulouse) et Delisle (Hôpital Rangueil Toulouse). Les expériences sur les cancers du colon et du sein ont été réalisées par MJ Pillaire et V Bergoglio (Equipe Cazaux/Hoffmann) et celles sur le cancer du poumon par C Allera (Equipe Delisle).

En compilant les résultats issus de ces études, nous pouvons proposer un modèle global de l'expression des protéines du checkpoint de phase S et de la fourche de réplication dans ces trois cancers (Fig. 15B). Plusieurs observations majeures émergent de ce modèle :

1 - Les kinases ATM et ATR ainsi que leurs activateurs (RPA, RAD9, RAD17, TOPBP1, 53BP1) sont globalement sous exprimés, ce qui permettrait de limiter l'effet négatif de ces checkpoints sur la prolifération cellulaire.

2 - Les facteurs de checkpoint directement impliqués dans le maintien des fourches de réplication sont surexprimés. C'est ainsi le cas de CHK1, de CLASPINE et dans une moindre mesure de TIMELESS.

3 - La kinase PLK1 (dégradation de CLASPINE) et la phosphatase CDC25A (cible de CHK1) sont également surexprimées. La dégradation de CLASPINE par PLK1 se produit en fin de phase S afin d'inactiver le checkpoint et passer la transition G2/M. La surexpression conjointe d'un répresseur de CLASPINE et de la cible majeure de CHK1 permettrait ainsi aux cellules de tolérer la surexpression de CHK1/CLASPINE en maintenant une balance optimale de ces différents facteurs.

4 - Les facteurs de réparation des fourches de réplication (BLM, BRCA2, RAD51, BRCA1) sont surexprimés. Comme pour CLASPIN/TIMELESS/CHK1, cela permettrait de faciliter la progression des fourches de réplication en situation de stress réplicatif.

5 - Les protéines impliquées dans le licensing des origines, l'initiation de la réplication et la progression des fourches sont toutes surexprimées (CDC6, CDT1, CDC45, MCMs et GINS). Les seules protéines sous exprimées sont la GEMININE, un inhibiteur de CDT1 et CUL4, une E3 ligase impliquée dans la dégradation de CDT1.

En conclusion, nous proposons que ces modifications d'expression concourent à maintenir l'intégrité des fourches de réplication sans pour autant suractiver les checkpoints de phase S. Ces modifications favorisent aussi le licensing et l'activation des origines dormantes, qui jouent un rôle clé dans la réponse au stress réplicatif en compensant l'inactivation ou le ralentissement des fourches. Si notre modèle est correct, ces mécanismes d'adaptation pourraient permettre aux cellules tumorales de mieux tolérer les stress réplicatifs endogènes ou exogènes, tout en échappant à l'apoptose ou à un arrêt irréversible du cycle cellulaire.

A

.

		Colon	Poumon	Sein
Senseurs du checkpoint	ATR	normal	Sous-expression	normal
	ATRIP	normal	Inconnu	Inconnu
	TopBP1	Inconnu	Sous-expression	Inconnu
	Rad9	Sous-expression	Sous-expression	Surexpression
	Rad17	Sous-expression	Sous-expression	normal
	ATM	Sous-expression	Sous-expression	Sous-expression
	TP53BP1	Sous-expression	Sous-expression	normal
Adaptateurs, effecteurs ou régulateurs du checkpoint	Claspine	Surexpression	Surexpression	Surexpression
	Timeless	Inconnu	normal	Surexpression
	Chk1	Surexpression	Surexpression	Surexpression
	Cdc25A	Inconnu	Surexpression	Surexpression
	Plk1	Inconnu	Surexpression	Inconnu
	Chk2	Surexpression	Inconnu	normal
Initiation de la réplication	CDC45	Surexpression	Surexpression	Surexpression
	MCM2	Surexpression	Inconnu	Surexpression
	MCM7	Surexpression	normal	Inconnu
	CDC6	Surexpression	Surexpression	Surexpression
	CDT1	Surexpression	Surexpression	Surexpression
	Geminine	Sous-expression	normal	Sous-expression
	Cul4	Inconnu	Sous-expression	
Protection de la fourche de réplication	BRCA1	Surexpression	normal	Surexpression
	BRCA2	Surexpression	normal	Inconnu
	RAD51	normal	Surexpression	Surexpression
	BLM	Surexpression	normal	Surexpression

B

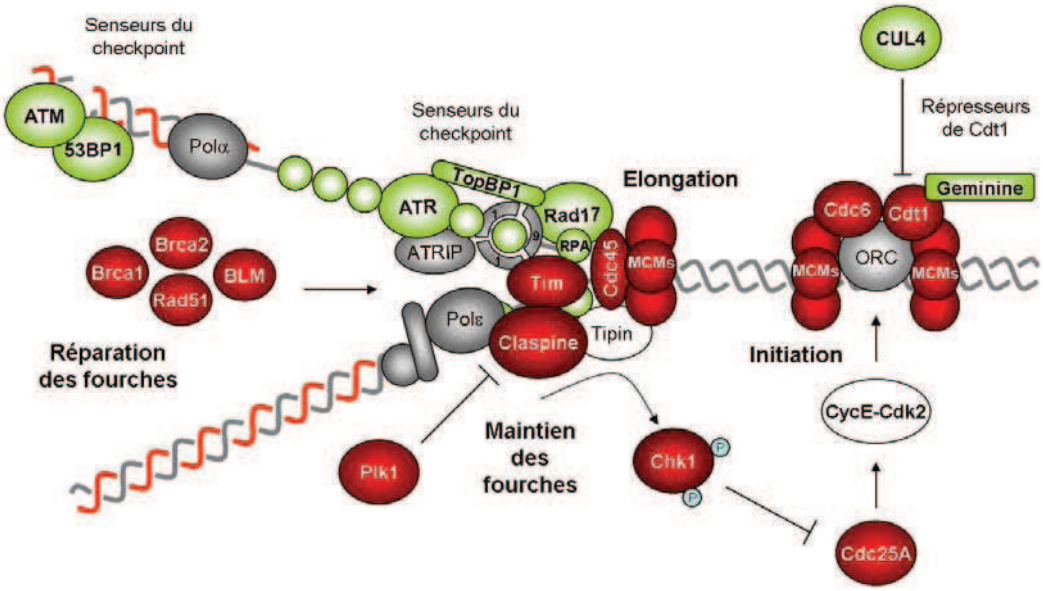


Figure 15. Récapitulatif des données d'expression des gènes de la réplication et du checkpoint de phase S dans différents cancers. **A**. Tableau récapitulatif du niveau d'expression des gènes dans 74 tumeurs du colon, 106 tumeurs mammaires et 92 tumeurs du poumon. (Collaboration dans le cadre du Canceropôle GSO). **B**. Schéma représentant ces protéines dans le contexte de la fourche de réplication. En rouge : gènes surexprimés et en vert : gènes sousexprimés. En gris : gènes n'ayant pas de variations reproductibles de l'expression. En blanc : niveau d'expression inconnu dans chacun des trois cancers.

CHAPITRE 4 : DISCUSSION & PERSPECTIVES

Il a été montré récemment que l'instabilité génétique joue un rôle central dans les étapes précoces de la tumorigenèse. Celle-ci provoquerait une activation chronique des voies ATR/CHK1 et ATM/CHK2 dans les cellules précancéreuses, entrainant l'apoptose ou la sénescence des cellules concernées (Bartkova et al. 2005; Gorgoulis et al. 2005; Bartkova et al. 2006; Di Micco et al. 2006). Les mécanismes de checkpoint constituant une barrière contre la progression tumorale, toute mutation affectant ce checkpoint serait ainsi sélectionnée très tôt dans le processus de tumorigenèse et faciliterait ensuite la progression tumorale. Ce modèle met en évidence le rôle central de l'instabilité génomique et du checkpoint dans la progression tumorale.

Au cours de ma thèse, je me suis intéressé au complexe CLASPINE / TIMELESS / TIPIN, initialement identifié comme médiateur de la voie ATR/CHK1 et qui est donc considéré comme ayant une fonction suppresseur de tumeur. Cependant, CLASPINE présente aussi des propriétés oncogéniques, puisque qu'elle est surexprimée dans de nombreuses lignées tumorales et cette surexpression est importante pour la prolifération cellulaire. Nous nous sommes donc demandé comment cette protéine pouvait être à la fois une oncogène et un suppresseur de tumeur. Chez la levure, l'homologue de CLASPINE est impliqué dans le maintien de la stabilité des fourches de réplication, indépendamment de sa fonction dans le checkpoint. Nous proposons que dans les cellules cancéreuses cette surexpression permette une meilleure stabilité des fourches, ce qui serait très important pour répliquer efficacement un génome soumis à un stress réplicatif constant.

Au cours de ma thèse, nous avons construit et caractérisé un modèle de cellules cancéreuses HCT116 dans lesquelles nous avons diminué le niveau de CLASPINE ou de TIMELESS grâce à des shRNA, sans que cela n'affecte l'efficacité du checkpoint de réplication. Nous avons pu observer dans ces cellules un ralentissement de la progression des fourches de réplication et l'apparition d'une instabilité génétique. Il semblerait que spécifiquement dans le cas de TIMELESS, le ralentissement de la fourche de réplication et l'instabilité génomique se manifeste surtout dans les régions du génome répliquées tardivement.

.

1 La diminution de CLASPINE ou TIMELESS n'affecte pas le checkpoint de phase S

Dans les cellules HCT116, l'inhibition de CLASPINE et TIMELESS par des shRNA n'affecte pas la phosphorylation des résidus S317 ou 345 de CHK1 en présence d'HU, donc pas de modification dans l'activation du checkpoint. Ces cellules présentent une quantité de CLASPINE et TIMELESS supérieure à toute les autres lignées cancéreuses testées (Fig. 1) (Lin et al. 2004). L'inhibition de 90% du niveau de ces protéines induite par les shRNAs laisserait ainsi une quantité suffisante de CLASPINE et TIMELESS pour activer le checkpoint. Cela suggère que l'avantage sélectif associé à la surexpression de ces protéines dans la lignée HCT116 n'est pas lié à leur rôle dans l'activation du checkpoint.

Nos données ne remettent pas en cause le rôle de CLASPINE et TIMELESS dans l'activation du checkpoint de réplication mais permettent d'expliquer certains résultats contradictoires de la littérature. Selon les conditions de déplétion utilisées, l'inhibition de la phosphorylation de CHK1 peut varier considérablement dans les études publiées. Ainsi, dans les cellules HEK293T, qui présentent une forte efficacité de transfection, les siRNAs dirigés contre Claspine entrainent une inhibition quasi totale de la phosphorylation de la S317 de CHK1 après 1.5 h de traitement avec 10 mM HU (Chini and Chen 2003). En revanche, il faut attendre 4 h de traitement avec 10 mM HU pour commencer à voir une réduction de la phosphorylation de la S317 de CHK1 dans des cellules HeLa (Chini et al. 2006). Dans les cellules HCT116 transfectées avec un siRNA Claspine, le laboratoire de K. Caldecott a observé une réduction de 40% de la phosphorylation S317 de CHK1 en présence de 10 mM HU (Petermann et al. 2008). Dans ces mêmes conditions, ils observent une réduction plus importante de la phosphorylation de S345 de CHK1 (entre 50 et 70%), en accord avec ce qui avait été observé précédemment dans des cellules U2OS (Liu et al. 2006).Cette différence pourrait être expliquée par le rôle de la phosphorylation S345 dans le checkpoint G2/M ou la compensation par un autre médiateur pour la phosphorylation S317 de CHK1.

En ce qui concerne TIMELESS, son rôle dans la phosphorylation de CHK1 chez les mammifères est beaucoup moins clair dans la littérature. Dans des cellules HEK293T traitées 1.5 h à l'HU (10 mM) l'inhibition de la phosphorylation de S345 dans des cellules transfectées avec un siRNA Timeless varie selon les publications (Unsal-Kacmaz et al. 2005;

Unsal-Kacmaz et al. 2007). Dans des cellules U2OS, le laboratoire de S. Elledge n'a pas réussi à reproduire cette diminution de la phosphorylation de CHK1 dans des cellules transfectées avec un siRNA Timeless (Chou and Elledge 2006). L'implication de TIMELESS dans l'activation de la voie ATR/CHK1 reste donc controversée dans les cellules humaines. Par ailleurs, il n'est pas exclu que la déplétion de CLASPINE ou TIMELESS soit compensée par un autre médiateur, comme par exemple BRCA1 (Lin et al. 2004; Yoo et al. 2006). En revanche, dans les extraits d'œufs de Xénope, qui permettent une déplétion quasi totale de la protéine, il a été montré que le complexe CLASPIN / TIMELESS / TIPIN est indispensable à l'activation de CHK1 (Kumagai and Dunphy 2000; Errico et al. 2007).

En conclusion, il est probable que le degré de surexpression de CLASPINE et TIMELESS dans les cellules HCT116 n'affecte pas l'activation du checkpoint et qu'un niveau basal de ces protéines dans les cellules exprimant des shRNAs, proche de celui présent dans les cellules primaires, soit suffisant pour assurer la phosphorylation de CHK1 en réponse à l'HU. Nous disposons donc d'un modèle unique et cohérent pour étudier l'importance fonctionnelle de la surexpression de ces protéines dans les cellules cancéreuses, indépendamment de leur rôle dans l'activation du checkpoint de phase S.

2 CLASPINE et TIMELESS: protéines essentielles à la viabilité cellulaire

L'inactivation du gène Timeless chez la souris est létale au niveau embryonnaire (Gotter et al. 2000). De même, nous avons observé que des fibroblastes primaires (IMR90) présentant des niveaux très bas de CLASPINE et TIMELESS perdent leur viabilité après infection avec des lentivirus exprimant des shRNAs dirigés contre ces protéines. Il semble donc qu'un niveau minimal de CLASPINE et TIMELESS soit essentiel pour la viabilité chez les mammifères, contrairement à ce qui est le cas chez la levure. Si, comme chez la levure, ces protéines sont nécessaires pour promouvoir la progression des fourches de réplication au cours d'une phase S normale, il est possible que la plus grande complexité du génome chez les mammifères rende ces protéines essentielles. Ceci pourrait expliquer pourquoi nous n'avons pu obtenir de déplétion plus importante de ces protéines en utilisant des shRNA. Même s'il est possible d'obtenir une déplétion transitoire plus efficace pendant une période courte en transfectant les cellules avec un siRNA, l'expression à long terme de shRNAs contre Claspine et Timeless induit la sélection de cellules maintenant un niveau basal de ces protéines. Afin de contourner ce problème, nous utilisons actuellement un shRNA inductible et nous essayons d'autres lignées cellulaires.

Il est intéressant de noter que TIMELESS a un phénotype plus marqué que CLASPINE concernant la progression des fourches et l'accumulation de réarrangements chromosomiques, alors que la déplétion de cette protéine n'est pas plus efficace que celle de CLASPINE (Fig. 2). Nous avons remarqué que, à la différence de CLASPINE, le niveau de TIMELESS remonte après environ 15 passages dans les cellules exprimant un shRNA contre ce facteur. Ceci pourrait refléter le fait que la déplétion de TIMELESS déplace CLASPINE de la chromatine, comme c'est le cas chez la levure (Katou et al. 2003). Cependant, nous n'avons pas observé de diminution significative de la quantité de CLASPINE sur la chromatine dans des cellules shRNA Timeless (données non montrées). Une autre possibilité est que la déplétion de TIMELESS entraine aussi la déplétion de TIPIN, comme c'est le cas chez le Xénope (Errico et al. 2007). Néanmoins, cela ne semble pas être le cas dans les cellules humaines (Chou and Elledge 2006; Yoshizawa-Sugata and Masai 2007). Il serait important de déterminer ce qu'il en est dans nos lignées, et notamment si le phénotype des cellules

déplétées en TIPIN et TIMELESS est identique, ou si la co-déplétion de ces protéines a un effet cumulatif.

3 La surexpression de CLASPINE et TIMELESS favorise la progression des fourches de réplication.

Chez la levure, Mrc1 et Tof1 ont un rôle dans la progression des fourches de réplication indépendant du checkpoint de réplication (Tourriere et al. 2005). Nous avons pu confirmer par peignage moléculaire que ce rôle est conservé dans des cellules HCT116, les fourches étant 30% plus rapides dans des cellules shRNA contrôle que dans des cellules shRNA Claspine ou Timeless (Fig. 3). Un ralentissement des fourches de réplication a déjà été observé dans des cellules HeLa transfectées avec un siRNA Timeless en utilisant une autre technique d'étirement de fibres d'ADN (Unsal-Kacmaz et al. 2007). Ce ralentissement est aussi observé dans des cellules HeLa ou HCT116 transfectées avec un siRNA Claspine (Petermann et al. 2008). Ce ralentissement est comparable à celui que nous avons obtenu, même si les vitesses mesurées par *Petermann et al* sont globalement plus faibles que celles que nous avons mesurées dans la même lignée HCT116. Ceci est probablement lié à des différences techniques, l'approche utilisée par *Petermann et al.* ne permettant pas de mesurer des fibres d'ADN de grande taille.

Dans nos conditions, nous mesurons un ralentissement des fourches de réplication dans les cellules shRNA Claspine et Timeless alors que le checkpoint est toujours fonctionnel. Cela suggère fortement que le rôle positif de la surexpression de CLASPINE et de TIMELESS sur la progression des fourches est indépendant du checkpoint de réplication. Jusqu'à présent ces deux fonctions n'avaient pu être dissociées dans des cellules de mammifères. Cela avait déjà été uniquement suggéré par le fait que dans des cellules HeLa, la cotransfection avec des siRNA Claspine et Chk1 induit un ralentissement des fourches plus important qu'avec le siRNA Chk1 seulement (Petermann et al. 2008).

Chez la levure, il est possible de dissocier la fonction checkpoint de Mrc1 de sa fonction de protection des fourches grâce à un mutant non phosphorylable de Mrc1 ($mcr1^{AQ}$) incapable d'activer le checkpoint mais maintenant toujours la stabilité des fourches de réplication (Osborn and Elledge 2003). Les sites de phosphorylation de CLASPINE nécessaires à l'activation de CHK1 étant connus (Chini and Chen 2006; Lindsey-Boltz et al.

2009), il serait intéressant de complémenter une lignée déplétée en CLASPINE avec un mutant non phosphorylable de CLASPINE.

Le ralentissement des fourches associé à la déplétion de CLASPINE est exacerbé dans les cellules cancéreuses par rapport aux cellules primaires (Petermann et al. 2008). Le rôle de CLASPINE à la fourche de réplication serait donc plus important dans les cellules cancéreuses que dans des cellules primaires, probablement à cause du stress réplicatif constitutivement présent dans ces cellules tumorales. Cela pourrait aussi être le cas pour CHK1, car des cellules U2OS transfectées avec un siRNA Chk1 sont plus sensibles à l'HU que des cellules primaires transfectées avec un siRNA Chk1 (Cho et al. 2005). Il est possible que dans les cellules cancéreuses, la présence constante de stress réplicatif induise une activation basale de CHK1 nécessaire à la stabilité des fourches (Petermann et al. 2006). Il est intéressant de noter que ce rôle à la fourche n'est pas redondant avec celui de CLASPINE puis que leurs effets sur le ralentissement des fourches s'additionnent dans le double siRNA Claspine-Chk1 (Petermann et al. 2008).

Quel est le rôle du complexe CLASPINE / TIMELESS / TIPIN à la fourche de réplication? Ce complexe interagit avec de nombreuses protéines de la fourche de réplication (Brondello et al. 2007; Gotter et al. 2007) ce qui suggère qu'il pourrait avoir le même rôle que chez la levure, à savoir maintenir la stabilité et l'intégrité du réplisome (Katou et al. 2003). Chez la levure, la perte de l'intégrité du réplisome en absence de Mrc1 se manifeste par l'accumulation d'ADN simple brin au niveau des fourches. Or, il a été observé que chez le Xénope, l'absence de TIPIN entraine aussi une augmentation de l'ADN simple brin à la fourche (Errico et al. 2007). De plus, *Smith et al* ont montré qu'en absence de dommages exogènes, des fibroblastes embryonnaires de souris immortalisés déplétés en TIMELESS accumulent de l'ADN simple brin (Smith et al. 2009). Il est intéressant de noter que dans ces cellules primaires immortalisées, la déplétion de TIMELESS entraine la phosphorylation de CHK1 en absence de stress réplication exogène, ce qui n'est pas le cas dans nos conditions. Cela suggère que le checkpoint est plus sensible dans les cellules primaires que dans les cellules cancéreuses. Ces auteurs proposent que le complexe TIMELESS / TIPIN ait un double rôle dans le maintien de la stabilité des fourches, d'une part en maintenant l'intégrité du réplisome et d'autre part en permettant l'activation du checkpoint de phase S. Notre étude est en accord avec ces données et montre en plus que le rôle potentiel de TIMELESS dans le maintien de la stabilité du réplisome est indépendant de sa fonction dans l'activation du checkpoint

Une autre conséquence de l'absence de CLASPINE et TIMELESS à la fourche de réplication est un défaut d'ubiquitinylation de PCNA (Yang et al. 2008). Il est connu que CLASPINE, TIMELESS et CHK1 interagissent avec PCNA au niveau de la fourche de réplication (Yang et al. 2008). Il a été proposé que la localisation de ces protéines au niveau de la fourche facilitait le recrutement de RAD18, la protéine qui ubiquitinyle PCNA (Yang and Zou 2009). L'ubiquitinylation de PCNA est impliquée dans de nombreux mécanismes de réparation. Il est ainsi possible qu'un défaut d'ubiquitinylation de PCNA dans les cellules déplétées en CLASPINE ou TIMELESS puisse expliquer leur problème de progression des fourches. Cela pourrait par exemple perturber le recrutement des ADN polymérases translésionnelles, qui permettent à la fourche de répliquer certaines lésions de l'ADN.

4 Augmentation de l'instabilité génétique lors de la déplétion de CLASPINE et TIMELESS

La déplétion de CLASPINE et TIMELESS entrainant des défauts de réplication, nous avons cherché à déterminer leurs conséquences sur la stabilité du génome. Nous avons mesuré le stress réplicatif en déterminant l'accumulation de γ-H2AX à différents stades de la phase S. Nous avons aussi cartographié la présence de réarrangements chromosomiques en hybridant l'ADN de ces lignées sur des puces SNP-CGH. Enfin, nous avons mesuré l'expression de FRA3B dans nos lignées afin de déterminer l'incidence de la déplétion de CLASPINE et TIMELESS sur l'expression des sites fragiles communs.

L'étude par SNP-CGH nous a permis de vérifier que la lignée HCT116 présentait déjà un certain nombre de réarrangements, mais pas d'aneuploïdie. Dans les lignées shRNA Claspine et Timeless, nous avons noté une augmentation du nombre de réarrangements, qui se manifeste particulièrement dans les sites fragiles. Dans le cas de CLASPINE, il a déjà été montré dans des cellules HeLa que sa diminution par siRNA augmente la fréquence de cassures au niveau de plusieurs sites fragiles communs, dont FRA3B, en présence ou en absence d'Aphidicoline (Focarelli et al. 2009). Dans les expériences préliminaires que nous avons réalisées (Fig. 11D), nous avons détecté une légère augmentation de l'expression de FRA3B indépendante de l'Aphidicoline dans les cellules déplétées en CLASPINE. La fréquence de cassures mesurée par *Focarelli et al* est très largement supérieure à ce que nous observons. Cela pourrait être lié à la différence de lignées utilisées. En effet, la lignée HCT116 est connue pour avoir un caryotype particulièrement stable, même si elle présente une forte instabilité microsatellitaire.

Nos données suggèrent que la surexpression de CLASPINE et TIMELESS dans les cellules cancéreuses augmente la stabilité des fourches de réplication et limite l'instabilité génomique. Ce dernier aspect est a priori en contradiction avec le fait que l'instabilité génomique contribue à la tumorigenèse. Cependant, d'après le modèle d'instabilité génétique induite par les oncogènes (Halazonetis et al. 2008), c'est plus l'induction constitutive du checkpoint qui provoque l'inactivation de P53 que l'instabilité génomique. Dans les étapes plus tardives de la tumorigenèse, un excès d'instabilité génétique pourrait au contraire constituer un frein pour la prolifération, la surexpression de CLASPINE et TIMELESS

apportant un avantage sélectif aux cellules tumorales en facilitant la duplication de leur génome.

Pour conforter notre hypothèse il semble que l'on puisse appliquer ce modèle à d'autres protéines de la fourche telle que la protéine BLM. En effet, les patients souffrant du syndrome de Bloom, accumulent de l'instabilité génétique et ont une probabilité très élevée de développer des cancers (Mohaghegh and Hickson 2001). BLM est une protéine de la famille des hélicases RecQ. Elle est recrutée à la fourche de réplication lors de l'activation du checkpoint de phase S et contribue au redémarrage des fourches de réplication après un stress réplicatif en résolvant les intermédiaires de recombinaison au niveau des fourches (Wu 2007). La perte de BLM entraine l'accumulation d'ADN simple brin et de dommages constitutifs de l'ADN (Rassool et al. 2003). Il y a aussi un ralentissement global des fourches de réplication et une augmentation du nombre de fourches arrêtées. En revanche cette protéine est surexprimée dans les cancers du colon et du sein (Fig. 15A). Comme pour CLASPINE et TIMELESS, la surexpression de BLM dans les cellules tumorales leur permettrait donc de mieux tolérer le stress réplicatif endogène de ces cellules et donc de proliférer plus efficacement.

Au cours de ma thèse, j'ai également collaboré avec l'équipe de M. Peters (ETH, Zurich) afin d'étudier le rôle de MMS22 à la fourche de réplication. MMS22 est une protéine dont l'homologue chez la levure forme un complexe avec RTT101, une culline impliquée dans le redémarrage des fourches de réplication bloquée (Luke et al. 2006; Zaidi et al. 2008). Dans les cellules cancéreuses, nous avons vu que comme pour CLASPINE, la diminution du niveau de MMS22 entraine un ralentissement des fourches de réplication, accompagné d'une augmentation du stress réplicatif. Il serait intéressant de mesurer son niveau d'expression dans les cancers afin de voir si MMS22 est également surexprimée.

En conclusion, ces données suggèrent que la surexpression de facteurs impliqués dans le maintien de l'intégrité des fourches soit fréquemment observée dans les cellules cancéreuses. Dans le cas de CLASPINE et TIMELESS, comme dans le cas de BLM, ces protéines agiraient à la fois comme « suppresseurs de tumeurs » dans les cellules normales mais aussi comme oncogènes dans les cellules cancéreuses. Les mécanismes de protection des fourches permettraient ainsi aux cellules saines d'éviter de générer de l'instabilité génomique lors de la réplication, mais aussi aux cellules cancéreuses de continuer à proliférer en situation de stress réplicatif.

5 *Importance relative de CLASPINE et TIMELESS en phase S précoce et tardive*

Afin de déterminer si CLASPINE et TIMELESS sont spécifiquement requises pour la réplication de régions particulières du génome, nous avons ensuite analysé la progression des fourches de réplication dans des cellules déplétées en CLASPINE et TIMELESS collectée en début ou en fin de phase S. Nos études par peignage moléculaire indiquent que de façon générale, les fourches de réplication progressent plus vite en fin qu'en début de phase. Ceci avait déjà été montré par une autre technique dans des cellules HeLa (Malinsky et al. 2001), des fibroblastes normaux et sur des cellules issues de glioblastomes (Frum et al. 2009). Dans ces deux cas les cellules ont été synchronisées avec des drogues pouvant affecter la progression des fourches. Dans notre cas, les cellules ont été triées par FACS à partir de cultures asynchrones, ce qui élimine le biais lié à la synchronisation. Il a été proposé que les fourches progressent plus lentement en début de phase S car l'activation d'un grand nombre d'origines limite la quantité de nucléotides disponible localement pour chaque fourche (Malinsky et al. 2001). En fin de phase S, l'augmentation de la concentration en nucléotides associée à un nombre plus faible d'événements d'initiation permettrait une progression plus rapide des fourches. Il a par ailleurs été observé que les fourches progressent plus rapidement dans les régions pauvres en origine (Conti et al. 2007).

Plusieurs résultats récents suggèrent que les régions tardives du génome seraient plus difficiles à répliquer. Ainsi, le taux de mutation dans le génome humain est plus élevé dans les régions répliquant tardivement (Woodfine et al. 2005; Stamatoyannopoulos et al. 2009; Chen et al. 2010). Ces mutations pourraient être causées par des difficultés de la fourche à progresser à travers l'hétérochromatine (Stamatoyannopoulos et al. 2009). En mesurant par western blot la formation de γ-H2AX, nous avons mis en évidence une augmentation des dommages spontanés de l'ADN en fin de phase S, spécialement dans la lignée shRNA Timeless. Ceci corrèle avec un ralentissement de la progression des fourches en fin de phase S et avec une augmentation des cassures au niveau des sites fragiles. Ces données suggèrent que la déplétion de TIMELESS dans les cellules tumorales fragilise les fourches et entraine un stress réplicatif et une instabilité génomique dans les régions tardives et difficiles à répliquer. Cette instabilité se manifesterait d'autant plus dans les régions pauvres en origines de réplication, telles que les sites fragiles communs.

A la différence de CLASPINE, TIMELESS semble donc avoir un rôle spécifique dans la réplication des régions tardives. Il est intéressant de noter que chez la levure, TOF1 est nécessaire pour l'arrêt des fourches au niveau des sites naturels de pause, ce qui n'est pas le cas pour MRC1 (Calzada et al. 2005; Tourriere et al. 2005). Il serait intéressant de vérifier si le ralentissement des fourches, l'augmentation de γ-H2AX et l'induction des sites fragiles sont également associés à des défauts de pause de la réplication dans les cellules déplétées en TIMELESS.

6 *Importance de CLASPINE et TIMELESS dans la résistance aux agents génotoxiques*

De nombreuses drogues utilisées en cancérologie ciblent les fourches de réplication, mais induisent des mécanismes de résistance. Si la surexpression de CLASPINE et TIMELESS permet aux cellules tumorales de mieux résister au stress réplicatif endogène, elle pourrait aussi être impliquée dans la résistance aux agents génotoxiques. Afin de tester cette hypothèse, nous avons traité des cellules déplétées en CLASPINE et TIMELESS avec des inhibiteurs de la réplication afin de déterminer si cela augmente leur sensibilité à ces drogues. Nous avons observé que les cellules shRNA Timeless sont très sensibles à l'HU, qui est une drogue ciblant la synthèse d'ADN et nous avons confirmé par peignage moléculaire que cette sensibilité accrue était bien liée à des problèmes de progression des fourches (Fig. 13). Dans le cadre d'une collaboration avec l'équipe du docteur JP Delord (Institut Claudius Régaud, Toulouse) nous avons également montré que les cellules shRNA Claspine sont plus sensibles à l'Oxaliplatine, qui créé des adduits sur l'ADN (Fig. 14). Nous sommes cependant confrontés à des difficultés techniques pour mesurer la progression des fourches en peignage moléculaire, probablement parce que cette drogue augmente la fragilité des fibres d'ADN. La déplétion de CLASPINE ou de TIMELESS entraine donc une sensibilité différente selon la drogue. Il semblerait que CLASPINE favorise la résistance aux agents génotoxiques créant des lésions de l'ADN. CLASPINE est d'ailleurs impliquée dans l'ubiquitinylation de PCNA après dommages à l'ADN (Yang et al. 2008) et dans la régulation de DDB2, une protéine lié à la réparation par excision de nucléotide (Praetorius-Ibba et al. 2006). En revanche, TIMELESS semble plutôt impliquée dans la réponse au ralentissement de la fourche induite par la déplétion des nucléotides. Ces deux facteurs semblent donc être complémentaires dans la protection des fourches de réplication. A terme, une meilleure compréhension des mécanismes impliqués permettrait de prédire l'efficacité d'un traitement anticancéreux en fonction du niveau de surexpression des facteurs de protection des fourches de réplication.

7 Niveau d'expression de CLASPINE et TIMELESS dans différents cancers

CLASPINE et TIMELESS étant surexprimées dans différentes lignées de cellules cancéreuses, nous avons voulu déterminer si cette surexpression est aussi observée dans les tumeurs. Pour cela, nous avons participé à un projet collaboratif du Cancéropôle Grand Sud Ouest (CGSO) intitulé "Instabilité génétique comme signature péjorative de la maladie". Ce projet, coordonné par C. Cazaux (IPBS, Toulouse), consistait à mesurer par RT-PCR quantitative l'expression d'un ensemble de gènes choisis pour leur implication dans les mécanismes de réplication, réparation ou de recombinaison (Pillaire et al. 2010) dans des collections de tumeurs primaires du colon, du sein et du poumon.

Cela nous a permis d'analyser l'expression de nos gènes d'intérêt dans ces trois cancers, dans le contexte des autres protéines du checkpoint de phase S et de la fourche de réplication. Nous avons observé que les senseurs du checkpoint de phase S sont globalement sous-exprimés. Par contre, les adaptateurs et les effecteurs de ce checkpoint sont surexprimés, de même que les facteurs favorisant l'initiation de la réplication. Nous proposons que les senseurs du checkpoint de réplication soient sous-exprimés afin de mieux tolérer le stress réplicatif endogène et éviter un arrêt irréversible du cycle cellulaire. Ceci est en accord avec le fait que certains de ces gènes, comme Atm, soient préférentiellement mutés et inactivés lors de la tumorigenèse (Halazonetis et al. 2008; Negrini et al. 2010). En revanche la surexpression des adaptateurs et les effecteurs du checkpoint permettrait de protéger les fourches de réplication, comme nous l'avons montré dans les lignées. C'est aussi le cas pour d'autres facteurs impliqués dans la réparation des fourches, comme BLM, Brca1, Brca2 et Rad51.

Dans le cas de CLASPINE et CHK1, on peut voir que PLK1, qui dégrade CLASPINE (Mailand et al. 2006; Mamely et al. 2006), est aussi surexprimée dans le cancer du poumon. CDC25A, une cible de CHK1 régulant l'activité des CDKs de phase S, est également surexprimée. Il y aurait donc une surexpression globale des différents partenaires de CLASPINE afin de maintenir une homéostasie de la voie d'activation de CHK1.

Finalement, nous proposons que la surexpression de nombreux facteurs d'initiation de la réplication puisse créer un contexte favorable pour l'utilisation d'origines de

réplication dormantes pouvant être mobilisées en situation de stress réplicatif. La combinaison de ces différents mécanismes rendrait le programme de réplication plus robuste dans les cellules tumorales et permettrait de mieux tolérer le stress réplicatif d'origine endogène ou exogène, tout en évitant d'activer le checkpoint de réplication.

Des études statistiques sont maintenant nécessaires afin de vérifier l'interdépendance des modifications d'expression de ces gènes. Il serait également intéressant de corréler ces modifications au pronostic de survie des patients. Enfin, le suivi des patients après traitement devrait nous permettre aussi d'établir un lien entre taux d'expression de ces gènes et résistance à la chimiothérapie.

8 Perspectives

Nous avons caractérisé différents modèles cellulaires dans lesquels la surexpression de CLASPINE et TIMELESS apporte un avantage sélectif aux cellules cancéreuses. Nous voulons maintenant préciser le rôle de ces protéines au cours de la progression tumorale et dans la résistance aux traitements anticancéreux.

Pour cela, nous mesurerons tout d'abord l'évolution de l'expression de CLASPINE et TIMELESS au cours de la progression tumorale. Ce processus sera suivi dans des fibroblastes primaires après activation d'un oncogène, afin de déterminer à quel stade de la tumorigenèse ces cellules sur-expriment ces protéines. Après activation d'un oncogène, les fibroblastes subissent une période d'hyperprolifération suivie d'une entrée en sénescence. Il serait aussi intéressant de déterminer si les cellules qui prolifèrent et échappent à la sénescence surexpriment CLASPINE et TIMELESS plus fortement ou plus précocement que les autres.

Pour relier nos résultats concernant CLASPINE et TIMELESS dans des cellules HCT116 aux données obtenues dans les différents cancers, il serait intéressant de caractériser par RT qPCR les niveaux d'ARN messagers de nos 90 gènes d'intérêt dans des cellules HCT116 (+/- shRNAs), en utilisant les mêmes puces Fluidigm utilisées pour caractériser les différents tissus tumoraux. Cela nous permettrait d'une part de vérifier si la surexpression de CLASPINE et TIMELESS dans des lignées HCT116 est retrouvée au niveau des ARN messagers et d'autre part de déterminer si le profil d'expression des autres gènes du réseau est comparable à celui des tumeurs primaires.

Il serait également important de déterminer les rôles respectifs de CLAPINE et TIMELESS dans la résistance aux traitements anticancéreux. L'équipe du Dr JP. Delord (Institut Claudius Régaud, Toulouse) a récemment montré que deux lignées de cellules issues de tumeurs colorectales (HCT8 et HCT116) présentent une réponse différente à un traitement combiné à l'Oxaliplatine et au Cetuximab, ce dernier étant un anticorps monoclonal inhibant les récepteurs de l'E2F (Balin-Gauthier et al. 2008). Les cellules sensibles HCT8 montrent une diminution de l'expression de gènes de la réplication et du checkpoint en réponse au traitement. Plusieurs de ces gènes, dont CLASPINE, sont aussi dérégulés dans les cancers du sein, du colon et du poumon. Nous avons montré qu'il est possible de sensibiliser les cellules

résistantes HCT116 à ce traitement en diminuant la quantité de CLASPINE par shRNA (Fig. 14.C). Il serait maintenant intéressant de voir si nous pouvons augmenter la résistance des cellules sensibles (HCT8) en surexprimant CLASPINE. Il serait aussi intéressant de corréler la sensibilité aux drogues à la vitesse de progression des fourches de réplication mesurée par peignage moléculaire ; cela nous permettrait de vérifier que cette sensibilité aux drogues est associée à une diminution de la stabilité des fourches de réplication.

Finalement, nous chercherons à déterminer si CLASPINE est une cible thérapeutique potentielle pour augmenter l'effet de drogues ciblant la fourche de réplication. Pour ce faire, nous grefferons des cellules tumorales surexprimant ou non CLASPINE dans des souris immunodéprimées, afin de mesurer la croissance tumorale dans ces deux lignées. Si nécessaire, nous chercherons à augmenter l'effet de cette déplétion par une double déplétion de CLASPINE et TIMELESS.

En conclusion, mes travaux ont permis de mieux comprendre le rôle crucial joué par les protéines CLASPINE et TIMELESS dans la réponse des cellules tumorales au stress réplicatif. A l'avenir, cibler CLASPINE ou les autres protéines de cette voie pourrait permettre de diminuer la résistance aux traitements antitumoraux. De même, connaitre le niveau d'expression de ces protéines chez un patient pourrait permettre d'anticiper la résistance à certains traitements anti-tumoraux et donc d'optimiser le choix du traitement.

CHAPITRE 5 : BIBLIOGRAPHIE

Abraham, R.T. 2001. Cell cycle checkpoint signaling through the ATM and ATR kinases. *Genes Dev* **15**(17): 2177-2196.

Aggarwal, B.D. and Calvi, B.R. 2004. Chromatin regulates origin activity in Drosophila follicle cells. *Nature* **430**(6997): 372-376.

Aguilera, A. and Gomez-Gonzalez, B. 2008. Genome instability: a mechanistic view of its causes and consequences. *Nat Rev Genet* **9**(3): 204-217.

Alabert, C., Bianco, J.N., and Pasero, P. 2009. Differential regulation of homologous recombination at DNA breaks and replication forks by the Mrc1 branch of the S-phase checkpoint. *Embo J* **28**(8): 1131-1141.

Alcasabas, A.A., Osborn, A.J., Bachant, J., Hu, F., Werler, P.J., Bousset, K., Furuya, K., Diffley, J.F., Carr, A.M., and Elledge, S.J. 2001. Mrc1 transduces signals of DNA replication stress to activate Rad53. *Nat Cell Biol* **3**(11): 958-965.

Araki, H., Leem, S.H., Phongdara, A., and Sugino, A. 1995. Dpb11, which interacts with DNA polymerase II(epsilon) in Saccharomyces cerevisiae, has a dual role in S-phase progression and at a cell cycle checkpoint. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(25): 11791-11795.

Bahassi, E.M., Ovesen, J.L., Riesenberg, A.L., Bernstein, W.Z., Hasty, P.E., and Stambrook, P.J. 2008. The checkpoint kinases Chk1 and Chk2 regulate the functional associations between hBRCA2 and Rad51 in response to DNA damage. *Oncogene* **27**(28): 3977-3985.

Bakkenist, C.J. and Kastan, M.B. 2003. DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation. *Nature* **421**(6922): 499-506.

Balin-Gauthier, D., Delord, J.P., Pillaire, M.J., Rochaix, P., Hoffman, J.S., Bugat, R., Cazaux, C., Canal, P., and Allal, B.C. 2008. Cetuximab potentiates oxaliplatin cytotoxic effect through a defect in NER and DNA replication initiation. *Br J Cancer* **98**(1): 120-128.

Bartek, J., Bartkova, J., and Lukas, J. 2007. DNA damage signalling guards against activated oncogenes and tumour progression. *Oncogene* **26**(56): 7773-7779.

Bartek, J., Lukas, C., and Lukas, J. 2004. Checking on DNA damage in S phase. *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**(10): 792-804.

Bartek, J. and Lukas, J. 2001. Mammalian G1- and S-phase checkpoints in response to DNA damage. *Curr Opin Cell Biol* **13**(6): 738-747.

Bartkova, J., Horejsi, Z., Koed, K., Kramer, A., Tort, F., Zieger, K., Guldberg, P., Sehested, M., Nesland, J.M., Lukas, C., Orntoft, T., Lukas, J., and Bartek, J. 2005. DNA damage response as a candidate anti-cancer barrier in early human tumorigenesis. *Nature* **434**(7035): 864-870.

Bartkova, J., Rezaei, N., Liontos, M., Karakaidos, P., Kletsas, D., Issaeva, N., Vassiliou, L.V., Kolettas, E., Niforou, K., Zoumpourlis, V.C., Takaoka, M., Nakagawa, H., Tort, F., Fugger, K., Johansson, F., Sehested, M., Andersen, C.L., Dyrskjot, L., Orntoft, T., Lukas, J., Kittas, C., Helleday, T., Halazonetis, T.D., Bartek, J., and Gorgoulis, V.G. 2006. Oncogene-induced senescence is part of the tumorigenesis barrier imposed by DNA damage checkpoints. *Nature* **444**(7119): 633-637.

Bassermann, F., Frescas, D., Guardavaccaro, D., Busino, L., Peschiaroli, A., and Pagano, M. 2008. The Cdc14B-Cdh1-Plk1 axis controls the G2 DNA-damage-response checkpoint. *Cell* **134**(2): 256-267.

Bell, S.P. and Stillman, B. 1992. ATP-dependent recognition of eukaryotic origins of DNA replication by a multiprotein complex. *Nature* **357**(6374): 128-134.

Belotserkovskaya, R., Oh, S., Bondarenko, V.A., Orphanides, G., Studitsky, V.M., and Reinberg, D. 2003. FACT facilitates transcription-dependent nucleosome alteration. *Science* **301**(5636): 1090-1093.

Berkovich, E., Monnat, R.J., Jr., and Kastan, M.B. 2007. Roles of ATM and NBS1 in chromatin structure modulation and DNA double-strand break repair. *Nat Cell Biol* **9**(6): 683-690.

Bermejo, R., Doksani, Y., Capra, T., Katou, Y.M., Tanaka, H., Shirahige, K., and Foiani, M. 2007. Top1- and Top2-mediated topological transitions at replication forks ensure fork progression and stability and prevent DNA damage checkpoint activation. *Genes Dev* **21**(15): 1921-1936.

Bermudez, V.P., Farina, A., Tappin, I., and Hurwitz, J. 2010. Influence of the human cohesion establishment factor Ctf4/AND-1 on DNA replication. *J Biol Chem* **285**(13): 9493-9505.

Bowers, J.L., Randell, J.C., Chen, S., and Bell, S.P. 2004. ATP hydrolysis by ORC catalyzes reiterative Mcm2-7 assembly at a defined origin of replication. *Mol Cell* **16**(6): 967-978.

Brondello, J.M., Ducommun, B., Fernandez, A., and Lamb, N.J. 2007. Linking PCNA-dependent replication and ATR by human Claspin. *Biochem Biophys Res Commun* **354**(4): 1028-1033.

Brown, E.J. and Baltimore, D. 2000. ATR disruption leads to chromosomal fragmentation and early embryonic lethality. *Genes Dev* **14**(4): 397-402.

Brush, G.S., Morrow, D.M., Hieter, P., and Kelly, T.J. 1996. The ATM homologue MEC1 is required for phosphorylation of replication protein A in yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(26): 15075-15080.

Byun, T.S., Pacek, M., Yee, M.C., Walter, J.C., and Cimprich, K.A. 2005. Functional uncoupling of MCM helicase and DNA polymerase activities activates the ATR-dependent checkpoint. *Genes Dev* **19**(9): 1040-1052.

Cadoret, J.C., Meisch, F., Hassan-Zadeh, V., Luyten, I., Guillet, C., Duret, L., Quesneville, H., and Prioleau, M.N. 2008. Genome-wide studies highlight indirect links between human replication origins and gene regulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**(41): 15837-15842.

Calzada, A., Hodgson, B., Kanemaki, M., Bueno, A., and Labib, K. 2005. Molecular anatomy and regulation of a stable replisome at a paused eukaryotic DNA replication fork. *Genes Dev* **19**(16): 1905-1919.

Casper, A.M., Nghiem, P., Arlt, M.F., and Glover, T.W. 2002. ATR regulates fragile site stability. *Cell* **111**(6): 779-789.

Chaney, S.G., Campbell, S.L., Bassett, E., and Wu, Y. 2005. Recognition and processing of cisplatin- and oxaliplatin-DNA adducts. *Crit Rev Oncol Hematol* **53**(1): 3-11.

Chang, M., Bellaoui, M., Boone, C., and Brown, G.W. 2002. A genome-wide screen for methyl methanesulfonate-sensitive mutants reveals genes required for S phase progression in the presence of DNA damage. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(26): 16934-16939.

Chastain, P.D., 2nd, Heffernan, T.P., Nevis, K.R., Lin, L., Kaufmann, W.K., Kaufman, D.G., and Cordeiro-Stone, M. 2006. Checkpoint regulation of replication dynamics in UV-irradiated human cells. *Cell Cycle* **5**(18): 2160-2167.

Chen, C.L., Rappailles, A., Duquenne, L., Huvet, M., Guilbaud, G., Farinelli, L., Audit, B., d'Aubenton-Carafa, Y., Arneodo, A., Hyrien, O., and Thermes, C. 2010. Impact of replication timing on non-CpG and CpG substitution rates in mammalian genomes. *Genome Res* **20**(4): 447-457.

Chibon, F., Lagarde, P., Salas, S., Perot, G., Brouste, V., Tirode, F., Lucchesi, C., de Reynies, A., Kauffmann, A., Bui, B., Terrier, P., Bonvalot, S., Le Cesne, A., Vince-Ranchere, D., Blay, J.Y., Collin, F., Guillou, L., Leroux, A., Coindre, J.M., and Aurias, A. 2010. Validated prediction of clinical outcome in sarcomas and multiple types of cancer on

the basis of a gene expression signature related to genome complexity. *Nat Med* **16**(7): 781-787.
Chini, C.C. and Chen, J. 2003. Human claspin is required for replication checkpoint control. *J Biol Chem* **278**(32): 30057-30062.
-. 2006. Repeated phosphopeptide motifs in human Claspin are phosphorylated by Chk1 and mediate Claspin function. *J Biol Chem* **281**(44): 33276-33282.
Chini, C.C., Wood, J., and Chen, J. 2006. Chk1 is required to maintain claspin stability. *Oncogene* **25**(30): 4165-4171.
Cho, S.H., Toouli, C.D., Fujii, G.H., Crain, C., and Parry, D. 2005. Chk1 is essential for tumor cell viability following activation of the replication checkpoint. *Cell Cycle* **4**(1): 131-139.
Chou, D.M. and Elledge, S.J. 2006. Tipin and Timeless form a mutually protective complex required for genotoxic stress resistance and checkpoint function. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(48): 18143-18147.
Clarke, C.A. and Clarke, P.R. 2005. DNA-dependent phosphorylation of Chk1 and Claspin in a human cell-free system. *Biochem J* **388**(Pt 2): 705-712.
Cobb, J.A., Schleker, T., Rojas, V., Bjergbaek, L., Tercero, J.A., and Gasser, S.M. 2005. Replisome instability, fork collapse, and gross chromosomal rearrangements arise synergistically from Mec1 kinase and RecQ helicase mutations. *Genes Dev* **19**(24): 3055-3069.
Conti, C., Sacca, B., Herrick, J., Lalou, C., Pommier, Y., and Bensimon, A. 2007. Replication fork velocities at adjacent replication origins are coordinately modified during DNA replication in human cells. *Mol Biol Cell* **18**(8): 3059-3067.
Cortez, D., Glick, G., and Elledge, S.J. 2004. Minichromosome maintenance proteins are direct targets of the ATM and ATR checkpoint kinases. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(27): 10078-10083.
Cortez, D., Guntuku, S., Qin, J., and Elledge, S.J. 2001. ATR and ATRIP: partners in checkpoint signaling. *Science* **294**(5547): 1713-1716.
Courbet, S., Gay, S., Arnoult, N., Wronka, G., Anglana, M., Brison, O., and Debatisse, M. 2008. Replication fork movement sets chromatin loop size and origin choice in mammalian cells. *Nature* **455**(7212): 557-560.
Crabbe, L., Thomas, A., Pantesco, V., De Vos, J., Pasero, P., and Lengronne, A. 2010. Analysis of replication profiles reveals key role of RFC-Ctf18 in yeast replication stress response. *Nat Struct Mol Biol*.
Danis, E., Brodolin, K., Menut, S., Maiorano, D., Girard-Reydet, C., and Mechali, M. 2004. Specification of a DNA replication origin by a transcription complex. *Nat Cell Biol* **6**(8): 721-730.
Delacroix, S., Wagner, J.M., Kobayashi, M., Yamamoto, K., and Karnitz, L.M. 2007. The Rad9-Hus1-Rad1 (9-1-1) clamp activates checkpoint signaling via TopBP1. *Genes Dev* **21**(12): 1472-1477.
Delmolino, L.M., Saha, P., and Dutta, A. 2001. Multiple mechanisms regulate subcellular localization of human CDC6. *J Biol Chem* **276**(29): 26947-26954.
Di Micco, R., Fumagalli, M., Cicalese, A., Piccinin, S., Gasparini, P., Luise, C., Schurra, C., Garre, M., Nuciforo, P.G., Bensimon, A., Maestro, R., Pelicci, P.G., and d'Adda di Fagagna, F. 2006. Oncogene-induced senescence is a DNA damage response triggered by DNA hyper-replication. *Nature* **444**(7119): 638-642.
Dimitrova, N., Chen, Y.C., Spector, D.L., and de Lange, T. 2008. 53BP1 promotes non-homologous end joining of telomeres by increasing chromatin mobility. *Nature* **456**(7221): 524-528.

Durkin, S.G., Arlt, M.F., Howlett, N.G., and Glover, T.W. 2006. Depletion of CHK1, but not CHK2, induces chromosomal instability and breaks at common fragile sites. *Oncogene* **25**(32): 4381-4388.

Duro, E., Vaisica, J.A., Brown, G.W., and Rouse, J. 2008. Budding yeast Mms22 and Mms1 regulate homologous recombination induced by replisome blockage. *DNA Repair (Amst)* **7**(5): 811-818.

El Achkar, E., Gerbault-Seureau, M., Muleris, M., Dutrillaux, B., and Debatisse, M. 2005. Premature condensation induces breaks at the interface of early and late replicating chromosome bands bearing common fragile sites. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(50): 18069-18074.

Ellison, V. and Stillman, B. 2003. Biochemical characterization of DNA damage checkpoint complexes: clamp loader and clamp complexes with specificity for 5' recessed DNA. *PLoS Biol* **1**(2): E33.

Errico, A., Costanzo, V., and Hunt, T. 2007. Tipin is required for stalled replication forks to resume DNA replication after removal of aphidicolin in Xenopus egg extracts. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(38): 14929-14934.

Esashi, F., Christ, N., Gannon, J., Liu, Y., Hunt, T., Jasin, M., and West, S.C. 2005. CDK-dependent phosphorylation of BRCA2 as a regulatory mechanism for recombinational repair. *Nature* **434**(7033): 598-604.

Farkash-Amar, S. and Simon, I. 2010. Genome-wide analysis of the replication program in mammals. *Chromosome Res* **18**(1): 115-125.

Fernandez-Capetillo, O., Lee, A., Nussenzweig, M., and Nussenzweig, A. 2004. H2AX: the histone guardian of the genome. *DNA Repair (Amst)* **3**(8-9): 959-967.

Fisher, R.P. 1997. CDKs and cyclins in transition(s). *Curr Opin Genet Dev* **7**(1): 32-38.

Focarelli, M.L., Soza, S., Mannini, L., Paulis, M., Montecucco, A., and Musio, A. 2009. Claspin inhibition leads to fragile site expression. *Genes Chromosomes Cancer* **48**(12): 1083-1090.

Foray, N., Priestley, A., Alsbeih, G., Badie, C., Capulas, E.P., Arlett, C.F., and Malaise, E.P. 1997. Hypersensitivity of ataxia telangiectasia fibroblasts to ionizing radiation is associated with a repair deficiency of DNA double-strand breaks. *Int J Radiat Biol* **72**(3): 271-283.

Foss, E.J. 2001. Tof1p regulates DNA damage responses during S phase in Saccharomyces cerevisiae. *Genetics* **157**(2): 567-577.

Frum, R.A., Khondker, Z.S., and Kaufman, D.G. 2009. Temporal differences in DNA replication during the S phase using single fiber analysis of normal human fibroblasts and glioblastoma T98G cells. *Cell Cycle* **8**(19): 3133-3148.

Fu, Y.V. and Walter, J.C. 2010. DNA replication: metazoan Sld3 steps forward. *Curr Biol* **20**(12): R515-517.

Gambus, A., Jones, R.C., Sanchez-Diaz, A., Kanemaki, M., van Deursen, F., Edmondson, R.D., and Labib, K. 2006. GINS maintains association of Cdc45 with MCM in replisome progression complexes at eukaryotic DNA replication forks. *Nat Cell Biol* **8**(4): 358-366.

Gambus, A., van Deursen, F., Polychronopoulos, D., Foltman, M., Jones, R.C., Edmondson, R.D., Calzada, A., and Labib, K. 2009. A key role for Ctf4 in coupling the MCM2-7 helicase to DNA polymerase alpha within the eukaryotic replisome. *Embo J* **28**(19): 2992-3004.

Garg, P., Stith, C.M., Sabouri, N., Johansson, E., and Burgers, P.M. 2004. Idling by DNA polymerase delta maintains a ligatable nick during lagging-strand DNA replication. *Genes Dev* **18**(22): 2764-2773.

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. *Genes Dev* **21**(24): 3331-3341.

Gewurz, B.E. and Harper, J.W. 2006. DNA-damage control: Claspin destruction turns off the checkpoint. *Curr Biol* **16**(21): R932-934.

Gilbert, D.M., Neilson, A., Miyazawa, H., DePamphilis, M.L., and Burhans, W.C. 1995. Mimosine arrests DNA synthesis at replication forks by inhibiting deoxyribonucleotide metabolism. *J Biol Chem* **270**(16): 9597-9606.

Gilbert, N., Boyle, S., Fiegler, H., Woodfine, K., Carter, N.P., and Bickmore, W.A. 2004. Chromatin architecture of the human genome: gene-rich domains are enriched in open chromatin fibers. *Cell* **118**(5): 555-566.

Glover, T.W. 2006. Common fragile sites. *Cancer Lett* **232**(1): 4-12.

Gorgoulis, V.G., Vassiliou, L.V., Karakaidos, P., Zacharatos, P., Kotsinas, A., Liloglou, T., Venere, M., Ditullio, R.A., Jr., Kastrinakis, N.G., Levy, B., Kletsas, D., Yoneta, A., Herlyn, M., Kittas, C., and Halazonetis, T.D. 2005. Activation of the DNA damage checkpoint and genomic instability in human precancerous lesions. *Nature* **434**(7035): 907-913.

Gotter, A.L., Manganaro, T., Weaver, D.R., Kolakowski, L.F., Jr., Possidente, B., Sriram, S., MacLaughlin, D.T., and Reppert, S.M. 2000. A time-less function for mouse timeless. *Nat Neurosci* **3**(8): 755-756.

Gotter, A.L., Suppa, C., and Emanuel, B.S. 2007. Mammalian TIMELESS and Tipin are evolutionarily conserved replication fork-associated factors. *J Mol Biol* **366**(1): 36-52.

Gottipati, P., Cassel, T.N., Savolainen, L., and Helleday, T. 2008. Transcription-associated recombination is dependent on replication in Mammalian cells. *Mol Cell Biol* **28**(1): 154-164.

Graves, P.R., Yu, L., Schwarz, J.K., Gales, J., Sausville, E.A., O'Connor, P.M., and Piwnica-Worms, H. 2000. The Chk1 protein kinase and the Cdc25C regulatory pathways are targets of the anticancer agent UCN-01. *J Biol Chem* **275**(8): 5600-5605.

Greenfeder, S.A. and Newlon, C.S. 1992. Replication forks pause at yeast centromeres. *Mol Cell Biol* **12**(9): 4056-4066.

Halazonetis, T.D., Gorgoulis, V.G., and Bartek, J. 2008. An oncogene-induced DNA damage model for cancer development. *Science* **319**(5868): 1352-1355.

Han, J., Li, Q., McCullough, L., Kettelkamp, C., Formosa, T., and Zhang, Z. 2010. Ubiquitylation of FACT by the cullin-E3 ligase Rtt101 connects FACT to DNA replication. *Genes Dev* **24**(14): 1485-1490.

Hanada, K., Budzowska, M., Davies, S.L., van Drunen, E., 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**(11): 1096-1104.

Hanahan, D. and Weinberg, R.A. 2000. The hallmarks of cancer. *Cell* **100**(1): 57-70.

Hanna, J.S., Kroll, E.S., Lundblad, V., and Spencer, F.A. 2001. Saccharomyces cerevisiae CTF18 and CTF4 are required for sister chromatid cohesion. *Mol Cell Biol* **21**(9): 3144-3158.

Hansen, R.S., Thomas, S., Sandstrom, R., Canfield, T.K., Thurman, R.E., Weaver, M., Dorschner, M.O., Gartler, S.M., and Stamatoyannopoulos, J.A. 2010. Sequencing newly replicated DNA reveals widespread plasticity in human replication timing. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**(1): 139-144.

Hashimoto, Y. and Takisawa, H. 2003. Xenopus Cut5 is essential for a CDK-dependent process in the initiation of DNA replication. *Embo J* **22**(10): 2526-2535.

Helmrich, A., Stout-Weider, K., Hermann, K., Schrock, E., and Heiden, T. 2006. Common fragile sites are conserved features of human and mouse chromosomes and relate to large active genes. *Genome Res* **16**(10): 1222-1230.

Hiratani, I., Ryba, T., Itoh, M., Yokochi, T., Schwaiger, M., Chang, C.W., Lyou, Y., Townes, T.M., Schubeler, D., and Gilbert, D.M. 2008. Global reorganization of replication domains during embryonic stem cell differentiation. *PLoS Biol* **6**(10): e245.

Hoege, C., Pfander, B., Moldovan, G.L., Pyrowolakis, G., and Jentsch, S. 2002. RAD6-dependent DNA repair is linked to modification of PCNA by ubiquitin and SUMO. *Nature* **419**(6903): 135-141.

Huvet, M., Nicolay, S., Touchon, M., Audit, B., d'Aubenton-Carafa, Y., Arneodo, A., and Thermes, C. 2007. Human gene organization driven by the coordination of replication and transcription. *Genome Res* **17**(9): 1278-1285.

Hyrien, O. 2000. Mechanisms and consequences of replication fork arrest. *Biochimie* **82**(1): 5-17.

Ibarra, A., Schwob, E., and Mendez, J. 2008. Excess MCM proteins protect human cells from replicative stress by licensing backup origins of replication. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**(26): 8956-8961.

Ilves, I., Petojevic, T., Pesavento, J.J., and Botchan, M.R. 2010. Activation of the MCM2-7 helicase by association with Cdc45 and GINS proteins. *Mol Cell* **37**(2): 247-258.

Ishimi, Y., Komamura-Kohno, Y., Karasawa-Shimizu, K., and Yamada, K. 2004. Levels of MCM4 phosphorylation and DNA synthesis in DNA replication block checkpoint control. *J Struct Biol* **146**(1-2): 234-241.

Ivessa, A.S., Lenzmeier, B.A., Bessler, J.B., Goudsouzian, L.K., Schnakenberg, S.L., and Zakian, V.A. 2003. The Saccharomyces cerevisiae helicase Rrm3p facilitates replication past nonhistone protein-DNA complexes. *Mol Cell* **12**(6): 1525-1536.

Izumi, M., Yatagai, F., and Hanaoka, F. 2004. Localization of human Mcm10 is spatially and temporally regulated during the S phase. *J Biol Chem* **279**(31): 32569-32577.

Jin, J., Shirogane, T., Xu, L., Nalepa, G., Qin, J., Elledge, S.J., and Harper, J.W. 2003. SCFbeta-TRCP links Chk1 signaling to degradation of the Cdc25A protein phosphatase. *Genes Dev* **17**(24): 3062-3074.

Kamimura, Y., Masumoto, H., Sugino, A., and Araki, H. 1998. Sld2, which interacts with Dpb11 in Saccharomyces cerevisiae, is required for chromosomal DNA replication. *Mol Cell Biol* **18**(10): 6102-6109.

Kanemaki, M. and Labib, K. 2006. Distinct roles for Sld3 and GINS during establishment and progression of eukaryotic DNA replication forks. *Embo J* **25**(8): 1753-1763.

Karnani, N., Taylor, C.M., and Dutta, A. 2009. Microarray analysis of DNA replication timing. *Methods Mol Biol* **556**: 191-203.

Karnani, N., Taylor, C.M., Malhotra, A., and Dutta, A. 2010. Genomic study of replication initiation in human chromosomes reveals the influence of transcription regulation and chromatin structure on origin selection. *Mol Biol Cell* **21**(3): 393-404.

Kastan, M.B., Onyekwere, O., Sidransky, D., Vogelstein, B., and Craig, R.W. 1991. Participation of p53 protein in the cellular response to DNA damage. *Cancer Res* **51**(23 Pt 1): 6304-6311.

Katou, Y., Kanoh, Y., Bando, M., Noguchi, H., Tanaka, H., Ashikari, T., Sugimoto, K., and Shirahige, K. 2003. S-phase checkpoint proteins Tof1 and Mrc1 form a stable replication-pausing complex. *Nature* **424**(6952): 1078-1083.

Kim, J.E., McAvoy, S.A., Smith, D.I., and Chen, J. 2005. Human TopBP1 ensures genome integrity during normal S phase. *Mol Cell Biol* **25**(24): 10907-10915.

Kim, J.M., Kakusho, N., Yamada, M., Kanoh, Y., Takemoto, N., and Masai, H. 2008. Cdc7 kinase mediates Claspin phosphorylation in DNA replication checkpoint. *Oncogene* **27**(24): 3475-3482.

Kim, R.A. and Wang, J.C. 1989. Function of DNA topoisomerases as replication swivels in Saccharomyces cerevisiae. *J Mol Biol* **208**(2): 257-267.

Kim, Y. and Kipreos, E.T. 2007. Cdt1 degradation to prevent DNA re-replication: conserved and non-conserved pathways. *Cell Div* **2**: 18.

Krude, T. 1999. Mimosine arrests proliferating human cells before onset of DNA replication in a dose-dependent manner. *Exp Cell Res* **247**(1): 148-159.

Kumagai, A. and Dunphy, W.G. 2000. Claspin, a novel protein required for the activation of Chk1 during a DNA replication checkpoint response in Xenopus egg extracts. *Mol Cell* **6**(4): 839-849.

-. 2003. Repeated phosphopeptide motifs in Claspin mediate the regulated binding of Chk1. *Nat Cell Biol* **5**(2): 161-165.

Kumagai, A., Lee, J., Yoo, H.Y., and Dunphy, W.G. 2006. TopBP1 activates the ATR-ATRIP complex. *Cell* **124**(5): 943-955.

Kumagai, A., Shevchenko, A., Shevchenko, A., and Dunphy, W.G. 2010. Treslin collaborates with TopBP1 in triggering the initiation of DNA replication. *Cell* **140**(3): 349-359.

Labib, K. 2010. How do Cdc7 and cyclin-dependent kinases trigger the initiation of chromosome replication in eukaryotic cells? *Genes Dev* **24**(12): 1208-1219.

Lavin, M.F. and Khanna, K.K. 1999. ATM: the protein encoded by the gene mutated in the radiosensitive syndrome ataxia-telangiectasia. *Int J Radiat Biol* **75**(10): 1201-1214.

Le Francois, B.G., Maroun, J.A., and Birnboim, H.C. 2007. Expression of thymidylate synthase in human cells is an early G(1) event regulated by CDK4 and p16INK4A but not E2F. *Br J Cancer* **97**(9): 1242-1250.

Lebofsky, R., Heilig, R., Sonnleitner, M., Weissenbach, J., and Bensimon, A. 2006. DNA replication origin interference increases the spacing between initiation events in human cells. *Mol Biol Cell* **17**(12): 5337-5345.

Lee, J., Gold, D.A., Shevchenko, A., Shevchenko, A., and Dunphy, W.G. 2005. Roles of replication fork-interacting and Chk1-activating domains from Claspin in a DNA replication checkpoint response. *Mol Biol Cell* **16**(11): 5269-5282.

Lee, J., Kumagai, A., and Dunphy, W.G. 2007. The Rad9-Hus1-Rad1 checkpoint clamp regulates interaction of TopBP1 with ATR. *J Biol Chem* **282**(38): 28036-28044.

Lehmann, A.R., Niimi, A., Ogi, T., Brown, S., Sabbioneda, S., Wing, J.F., Kannouche, P.L., and Green, C.M. 2007. Translesion synthesis: Y-family polymerases and the polymerase switch. *DNA Repair (Amst)* **6**(7): 891-899.

Lengauer, C., Kinzler, K.W., and Vogelstein, B. 1997. Genetic instability in colorectal cancers. *Nature* **386**(6625): 623-627.

Liku, M.E., Nguyen, V.Q., Rosales, A.W., Irie, K., and Li, J.J. 2005. CDK phosphorylation of a novel NLS-NES module distributed between two subunits of the Mcm2-7 complex prevents chromosomal rereplication. *Mol Biol Cell* **16**(10): 5026-5039.

Lin, S.Y., Li, K., Stewart, G.S., and Elledge, S.J. 2004. Human Claspin works with BRCA1 to both positively and negatively regulate cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(17): 6484-6489.

Lindsey-Boltz, L.A., Sercin, O., Choi, J.H., and Sancar, A. 2009. Reconstitution of human claspin-mediated phosphorylation of Chk1 by the ATR (ataxia telangiectasia-mutated and rad3-related) checkpoint kinase. *J Biol Chem* **284**(48): 33107-33114.

Lisby, M., Barlow, J.H., Burgess, R.C., and Rothstein, R. 2004. Choreography of the DNA damage response: spatiotemporal relationships among checkpoint and repair proteins. *Cell* **118**(6): 699-713.

Liu, E., Li, X., Yan, F., Zhao, Q., and Wu, X. 2004. Cyclin-dependent kinases phosphorylate human Cdt1 and induce its degradation. *J Biol Chem* **279**(17): 17283-17288.

Liu, Q., Guntuku, S., Cui, X.S., Matsuoka, S., Cortez, D., Tamai, K., Luo, G., Carattini-Rivera, S., DeMayo, F., Bradley, A., Donehower, L.A., and Elledge, S.J. 2000. Chk1 is an essential kinase that is regulated by Atr and required for the G(2)/M DNA damage checkpoint. *Genes Dev* **14**(12): 1448-1459.

Liu, S., Bekker-Jensen, S., Mailand, N., Lukas, C., Bartek, J., and Lukas, J. 2006. Claspin operates downstream of TopBP1 to direct ATR signaling towards Chk1 activation. *Mol Cell Biol* **26**(16): 6056-6064.

Loeb, L.A. 1991. Mutator phenotype may be required for multistage carcinogenesis. *Cancer Res* **51**(12): 3075-3079.

Lopes, M., Cotta-Ramusino, C., Pellicioli, A., Liberi, G., Plevani, P., Muzi-Falconi, M., Newlon, C.S., and Foiani, M. 2001. The DNA replication checkpoint response stabilizes stalled replication forks. *Nature* **412**(6846): 557-561.

Lucas, I., Germe, T., Chevrier-Miller, M., and Hyrien, O. 2001. Topoisomerase II can unlink replicating DNA by precatenane removal. *Embo J* **20**(22): 6509-6519.

Lukas, J., Lukas, C., and Bartek, J. 2004. Mammalian cell cycle checkpoints: signalling pathways and their organization in space and time. *DNA Repair (Amst)* **3**(8-9): 997-1007.

Luke, B., Versini, G., Jaquenoud, M., Zaidi, I.W., Kurz, T., Pintard, L., Pasero, P., and Peter, M. 2006. The cullin Rtt101p promotes replication fork progression through damaged DNA and natural pause sites. *Curr Biol* **16**(8): 786-792.

Luo, J., Solimini, N.L., and Elledge, S.J. 2009. Principles of cancer therapy: oncogene and non-oncogene addiction. *Cell* **136**(5): 823-837.

Lutzmann, M., Maiorano, D., and Mechali, M. 2006. A Cdt1-geminin complex licenses chromatin for DNA replication and prevents rereplication during S phase in Xenopus. *Embo J* **25**(24): 5764-5774.

Lutzmann, M. and Mechali, M. 2008. MCM9 binds Cdt1 and is required for the assembly of prereplication complexes. *Mol Cell* **31**(2): 190-200.

MacAlpine, D.M., Rodriguez, H.K., and Bell, S.P. 2004. Coordination of replication and transcription along a Drosophila chromosome. *Genes Dev* **18**(24): 3094-3105.

MacAlpine, H.K., Gordan, R., Powell, S.K., Hartemink, A.J., and MacAlpine, D.M. 2010. Drosophila ORC localizes to open chromatin and marks sites of cohesin complex loading. *Genome Res* **20**(2): 201-211.

Mailand, N., Bekker-Jensen, S., Bartek, J., and Lukas, J. 2006. Destruction of Claspin by SCFbetaTrCP restrains Chk1 activation and facilitates recovery from genotoxic stress. *Mol Cell* **23**(3): 307-318.

Mailand, N. and Diffley, J.F. 2005. CDKs promote DNA replication origin licensing in human cells by protecting Cdc6 from APC/C-dependent proteolysis. *Cell* **122**(6): 915-926.

Maiorano, D., Cuvier, O., Danis, E., and Mechali, M. 2005. MCM8 is an MCM2-7-related protein that functions as a DNA helicase during replication elongation and not initiation. *Cell* **120**(3): 315-328.

Majka, J., Binz, S.K., Wold, M.S., and Burgers, P.M. 2006. Replication protein A directs loading of the DNA damage checkpoint clamp to 5'-DNA junctions. *J Biol Chem* **281**(38): 27855-27861.

Malinsky, J., Koberna, K., Stanek, D., Masata, M., Votruba, I., and Raska, I. 2001. The supply of exogenous deoxyribonucleotides accelerates the speed of the replication fork in early S-phase. *J Cell Sci* **114**(Pt 4): 747-750.

Malumbres, M. and Barbacid, M. 2005. Mammalian cyclin-dependent kinases. *Trends Biochem Sci* **30**(11): 630-641.

Mamely, I., van Vugt, M.A., Smits, V.A., Semple, J.I., Lemmens, B., Perrakis, A., Medema, R.H., and Freire, R. 2006. Polo-like kinase-1 controls proteasome-dependent degradation of Claspin during checkpoint recovery. *Curr Biol* **16**(19): 1950-1955.

Marahrens, Y. and Stillman, B. 1992. A yeast chromosomal origin of DNA replication defined by multiple functional elements. *Science* **255**(5046): 817-823.

Marheineke, K. and Hyrien, O. 2004. Control of replication origin density and firing time in Xenopus egg extracts: role of a caffeine-sensitive, ATR-dependent checkpoint. *J Biol Chem* **279**(27): 28071-28081.

Masai, H., Taniyama, C., Ogino, K., Matsui, E., Kakusho, N., Matsumoto, S., Kim, J.M., Ishii, A., Tanaka, T., Kobayashi, T., Tamai, K., Ohtani, K., and Arai, K. 2006. Phosphorylation of MCM4 by Cdc7 kinase facilitates its interaction with Cdc45 on the chromatin. *J Biol Chem* **281**(51): 39249-39261.

Masumoto, H., Sugino, A., and Araki, H. 2000. Dpb11 controls the association between DNA polymerases alpha and epsilon and the autonomously replicating sequence region of budding yeast. *Mol Cell Biol* **20**(8): 2809-2817.

Matsuoka, S., Ballif, B.A., Smogorzewska, A., McDonald, E.R., 3rd, Hurov, K.E., Luo, J., Bakalarski, C.E., Zhao, Z., Solimini, N., Lerenthal, Y., Shiloh, Y., Gygi, S.P., and Elledge, S.J. 2007. ATM and ATR substrate analysis reveals extensive protein networks responsive to DNA damage. *Science* **316**(5828): 1160-1166.

Maya-Mendoza, A., Petermann, E., Gillespie, D.A., Caldecott, K.W., and Jackson, D.A. 2007. Chk1 regulates the density of active replication origins during the vertebrate S phase. *Embo J* **26**(11): 2719-2731.

Meister, P., Taddei, A., Vernis, L., Poidevin, M., Gasser, S.M., and Baldacci, G. 2005. Temporal separation of replication and recombination requires the intra-S checkpoint. *J Cell Biol* **168**(4): 537-544.

Michalet, X., Ekong, R., Fougerousse, F., Rousseaux, S., Schurra, C., Hornigold, N., van Slegtenhorst, M., Wolfe, J., Povey, S., Beckmann, J.S., and Bensimon, A. 1997. Dynamic molecular combing: stretching the whole human genome for high-resolution studies. *Science* **277**(5331): 1518-1523.

Michel, B., Boubakri, H., Baharoglu, Z., LeMasson, M., and Lestini, R. 2007. Recombination proteins and rescue of arrested replication forks. *DNA Repair (Amst)* **6**(7): 967-980.

Mimura, S., Masuda, T., Matsui, T., and Takisawa, H. 2000. Central role for cdc45 in establishing an initiation complex of DNA replication in Xenopus egg extracts. *Genes Cells* **5**(6): 439-452.

Mirzoeva, O.K. and Petrini, J.H. 2001. DNA damage-dependent nuclear dynamics of the Mre11 complex. *Mol Cell Biol* **21**(1): 281-288.

Mohaghegh, P. and Hickson, I.D. 2001. DNA helicase deficiencies associated with cancer predisposition and premature ageing disorders. *Hum Mol Genet* **10**(7): 741-746.

Moldovan, G.L., Pfander, B., and Jentsch, S. 2007. PCNA, the maestro of the replication fork. *Cell* **129**(4): 665-679.

Moyer, S.E., Lewis, P.W., and Botchan, M.R. 2006. Isolation of the Cdc45/Mcm2-7/GINS (CMG) complex, a candidate for the eukaryotic DNA replication fork helicase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(27): 10236-10241.

Muramatsu, S., Hirai, K., Tak, Y.S., Kamimura, Y., and Araki, H. 2010. CDK-dependent complex formation between replication proteins Dpb11, Sld2, Pol (epsilon}, and GINS in budding yeast. *Genes Dev* **24**(6): 602-612.

Murr, R., Loizou, J.I., Yang, Y.G., Cuenin, C., Li, H., Wang, Z.Q., and Herceg, Z. 2006. Histone acetylation by Trrap-Tip60 modulates loading of repair proteins and repair of DNA double-strand breaks. *Nat Cell Biol* **8**(1): 91-99.

Myung, K., Datta, A., and Kolodner, R.D. 2001. Suppression of spontaneous chromosomal rearrangements by S phase checkpoint functions in Saccharomyces cerevisiae. *Cell* **104**(3): 397-408.

Negrini, S., Gorgoulis, V.G., and Halazonetis, T.D. 2010. Genomic instability--an evolving hallmark of cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol* **11**(3): 220-228.

Nguyen, V.Q., Co, C., and Li, J.J. 2001. Cyclin-dependent kinases prevent DNA re-replication through multiple mechanisms. *Nature* **411**(6841): 1068-1073.

Nick McElhinny, S.A., Gordenin, D.A., Stith, C.M., Burgers, P.M., and Kunkel, T.A. 2008. Division of labor at the eukaryotic replication fork. *Mol Cell* **30**(2): 137-144.

Niida, H., Katsuno, Y., Banerjee, B., Hande, M.P., and Nakanishi, M. 2007. Specific role of Chk1 phosphorylations in cell survival and checkpoint activation. *Mol Cell Biol*.

Norio, P., Kosiyatrakul, S., Yang, Q., Guan, Z., Brown, N.M., Thomas, S., Riblet, R., and Schildkraut, C.L. 2005. Progressive activation of DNA replication initiation in large domains of the immunoglobulin heavy chain locus during B cell development. *Mol Cell* **20**(4): 575-587.

Olma, M.H., Roy, M., Le Bihan, T., Sumara, I., Maerki, S., Larsen, B., Quadroni, M., Peter, M., Tyers, M., and Pintard, L. 2009. An interaction network of the mammalian COP9 signalosome identifies Dda1 as a core subunit of multiple Cul4-based E3 ligases. *J Cell Sci* **122**(Pt 7): 1035-1044.

Osborn, A.J. and Elledge, S.J. 2003. Mrc1 is a replication fork component whose phosphorylation in response to DNA replication stress activates Rad53. *Genes Dev* **17**(14): 1755-1767.

Osborn, A.J., Elledge, S.J., and Zou, L. 2002. Checking on the fork: the DNA-replication stress-response pathway. *Trends Cell Biol* **12**(11): 509-516.

Ozeri-Galai, E., Schwartz, M., Rahat, A., and Kerem, B. 2008. Interplay between ATM and ATR in the regulation of common fragile site stability. *Oncogene* **27**(15): 2109-2117.

Pacek, M., Tutter, A.V., Kubota, Y., Takisawa, H., and Walter, J.C. 2006. Localization of MCM2-7, Cdc45, and GINS to the site of DNA unwinding during eukaryotic DNA replication. *Mol Cell* **21**(4): 581-587.

Pacek, M. and Walter, J.C. 2004. A requirement for MCM7 and Cdc45 in chromosome unwinding during eukaryotic DNA replication. *Embo J* **23**(18): 3667-3676.

Paulsen, R.D. and Cimprich, K.A. 2007. The ATR pathway: fine-tuning the fork. *DNA Repair (Amst)* **6**(7): 953-966.

Pellegrini, M., Celeste, A., Difilippantonio, S., Guo, R., Wang, W., Feigenbaum, L., and Nussenzweig, A. 2006. Autophosphorylation at serine 1987 is dispensable for murine Atm activation in vivo. *Nature* **443**(7108): 222-225.

Pellicioli, A., Lucca, C., Liberi, G., Marini, F., Lopes, M., Plevani, P., Romano, A., Di Fiore, P.P., and Foiani, M. 1999. Activation of Rad53 kinase in response to DNA damage and its effect in modulating phosphorylation of the lagging strand DNA polymerase. *Embo J* **18**(22): 6561-6572.

Peschiaroli, A., Dorrello, N.V., Guardavaccaro, D., Venere, M., Halazonetis, T., Sherman, N.E., and Pagano, M. 2006. SCFbetaTrCP-mediated degradation of Claspin regulates recovery from the DNA replication checkpoint response. *Mol Cell* **23**(3): 319-329.

Petermann, E., Helleday, T., and Caldecott, K.W. 2008. Claspin promotes normal replication fork rates in human cells. *Mol Biol Cell* **19**(6): 2373-2378.

Petermann, E., Maya-Mendoza, A., Zachos, G., Gillespie, D.A., Jackson, D.A., and Caldecott, K.W. 2006. Chk1 requirement for high global rates of replication fork progression during normal vertebrate S phase. *Mol Cell Biol* **26**(8): 3319-3326.

Pfander, B., Moldovan, G.L., Sacher, M., Hoege, C., and Jentsch, S. 2005. SUMO-modified PCNA recruits Srs2 to prevent recombination during S phase. *Nature* **436**(7049): 428-433.

Pillaire, M.J., Selves, J., Gordien, K., Gourraud, P.A., Gentil, C., Danjoux, M., Do, C., Negre, V., Bieth, A., Guimbaud, R., Trouche, D., Pasero, P., Mechali, M., Hoffmann, J.S., and Cazaux, C. 2010. A 'DNA replication' signature of progression and negative outcome in colorectal cancer. *Oncogene* **29**(6): 876-887.

Popescu, N.C. 2003. Genetic alterations in cancer as a result of breakage at fragile sites. *Cancer Lett* **192**(1): 1-17.

Prado, F. and Aguilera, A. 2005. Impairment of replication fork progression mediates RNA polII transcription-associated recombination. *Embo J* **24**(6): 1267-1276.

Praetorius-Ibba, M., Wang, Q.E., Wani, G., El-Mahdy, M.A., Zhu, Q., Qin, S., and Wani, A.A. 2006. Role of Claspin in regulation of nucleotide excision repair factor DDB2. *DNA Repair (Amst)*.

Pursell, Z.F., Isoz, I., Lundstrom, E.B., Johansson, E., and Kunkel, T.A. 2007. Yeast DNA polymerase epsilon participates in leading-strand DNA replication. *Science* **317**(5834): 127-130.

Raghuraman, M.K., Brewer, B.J., and Fangman, W.L. 1997. Cell cycle-dependent establishment of a late replication program. *Science* **276**(5313): 806-809.

Raghuraman, M.K., Winzeler, E.A., Collingwood, D., Hunt, S., Wodicka, L., Conway, A., Lockhart, D.J., Davis, R.W., Brewer, B.J., and Fangman, W.L. 2001. Replication dynamics of the yeast genome. *Science* **294**(5540): 115-121.

Rassool, F.V., North, P.S., Mufti, G.J., and Hickson, I.D. 2003. Constitutive DNA damage is linked to DNA replication abnormalities in Bloom's syndrome cells. *Oncogene* **22**(54): 8749-8757.

Reinhardt, H.C. and Yaffe, M.B. 2009. Kinases that control the cell cycle in response to DNA damage: Chk1, Chk2, and MK2. *Curr Opin Cell Biol* **21**(2): 245-255.

Remus, D., Beall, E.L., and Botchan, M.R. 2004. DNA topology, not DNA sequence, is a critical determinant for Drosophila ORC-DNA binding. *Embo J* **23**(4): 897-907.

Rhind, N., Yang, S.C., and Bechhoefer, J. 2010. Reconciling stochastic origin firing with defined replication timing. *Chromosome Res* **18**(1): 35-43.

Ricke, R.M. and Bielinsky, A.K. 2004. Mcm10 regulates the stability and chromatin association of DNA polymerase-alpha. *Mol Cell* **16**(2): 173-185.

Roos, W.P. and Kaina, B. 2006. DNA damage-induced cell death by apoptosis. *Trends Mol Med* **12**(9): 440-450.

Rossi, M.L. and Bambara, R.A. 2006. Reconstituted Okazaki fragment processing indicates two pathways of primer removal. *J Biol Chem* **281**(36): 26051-26061.

Rothstein, R., Michel, B., and Gangloff, S. 2000. Replication fork pausing and recombination or "gimme a break". *Genes Dev* **14**(1): 1-10.

Sabourin, M. and Zakian, V.A. 2008. ATM-like kinases and regulation of telomerase: lessons from yeast and mammals. *Trends Cell Biol* **18**(7): 337-346.

Saintigny, Y., Delacote, F., Vares, G., Petitot, F., Lambert, S., Averbeck, D., and Lopez, B.S. 2001. Characterization of homologous recombination induced by replication inhibition in mammalian cells. *Embo J* **20**(14): 3861-3870.

Sancar, A., Lindsey-Boltz, L.A., Unsal-Kacmaz, K., and Linn, S. 2004. Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints. *Annu Rev Biochem* **73**: 39-85.

Sanchez-Pulido, L., Diffley, J.F., and Ponting, C.P. 2010. Homology explains the functional similarities of Treslin/Ticrr and Sld3. *Curr Biol* **20**(12): R509-510.

Santocanale, C. and Diffley, J.F. 1998. A Mec1- and Rad53-dependent checkpoint controls late-firing origins of DNA replication. *Nature* **395**(6702): 615-618.

Sar, F., Lindsey-Boltz, L.A., Subramanian, D., Croteau, D.L., Hutsell, S.Q., Griffith, J.D., and Sancar, A. 2004. Human claspin is a ring-shaped DNA-binding protein with high affinity to branched DNA structures. *J Biol Chem* **279**(38): 39289-39295.

Sarasin, A. and Kauffmann, A. 2008. Overexpression of DNA repair genes is associated with metastasis: a new hypothesis. *Mutat Res* **659**(1-2): 49-55.

Sawyer, S.L., Cheng, I.H., Chai, W., and Tye, B.K. 2004. Mcm10 and Cdc45 cooperate in origin activation in Saccharomyces cerevisiae. *J Mol Biol* **340**(2): 195-202.

Schaarschmidt, D., Baltin, J., Stehle, I.M., Lipps, H.J., and Knippers, R. 2004. An episomal mammalian replicon: sequence-independent binding of the origin recognition complex. *Embo J* **23**(1): 191-201.

Scorah, J. and McGowan, C.H. 2009. Claspin and Chk1 regulate replication fork stability by different mechanisms. *Cell Cycle* **8**(7): 1036-1043.

Shechter, D., Costanzo, V., and Gautier, J. 2004. ATR and ATM regulate the timing of DNA replication origin firing. *Nat Cell Biol* **6**(7): 648-655.

Shiloh, Y. 2003. ATM and related protein kinases: safeguarding genome integrity. *Nat Rev Cancer* **3**(3): 155-168.

Shimada, K., Pasero, P., and Gasser, S.M. 2002. ORC and the intra-S-phase checkpoint: a threshold regulates Rad53p activation in S phase. *Genes Dev* **16**(24): 3236-3252.

Shirahige, K., Hori, Y., Shiraishi, K., Yamashita, M., Takahashi, K., Obuse, C., Tsurimoto, T., and Yoshikawa, H. 1998. Regulation of DNA-replication origins during cell-cycle progression. *Nature* **395**(6702): 618-621.

Shrivastav, M., De Haro, L.P., and Nickoloff, J.A. 2008. Regulation of DNA double-strand break repair pathway choice. *Cell Res* **18**(1): 134-147.

Silva, T., Bradley, R.H., Gao, Y., and Coue, M. 2006. Xenopus CDC7/DRF1 complex is required for the initiation of DNA replication. *J Biol Chem* **281**(17): 11569-11576.

Smith, K.D., Fu, M.A., and Brown, E.J. 2009. Tim-Tipin dysfunction creates an indispensible reliance on the ATR-Chk1 pathway for continued DNA synthesis. *J Cell Biol* **187**(1): 15-23.

Smits, V.A., Reaper, P.M., and Jackson, S.P. 2006. Rapid PIKK-dependent release of Chk1 from chromatin promotes the DNA-damage checkpoint response. *Curr Biol* **16**(2): 150-159.

Snijders, A.M., Nowak, N., Segraves, R., Blackwood, S., Brown, N., Conroy, J., Hamilton, G., Hindle, A.K., Huey, B., Kimura, K., Law, S., Myambo, K., Palmer, J., Ylstra, B., Yue, J.P., Gray, J.W., Jain, A.N., Pinkel, D., and Albertson, D.G. 2001. Assembly of microarrays for genome-wide measurement of DNA copy number. *Nat Genet* **29**(3): 263-264.

Sogo, J.M., Lopes, M., and Foiani, M. 2002. Fork reversal and ssDNA accumulation at stalled replication forks owing to checkpoint defects. *Science* **297**(5581): 599-602.

Sorensen, C.S., Hansen, L.T., Dziegielewski, J., Syljuasen, R.G., Lundin, C., Bartek, J., and Helleday, T. 2005. The cell-cycle checkpoint kinase Chk1 is required for mammalian homologous recombination repair. *Nat Cell Biol* **7**(2): 195-201.

Sorensen, C.S., Syljuasen, R.G., Lukas, J., and Bartek, J. 2004. ATR, Claspin and the Rad9-Rad1-Hus1 complex regulate Chk1 and Cdc25A in the absence of DNA damage. *Cell Cycle* **3**(7): 941-945.

Speck, C., Chen, Z., Li, H., and Stillman, B. 2005. ATPase-dependent cooperative binding of ORC and Cdc6 to origin DNA. *Nat Struct Mol Biol* **12**(11): 965-971.

Stamatoyannopoulos, J.A., Adzhubei, I., Thurman, R.E., Kryukov, G.V., Mirkin, S.M., and Sunyaev, S.R. 2009. Human mutation rate associated with DNA replication timing. *Nat Genet* **41**(4): 393-395.

Stracker, T.H., Usui, T., and Petrini, J.H. 2009. Taking the time to make important decisions: the checkpoint effector kinases Chk1 and Chk2 and the DNA damage response. *DNA Repair (Amst)* **8**(9): 1047-1054.

Stucki, M., Clapperton, J.A., Mohammad, D., Yaffe, M.B., Smerdon, S.J., and Jackson, S.P. 2005. MDC1 directly binds phosphorylated histone H2AX to regulate cellular responses to DNA double-strand breaks. *Cell* **123**(7): 1213-1226.

Sun, Y., Jiang, X., Chen, S., Fernandes, N., and Price, B.D. 2005. A role for the Tip60 histone acetyltransferase in the acetylation and activation of ATM. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(37): 13182-13187.

Sun, Y., Jiang, X., Xu, Y., Ayrapetov, M.K., Moreau, L.A., Whetstine, J.R., and Price, B.D. 2009. Histone H3 methylation links DNA damage detection to activation of the tumour suppressor Tip60. *Nat Cell Biol* **11**(11): 1376-1382.

Sun, Y., Xu, Y., Roy, K., and Price, B.D. 2007. DNA damage-induced acetylation of lysine 3016 of ATM activates ATM kinase activity. *Mol Cell Biol* **27**(24): 8502-8509.

Syljuasen, R.G., Sorensen, C.S., Hansen, L.T., Fugger, K., Lundin, C., Johansson, F., Helleday, T., Sehested, M., Lukas, J., and Bartek, J. 2005. Inhibition of human Chk1 causes increased initiation of DNA replication, phosphorylation of ATR targets, and DNA breakage. *Mol Cell Biol* **25**(9): 3553-3562.

Szuts, D. and Krude, T. 2004. Cell cycle arrest at the initiation step of human chromosomal DNA replication causes DNA damage. *J Cell Sci* **117**(Pt 21): 4897-4908.

Szyjka, S.J., Viggiani, C.J., and Aparicio, O.M. 2005. Mrc1 is required for normal progression of replication forks throughout chromatin in S. cerevisiae. *Mol Cell* **19**(5): 691-697.

Tanaka, S., Umemori, T., Hirai, K., Muramatsu, S., Kamimura, Y., and Araki, H. 2007. CDK-dependent phosphorylation of Sld2 and Sld3 initiates DNA replication in budding yeast. *Nature* **445**(7125): 328-332.

Tercero, J.A., Longhese, M.P., and Diffley, J.F. 2003. A central role for DNA replication forks in checkpoint activation and response. *Mol Cell* **11**(5): 1323-1336.

Tourriere, H. and Pasero, P. 2007. Maintenance of fork integrity at damaged DNA and natural pause sites. *DNA Repair (Amst)* **6**(7): 900-913.

Tourriere, H., Versini, G., Cordon-Preciado, V., Alabert, C., and Pasero, P. 2005. Mrc1 and Tof1 promote replication fork progression and recovery independently of Rad53. *Mol Cell* **19**(5): 699-706.

Trenz, K., Errico, A., and Costanzo, V. 2008. Plx1 is required for chromosomal DNA replication under stressful conditions. *Embo J* **27**(6): 876-885.

Tsimaratou, K., Kletsas, D., Kastrinakis, N., Tsantoulis, P., Evangelou, K., Sideridou, M., Liontos, M., Poulias, I., Venere, M., Salmas, M., Kittas, C., Halazonetis, T., and Gorgoulis, V. 2007a. Evaluation of claspin as a proliferation marker in human cancer and normal tissues. *J Pathol* **211**(3): 331-339.

Tsimaratou, K., Kletsas, D., Kastrinakis, N.G., Tsantoulis, P.K., Evangelou, K., Sideridou, M., Liontos, M., Poulias, I., Venere, M., Salmas, M., Kittas, C., Halazonetis, T.D., and Gorgoulis, V.G. 2007b. Evaluation of claspin as a proliferation marker in human cancer and normal tissues. *J Pathol* **211**(3): 331-339.

Tsvetkov, L. and Stern, D.F. 2005a. Interaction of chromatin-associated Plk1 and Mcm7. *J Biol Chem* **280**(12): 11943-11947.

-. 2005b. Phosphorylation of Plk1 at S137 and T210 is inhibited in response to DNA damage. *Cell Cycle* **4**(1): 166-171.

Tuduri, S., Crabbe, L., Conti, C., Tourriere, H., Holtgreve-Grez, H., Jauch, A., Pantesco, V., De Vos, J., Thomas, A., Theillet, C., Pommier, Y., Tazi, J., Coquelle, A., and Pasero, P. 2009. Topoisomerase I suppresses genomic instability by preventing interference between replication and transcription. *Nat Cell Biol* **11**(11): 1315-1324.

Tuduri, S., Tourriere, H., and Pasero, P. 2010. Defining replication origin efficiency using DNA fiber assays. *Chromosome Res* **18**(1): 91-102.

Unsal-Kacmaz, K., Chastain, P.D., Qu, P.P., Minoo, P., Cordeiro-Stone, M., Sancar, A., and Kaufmann, W.K. 2007. The human Tim/Tipin complex coordinates an intra-S checkpoint response to UV that slows replication fork displacement. *Mol Cell Biol*.

Unsal-Kacmaz, K., Mullen, T.E., Kaufmann, W.K., and Sancar, A. 2005. Coupling of human circadian and cell cycles by the timeless protein. *Mol Cell Biol* **25**(8): 3109-3116.

Urtishak, K.A., Smith, K.D., Chanoux, R.A., Greenberg, R.A., Johnson, F.B., and Brown, E.J. 2009. Timeless Maintains Genomic Stability and Suppresses Sister Chromatid Exchange during Unperturbed DNA Replication. *J Biol Chem* **284**(13): 8777-8785.

Vogelauer, M., Rubbi, L., Lucas, I., Brewer, B.J., and Grunstein, M. 2002. Histone acetylation regulates the time of replication origin firing. *Mol Cell* **10**(5): 1223-1233.

Walter, J. and Newport, J. 2000. Initiation of eukaryotic DNA replication: origin unwinding and sequential chromatin association of Cdc45, RPA, and DNA polymerase alpha. *Mol Cell* **5**(4): 617-627.

Walter, J. and Newport, J.W. 1997. Regulation of replicon size in Xenopus egg extracts. *Science* **275**(5302): 993-995.

Wang, X., Zou, L., Lu, T., Bao, S., Hurov, K.E., Hittelman, W.N., Elledge, S.J., and Li, L. 2006. Rad17 phosphorylation is required for claspin recruitment and Chk1 activation in response to replication stress. *Mol Cell* **23**(3): 331-341.

Weinreich, M. and Stillman, B. 1999. Cdc7p-Dbf4p kinase binds to chromatin during S phase and is regulated by both the APC and the RAD53 checkpoint pathway. *Embo J* **18**(19): 5334-5346.

Winnepenninckx, V., Lazar, V., Michiels, S., Dessen, P., Stas, M., Alonso, S.R., Avril, M.F., Ortiz Romero, P.L., Robert, T., Balacescu, O., Eggermont, A.M., Lenoir, G., Sarasin, A., Tursz, T., van den Oord, J.J., and Spatz, A. 2006. Gene expression profiling of primary cutaneous melanoma and clinical outcome. *J Natl Cancer Inst* **98**(7): 472-482.

Woodfine, K., Beare, D.M., Ichimura, K., Debernardi, S., Mungall, A.J., Fiegler, H., Collins, V.P., Carter, N.P., and Dunham, I. 2005. Replication timing of human chromosome 6. *Cell Cycle* **4**(1): 172-176.

Wu, L. 2007. Role of the BLM helicase in replication fork management. *DNA Repair (Amst)* **6**(7): 936-944.

Xie, A., Hartlerode, A., Stucki, M., Odate, S., Puget, N., Kwok, A., Nagaraju, G., Yan, C., Alt, F.W., Chen, J., Jackson, S.P., and Scully, R. 2007. Distinct roles of chromatin-associated proteins MDC1 and 53BP1 in mammalian double-strand break repair. *Mol Cell* **28**(6): 1045-1057.

Xouri, G., Squire, A., Dimaki, M., Geverts, B., Verveer, P.J., Taraviras, S., Nishitani, H., Houtsmuller, A.B., Bastiaens, P.I., and Lygerou, Z. 2007. Cdt1 associates dynamically with chromatin throughout G1 and recruits Geminin onto chromatin. *Embo J* **26**(5): 1303-1314.

Yan, S., Lindsay, H.D., and Michael, W.M. 2006. Direct requirement for Xmus101 in ATR-mediated phosphorylation of Claspin bound Chk1 during checkpoint signaling. *J Cell Biol* **173**(2): 181-186.

Yan, S. and Michael, W.M. 2009. TopBP1 and DNA polymerase-alpha directly recruit the 9-1-1 complex to stalled DNA replication forks. *J Cell Biol* **184**(6): 793-804.

Yang, X., Gregan, J., Lindner, K., Young, H., and Kearsey, S.E. 2005. Nuclear distribution and chromatin association of DNA polymerase alpha-primase is affected by TEV protease cleavage of Cdc23 (Mcm10) in fission yeast. *BMC Mol Biol* **6**: 13.

Yang, X.H., Shiotani, B., Classon, M., and Zou, L. 2008. Chk1 and Claspin potentiate PCNA ubiquitination. *Genes Dev* **22**(9): 1147-1152.

Yang, X.H. and Zou, L. 2009. Dual functions of DNA replication forks in checkpoint signaling and PCNA ubiquitination. *Cell Cycle* **8**(2): 191-194.

Yoo, H.Y., Jeong, S.Y., and Dunphy, W.G. 2006. Site-specific phosphorylation of a checkpoint mediator protein controls its responses to different DNA structures. *Genes Dev* **20**(7): 772-783.

Yoo, H.Y., Kumagai, A., Shevchenko, A., Shevchenko, A., and Dunphy, W.G. 2004. Adaptation of a DNA replication checkpoint response depends upon inactivation of Claspin by the Polo-like kinase. *Cell* **117**(5): 575-588.

Yoshizawa-Sugata, N., Ishii, A., Taniyama, C., Matsui, E., Arai, K., and Masai, H. 2005. A second human Dbf4/ASK-related protein, Drf1/ASKL1, is required for efficient progression of S and M phases. *J Biol Chem* **280**(13): 13062-13070.

Yoshizawa-Sugata, N. and Masai, H. 2007. Human Tim/Timeless-interacting protein, Tipin, is required for efficient progression of S phase and DNA replication checkpoint. *J Biol Chem* **282**(4): 2729-2740.

Zachos, G., Rainey, M.D., and Gillespie, D.A. 2003. Chk1-deficient tumour cells are viable but exhibit multiple checkpoint and survival defects. *Embo J* **22**(3): 713-723.

Zaidi, I.W., Rabut, G., Poveda, A., Scheel, H., Malmstrom, J., Ulrich, H., Hofmann, K., Pasero, P., Peter, M., and Luke, B. 2008. Rtt101 and Mms1 in budding yeast form a CUL4(DDB1)-like ubiquitin ligase that promotes replication through damaged DNA. *EMBO Rep* **9**(10): 1034-1040.

Zegerman, P. and Diffley, J.F. 2007. Phosphorylation of Sld2 and Sld3 by cyclin-dependent kinases promotes DNA replication in budding yeast. *Nature* **445**(7125): 281-285.

Zhao, H. and Piwnica-Worms, H. 2001. ATR-mediated checkpoint pathways regulate phosphorylation and activation of human Chk1. *Mol Cell Biol* **21**(13): 4129-4139.

Zhou, Y. and Wang, T.S. 2004. A coordinated temporal interplay of nucleosome reorganization factor, sister chromatin cohesion factor, and DNA polymerase alpha facilitates DNA replication. *Mol Cell Biol* **24**(21): 9568-9579.

Zhu, X.D., Kuster, B., Mann, M., Petrini, J.H., and de Lange, T. 2000. Cell-cycle-regulated association of RAD50/MRE11/NBS1 with TRF2 and human telomeres. *Nat Genet* **25**(3): 347-352.

Zlotorynski, E., Rahat, A., Skaug, J., Ben-Porat, N., Ozeri, E., Hershberg, R., Levi, A., Scherer, S.W., Margalit, H., and Kerem, B. 2003. Molecular basis for expression of common and rare fragile sites. *Mol Cell Biol* **23**(20): 7143-7151.

CHAPITRE 6 : ANNEXES

Article I : Identification par un criblage RNAi du complexe MMS22L / NFKBIL2, un nouveau régulateur de la réplication dans les cellules humaines (EMBO J., in press).

Au cours de ma thèse, j'ai participé à une collaboration avec le laboratoire de M. Peters (Swiss Federal Institut of Technology, Zurich) afin d'étudier le rôle de MMS22L à la fourche de réplication. Chez la levure, MMS22 forme un complexe avec RTT101, une culline impliquée dans le redémarrage des fourches de réplication bloquées (Luke et al. 2006; Zaidi et al. 2008). Il a été montré par la suite que MMS22 était nécessaire au niveau des fourches bloquées pour promouvoir la RH nécessaire au redémarrage (Duro et al. 2008). Le laboratoire de M Peters à identifié l'homologue humain (MMS22L) de MMS22. Cette protéine agit en complexe avec NFKBIL2. Dans des cellules U2OS et HeLa l'inhibition de MMS22L entraine l'apparition de foyers γ-H2AX spécifiquement en phase S, et une augmentation de la sensibilité à la Camptothécine, un inhibiteur de TOP1. Ils ont aussi observés un allongement de la phase S dans ces cellules là. Afin de déterminer si ces résultats sont du à des défauts de réplication, nous avons mesuré par peignage moléculaire la vitesse des fourches de réplication. Nous avons pu voir que l'inhibition de MMS22L dans des cellules U2OS entraine un fort ralentissement des fourches de réplication. Il a été proposé que comme chez la levure, MMS22L soit impliqué dans une complexe recruté aux fourches de réplication arrêtés et important pour la reconnaissance et la résolution des intermédiaires de recombinaison formés surtout au niveau des zones difficiles à répliquer.

Même si la protéine étudiée est impliquée dans des mécanismes différents de Claspine et Timeless, il est intéressant de noter que les phénotypes observés dans les deux cas montrent de nombreuses similitudes. En effet dans les deux cas on observe des défauts de progression des fourches de réplication accompagné d'une augmentation du stress réplicatif. Cela confirme l'importance pour la cellule de maintenir ces mécanismes de stabilisation des fourches de réplication et que la dérégulation de l'un d'entre eux, quel que soit son mécanisme d'action aura des conséquences importantes pour la stabilité du génome de la cellule.

The EMBO Journal (2010) 29, 4210–4222 | © 2010 European Molecular Biology Organization | All Rights Reserved 0261-4189/10
www.embojournal.org

THE EMBO JOURNAL

RNAi-based screening identifies the Mms22L–Nfkbil2 complex as a novel regulator of DNA replication in human cells

Wojciech Piwko[1,4,*], Michael H Olma[1,4], Michael Held[1], Julien N Bianco[2], Patrick GA Pedrioli[1,5], Kay Hofmann[3], Philippe Pasero[2], Daniel W Gerlich[1] and Matthias Peter[1,*]

[1]Institute of Biochemistry, Department of Biology, ETH Zurich, Zurich, Switzerland, [2]Institute of Human Genetics, CNRS UPR 1142, Montpellier, France and [3]Miltenyi Biotec GmbH, Bioinformatics Department, Bergisch-Gladbach, Germany

Cullin 4 (Cul4)-based ubiquitin ligases emerged as critical regulators of DNA replication and repair. Over 50 Cul4-specific adaptors (DNA damage-binding 1 (Ddb1)–Cul4-associated factors; DCAFs) have been identified and are thought to assemble functionally distinct Cul4 complexes. Using a live-cell imaging-based RNAi screen, we analysed the function of DCAFs and Cul4-linked proteins, and identified specific subsets required for progression through G1 and S phase. We discovered *C6orf167*/Mms22-like protein (*Mms22L*) as a putative human orthologue of budding yeast Mms22, which, together with cullin Rtt101, regulates genome stability by promoting DNA replication through natural pause sites and damaged templates. Loss of Mms22L function in human cells results in S phase-dependent genomic instability characterised by spontaneous double-strand breaks and DNA damage checkpoint activation. Unlike yeast Mms22, human Mms22L does not stably bind to Cul4, but is degraded in a Cul4-dependent manner and upon replication stress. Mms22L physically and functionally interacts with the scaffold-like protein Nfkbil2 that co-purifies with histones, several chromatin remodelling and DNA replication/repair factors. Together, our results strongly suggest that the Mms22L–Nfkbil2 complex contributes to genome stability by regulating the chromatin state at stalled replication forks.
The EMBO Journal (2010) **29,** 4210–4222. doi:10.1038/emboj.2010.304; Published online 26 November 2010
Subject Categories: proteins; genome stability & dynamics
Keywords: cell division; DNA damage repair; DNA replication

*Corresponding authors: W Piwko or M Peter, Institute of Biochemistry, Department of Biology, ETH Zurich, 8093 Zurich, Switzerland.
Tel.: +41 44 63 32 564; Fax: +41 44 63 21 298;
E-mail: wojciech.piwko@bc.biol.ethz.ch or
Tel.: +41 44 63 36 586; Fax: +41 44 63 21 298;
E-mail: matthias.peter@bc.biol.ethz.ch
[4]These authors contributed equally to this work
[5]Present address: The Scottish Institute for Cell Signalling, The Sir James Black Centre, College of Life Sciences, University of Dundee, Dow Street, Dundee DD1 5EH, Scotland

Received: 20 September 2010; accepted: 5 November 2010; published online: 26 November 2010

Introduction

Accurate and complete DNA duplication is fundamental to the maintenance of genomic integrity and is ensured by the cooperation of cell cycle checkpoints and DNA repair pathways. However, progressing replication forks encounter many obstacles, including tightly packed histone-associated heterochromatic regions, a myriad of non-nucleosomal protein impediments such as sites of active transcription, telomeres and centromeres, and damaged templates (Tourriere and Pasero, 2007). Dedicated mechanisms are required to slow down and modify active replication forks at these sites and require checkpoint-dependent stabilisation of the replisome. Occasionally, however, replication forks collapse and must be rescued by the firing of late origins or by specialised restart/repair processes that prevent the formation of double-strand breaks (DSBs), illegitimate recombination and gross chromosomal rearrangements. Although these mechanisms are of crucial importance to maintain genome integrity, little is known about the components and regulatory signals.

The phosphatidylinositol 3 kinase-related protein kinases (PIKKs), ATM, ATR and DNA-dependent protein kinase (DNA-PK), emerged as key factors in several DNA damage response pathways. ATM and DNA-PK are activated primarily by the presence of DSBs, whereas stalled replication forks and the presence of replication protein A (RPA)-coated ssDNA stimulate ATR (Shiloh, 2003; Cimprich and Cortez, 2008). ATM and ATR and their major effector kinases Chk2 and Chk1 slow down or arrest cell cycle progression to allow time for efficient repair. In addition, PIKKs orchestrate DNA damage repair in a manner not only specific for the type of damage but also for the cell cycle stage at which the lesion occurs. DSBs, one of the most toxic DNA lesions, are repaired by two major mechanisms—non-homologous end joining (NHEJ) and homologous recombination (HR). NHEJ leads to ligation of two DNA ends without sequence homology and is predominantly used to repair breaks occurring during G1 or in specialised cases during S phase. In contrast, HR occurs preferentially in S and G2 and takes advantage of the presence of the sister chromatid, which is used as a template for error-free homology-driven repair (Branzei and Foiani, 2008).

In addition to phosphorylation, DNA replication and repair pathways are regulated at multiple levels by ubiquitylation of key components, in particular by cullin 4 (Cul4)-RING E3 ubiquitin ligases (CRL4) (Lee and Zhou, 2007). All cullins interact via their C-terminal region with the RING finger protein Rbx1/Hrt1, which in turn recruits an E2 ubiquitin-conjugating enzyme. The N-terminal domain of cullins is specific for each subfamily, and interacts with distinct classes of substrate-specific adaptors (Pintard *et al*, 2004). The human genome encodes two Cul4-paralogues, Cul4A and

 ©2010 European Molecular Biology Organization

Cul4B, both of which bind via their N-terminal regions to the DNA damage-binding 1 (Ddb1) protein. In turn, Ddb1 interacts with the various substrate-specific adaptor subunits, which belong to a large group of WD40 repeat (WDR)-containing proteins (Ddb1–Cul4-associated factors; DCAFs). However, the critical substrates and specific DCAFs involved in DNA replication and repair processes remain poorly understood.

$CRL4^{Cdt2}$ regulates several S phase-related processes by using the replicative polymerase sliding clamp PCNA as a cofactor to target the replication-licensing factor Cdt1 (Kim and Kipreos, 2007), the cyclin-dependent kinase (CDK) inhibitor p21 (Abbas *et al*, 2008) and the TLS polymerase eta Polη (Kim and Michael, 2008). Moreover, Cul4 complexes control two nucleotide excision repair (NER) pathways. For example, $CRL4^{Ddb2}$ is recruited to UV-induced DNA lesions, where it mediates ubiquitylation of the repair protein XPC (Sugasawa *et al*, 2005), while the $CRL4^{CSA}$ complex targets CSB for degradation to remove stalled RNA polymerase II from damaged templates (Sugasawa *et al*, 2005; Fousteri *et al*, 2006). CRL4 complexes also support efficient DNA repair by altering nucleosome stability around the damaged site. For example, Cul4 ubiquitylates histone H2A, H3 and H4 near UV lesions, thereby causing histone eviction to expose the damaged DNA to repair proteins (Kapetanaki *et al*, 2006; Wang *et al*, 2006).

Progression of DNA replication in Cul4-depleted cells is perturbed and accompanied by strong upregulation of the phosphorylated histone H2A variant H2AX (γH2AX), indicating the occurrence of spontaneous DSBs during the S phase (Olma *et al*, 2009). This is reminiscent of the function of Rtt101, the putative Cul4 orthologue in budding yeast, which, in complex with Mms1 and Mms22, has a crucial role in DNA replication through natural pause sites and damaged templates (Luke *et al*, 2006). Indeed, detailed studies revealed that *rtt101*Δ cells are genetically unstable because they are unable to promote HR at stalled replication forks during S phase (Duro *et al*, 2008). Mms22 binds to the N-terminal region of Rtt101 via Mms1, which shares significant similarities to human Ddb1, suggesting that Mms22 is a substrate-specific adaptor for the Rtt101-based ubiquitin ligase (Zaidi *et al*, 2008). Finally, genetic and biochemical experiments suggest that the $Rtt101^{Mms22}$ E3 ligase functions downstream of Rtt109, a histone acetyltransferase required for H3-K56 acetylation, which marks newly replicated DNA and is required for genome stability maintenance in yeast and mammalian cells (Collins *et al*, 2007; Roberts *et al*, 2008). These studies suggest that a conserved Rtt101/Cul4-dependent pathway may be involved in replicating through chromosomal slow zones and promotes restart of stalled replication forks.

In this study, we used automated live-cell microscopy and computational image analysis to quantify interphase timing in an RNAi screen, targeting all known and bioinformatically predicted substrate adaptors of Cul4. We identified several Cul4-associated proteins specifically regulating the duration of the G1, S and G2 phases of the cell cycle, and C6orf167/Mms22-like protein (Mms22L), a putative human homologue of yeast Mms22. Biochemical and cell biological analysis suggests that Mms22L, in complex with Nfkbil2, is required to ensure genome stability during DNA replication in mammalian cells.

Results

RNAi-based screening for Cul4-linked genes involved in cell cycle progression

To investigate the functional importance of the different Cul4 substrate adaptors for DNA replication and genome integrity, we developed an automated RNAi-based screening protocol allowing quantification of replication and mitosis timing. We used a HeLa cell line stably expressing mCherry-tagged histone H2B as a chromatin marker to discriminate the mitotic stages, and EGFP-tagged PCNA to visualise the characteristic morphological changes of DNA replication foci during the S phase (Figure 1A). Automated time-lapse imaging data were annotated using the CellCognition computational framework (Held *et al*, 2010) to classify 11 different cell cycle stages by supervised machine learning (G1, early, mid and late S, and G2 phase based on EGFP-PCNA, and six mitotic stages based on H2B-mCherry; Figure 1A and B), which allowed to measure the duration of each single cell cycle stage. To validate the sensitivity and performance of this assay, we analysed the phenotype of HeLa cells that were RNAi-depleted for the known cell cycle regulators Skp2, Ddb1 and Rad51 (Figure 1C). In agreement with previous publications, downregulation of each of these genes resulted in the expected delays in G1, S and G2 phases, respectively (Sonoda *et al*, 1998; Sutterluty *et al*, 1999; Lovejoy *et al*, 2006).

To identify Cul4 adaptors involved in DNA replication, we designed an siRNA library targeting 147 genes associated with Cul4, including known and bioinformatically predicted DCAFs and other Cul4-interacting proteins (Figure 2A and Supplementary Table 1). Each gene was targeted by three to six distinct siRNA oligos (Supplementary Table 1), using reverse transfection in 96-well plates. Image acquisition was started 25 h after RNAi and cells were imaged for 47 h with a time resolution of approximately 6 min. Using the CellCognition software, we measured the duration of the respective cell cycle phases for at least 15 cells per siRNA, and used the calculated medians to classify each of the candidate genes. If more than half of all quantified siRNAs showed a *z*-score above 5, relative to the negative controls, we considered this gene as a potential hit. In all, 50 genes showed a significant delay in G1 phase (Supplementary Table 2), including 17 *bona fide* DCAFs characterised by WD40 domains (Figure 2B). As an example, Figure 2C and D illustrate the analysis of cells depleted of DCAF Wdr51B, which extended G1 phase to approximately 15 h, compared with 7 h for RNAi controls. Four DCAFs were not only necessary for timely G1 progression but also exhibited significant delays in S phase. Among them is the known DCAF, Wdr26, which slows down DNA replication by approximately 20%, as visualised by persistent PCNA foci (Supplementary Table 2, Figure 2E and F). In addition, we identified seven genes including four DCAFs specifically required for efficient progression through S phase, without significantly affecting G1 and G2 length. Taken together, this RNAi-based screen identified a subset of known or predicted CRL4 adaptors required for timely interphase progression, and suggested specific functions of CRL4-based E3 ligases in G1, entry into S phase and efficient progression through early and late stages of DNA replication.

©2010 European Molecular Biology Organization

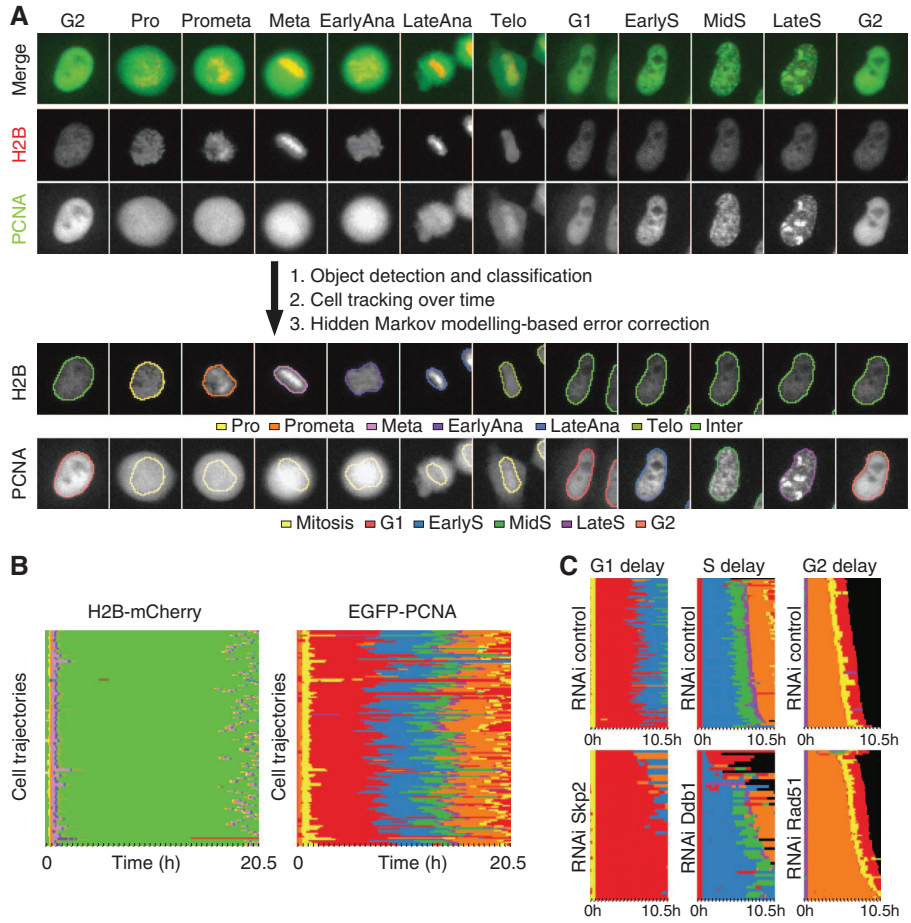


Figure 1 Automated high-content RNAi screening assay to measure the timing of different cell cycle phases. (**A**) HeLa cells stably expressing the chromatin marker H2B-mCherry (red) and the replication factory marker EGFP-PCNA (green) were imaged for 47 h using an automated wide-field epifluorescence microscope with a 10 × dry objective. Single cells were detected by local adaptive thresholding and distinct cellular morphologies were classified by supervised machine learning. Trajectories of single cells containing prometaphase stages were extracted and classification was improved with a hidden Markov model (HMM)-based method (Held *et al*, 2010). This yielded accurate annotations of all indicated cell cycle phases (lower panels) and apoptosis (not shown). (**B**) Overview of all detected cell trajectories for an RNAi control in the two channels sorted by occurrence in the movie and aligned at the prophase–prometaphase transition. (**C**) Cell trajectories detected in time-lapse movies of cells RNAi-depleted of Skp2, Ddb1 and Rad51 (oligos 11, 7 and 6), aligned at the mitosis-G1, G1-early S phase and late S phase–G2 transitions and sorted by G1, S and G2 phase length, respectively.

C6orf167/Mms22L is required for maintenance of genomic stability during S phase

Downregulation of only two genes, *PolR2E* and *C6orf167*, caused a significant prolongation of G2 phase. The pronounced G2 delay of C6orf167-depleted cells classified with an average *z*-score of 20 and, in contrast to PolR2E, was not accompanied by changes in G1 or S phase duration (Figure 2G and H; Supplementary Table 3). Interestingly, *C6orf167* codes for a yet uncharacterised human protein with low, but significant, similarity to yeast Mms22 (Supplementary Figure 1). Given the bioinformatic conservation and functional similarities in maintaining genome stability during DNA replication, we named *C6orf167* as Mms22L.

To test whether the prolonged G2 phase in Mms22L-depleted cells results from activation of the DNA damage checkpoint, we performed immunoblot analysis of extracts derived from HeLa cells treated with siRNA specifically targeting Mms22L, using phospho-specific antibodies against activated checkpoint proteins. Indeed, we observed increased phosphorylation of ATM on Ser 1981, Chk2 on Thr 68 and Chk1 on Ser 345 upon depletion of Mms22L (Figure 3A and Supplementary Figure 2), which suggests activation of both the ATM and ATR branches of the DNA damage checkpoint. This was accompanied by hyperphosphorylation of several PIKK substrates, including the histone H2A variant H2AX on Ser 139 (γH2AX) and RPA2, markers of DNA damage and replication stress, respectively (Anantha *et al*, 2007). Similar results were also observed for U2OS cells (Supplementary Figure 3; Supplementary data not shown), implying that the defects are not solely explained by the transformed phenotype of HeLa cells. The G2 arrest may be a direct consequence of DNA damage checkpoint activation, as the G2 phase duration of Mms22L-depleted HeLa cells treated with the ATM/ATR inhibitor caffeine was reduced from 8.8 to 4.7 h, which is comparable to RNAi controls (Figure 3B). Taken together, these results suggest that depletion of Mms22L induces a strong delay in G2 because of activation of the ATM/ATR-dependent checkpoint response pathway.

To corroborate these results, we used indirect immunofluorescence microscopy using antibodies specific for γH2AX to visualise DSBs. Indeed, the number of γH2AX foci strongly

 ©2010 European Molecular Biology Organization

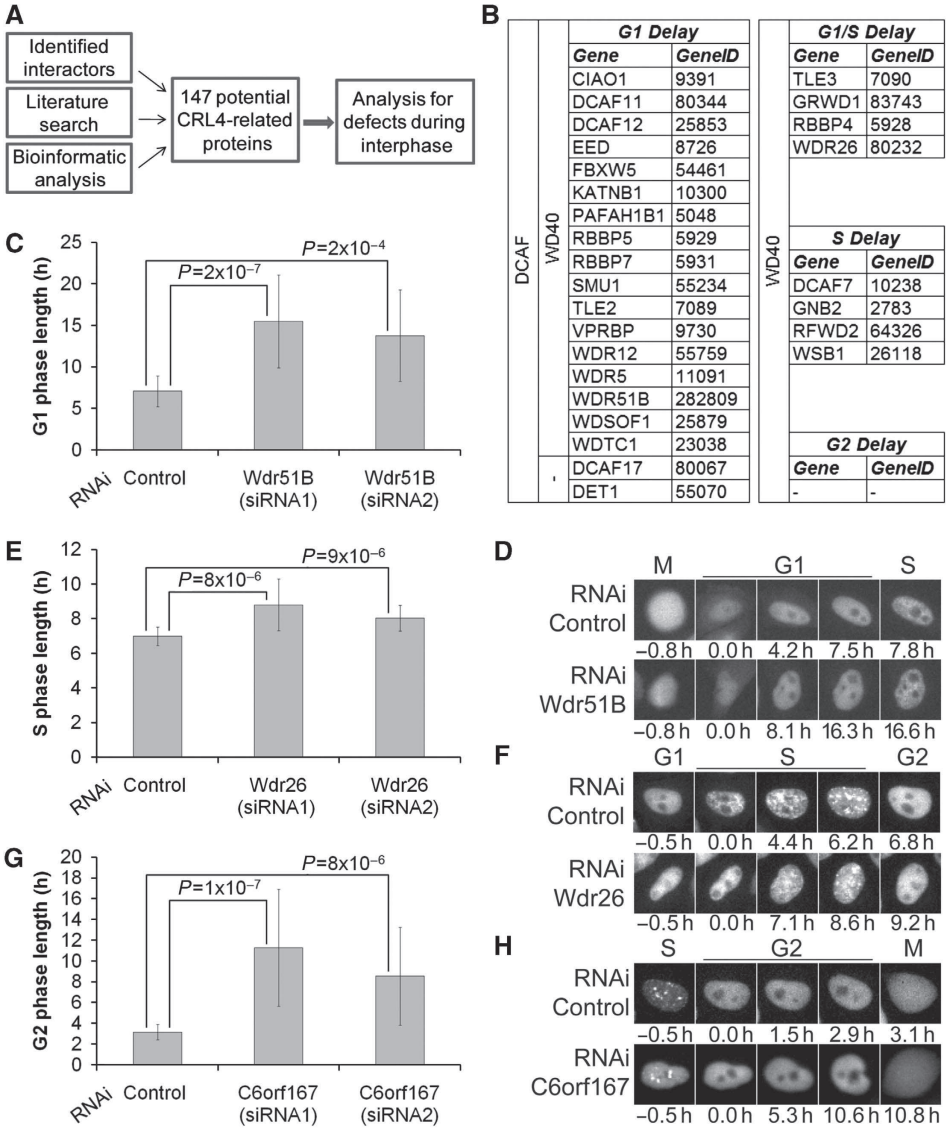


Figure 2 RNAi-based screen for Cul4-related genes involved in regulation of interphase in HeLa cells. (**A**, **B**) An RNAi library targeting Cul4-associated genes was based on MS analysis of purified Cul4A complexes and yeast two-hybrid screens of Cul4A and Cul4B. This list was complemented with published Cul4 interactors and detailed bioinformatic analysis of Cul4-related proteins. A total of 147 CRL4-related genes were then analysed by RNAi depletion for interphase delays using the automated screening assay depicted in Figure 1. *Bona fide* DCAFs showing specific delays at the indicated cell cycle phase are listed (**B**). The entire list including all analysed genes is provided in Supplementary Table 2. (**C**–**H**) The duration of the indicated cell cycle phase was measured for at least 20 cells depleted of selected candidates, and the mean, s.d. and the Student *t*-test *P*-value were calculated (**C**, **E**, **G**; oligos 2, 4, 5, 4, 7 and 8, respectively). Time-lapse microscopy images of a representative cell depleted for the indicated Cul4-related proteins, progressing through G1 (**D**, oligo 2), S (**F**, oligo 5) and G2 (**H**, oligo 7) phases.

increased upon RNAi depletion of Mms22L in HeLa (Figure 3C and D, and Supplementary Figure 2) and U2OS cells (Supplementary Figure 3). Moreover, this signal colocalised with foci formed by 53BP1 (Figure 3C), an important mediator of ATM signalling (Schultz *et al*, 2000; Wang *et al*, 2002), and RPA2 (Figure 3D), which marks extended ssDNA regions (Binz *et al*, 2004). We also examined Mms22L-depleted cells by flow cytometry (Figure 3E). As expected, the cell cycle analysis showed dramatic accumulation of cells in G2/M, and a concomitant reduction of cells in both G1 and S phase. Staining with γH2AX-specific antibodies revealed that DSBs gradually accumulate during S phase and partially diminish during G2 (Figure 3E and F). In contrast, γH2AX was only weakly increased during G1, suggesting that, in the absence of Mms22L, accumulation of DSBs arising specifically during S phase triggers a checkpoint-dependent arrest in G2 to allow sufficient time for repair before entering mitosis. Consistent with a specific function during the S phase, DNA combing experiments revealed that replication forks moved significantly slower in U2OS cells depleted for Mms22L in comparison with the RNAi control (Figure 3G and Supplementary Figure 4). Collectively, these phenotypes are reminiscent of yeast cells lacking components of the $Rtt101^{Mms22}$ E3 ligase, which regulates faithful DNA replication through damaged templates or replication slow zones (Duro *et al*, 2008; Zaidi *et al*, 2008). Because *rtt101*Δ and *mms22*Δ cells are strongly sensitive to genotoxic agents causing DNA damage during S phase (Luke *et al*, 2006; Collins *et al*,

©2010 European Molecular Biology Organization

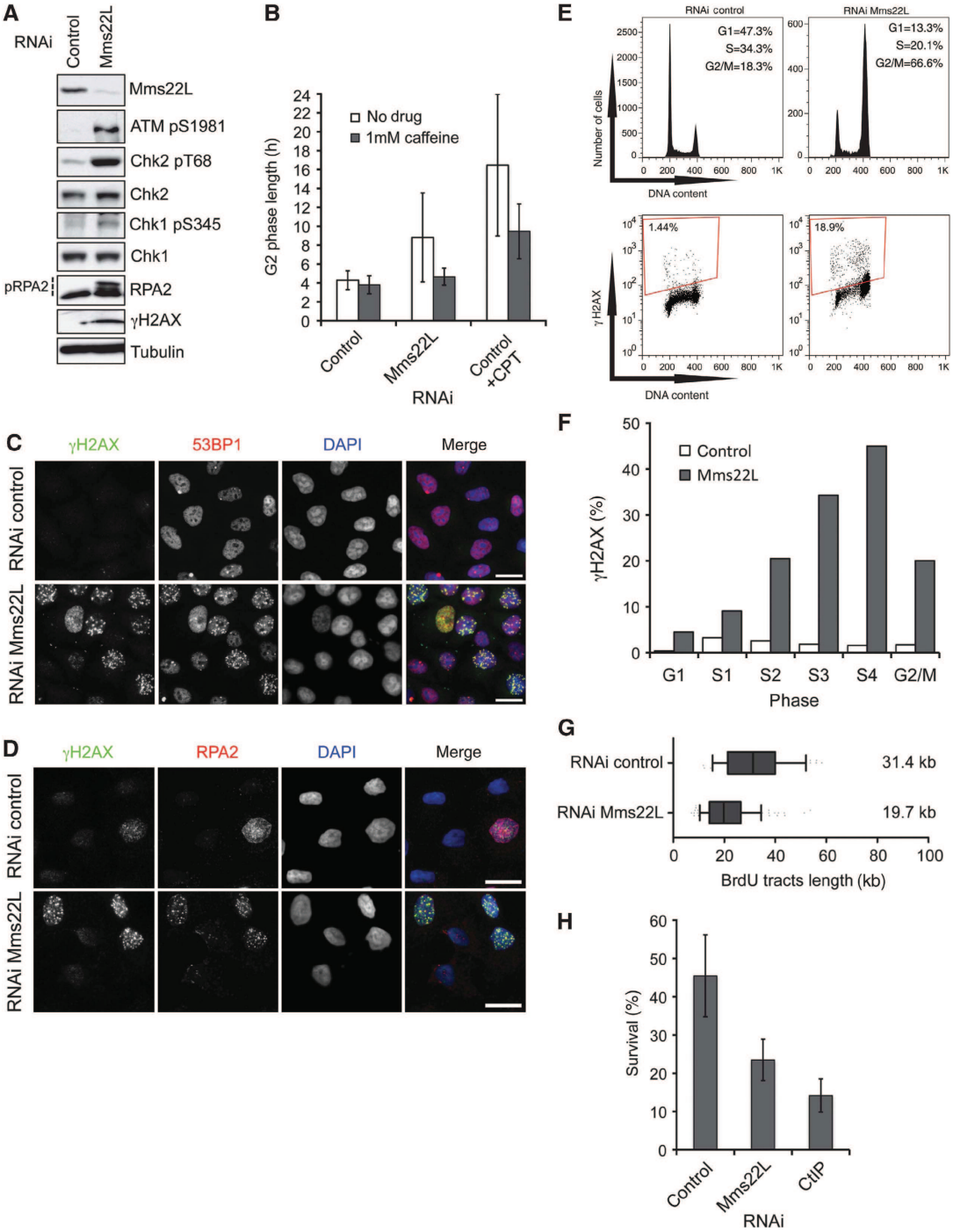


Figure 3 C6orf167/Mms22L is required to maintain genome integrity during the S phase. (**A**) Extracts from HeLa cells treated with control or Mms22L (oligo 1) siRNAs for 72 h were immunoblotted with specific antibodies recognising the indicated markers. pRPA2 marks phosphorylated forms of RPA2; tubulin was included as loading control. (**B**) Control and Mms22L-depleted (pooled oligos 1–3) HeLa cells expressing EGFP-PCNA and H2B-mCherry were imaged for 2 days with a time resolution of 26 min. Cells were either treated (grey bars) or not treated (white bars) with 1 mM caffeine to inhibit ATM/ATR. Where indicated, control cells were treated with 0.02 μM CPT to induce checkpoint activation (last column). G2 duration was determined from at least 25 cells for each condition based on the PCNA and H2B markers as described in Figure 1. (**C**, **D**) Mms22L-depleted (oligo 1) HeLa cells accumulate nuclear γH2AX foci that colocalise with 53BP1 (**C**) and RPA2 (**D**), as visualised by immunofluorescence analysis with specific antibodies. DNA was stained with DAPI; the scale bar represents 20 μm. (**E**, **F**) HeLa cells were treated with control and Mms22L (oligo 1) siRNAs for 72 h, and ethanol-fixed γH2AX-positive cells were quantified by flow cytometry using specific antibodies. Propidium iodide (PI) was used to stain DNA. The average percentage of γH2AX-positive cells is indicated in the gated area (**E**). S phase was divided into four subphases using FlowJo software, and the percentage of γH2AX-positive cells was measured for each cell cycle phase (**F**). (**G**) Single-molecule analysis of DNA replication in Mms22L-depleted U2OS cells. Cells treated with control or Mms22L (pooled oligos 1–3) siRNAs for 72 h were pulse-labelled for 20 min with BrdU. Fibres were stretched by DNA combing and labelled DNA was visualised by specific antibodies against BrdU. The graph shows the distribution and median values of BrdU tract length. Representative images of DNA fibres are shown in Supplementary Figure 4. (**H**) Mms22L downregulation causes CPT hypersensitivity. HeLa cells treated with control siRNA or siRNAs downregulating Mms22L (pooled oligos 1–3) were exposed for 1 h to 1 μM CPT, and the number of surviving colonies was determined after 8–10 days. Cells depleted for the HR-component CtIP were included for positive control. Bars with s.d. represent the percentage (%) of surviving colonies compared with untreated controls averaged from four independent experiments.

 ©2010 European Molecular Biology Organization

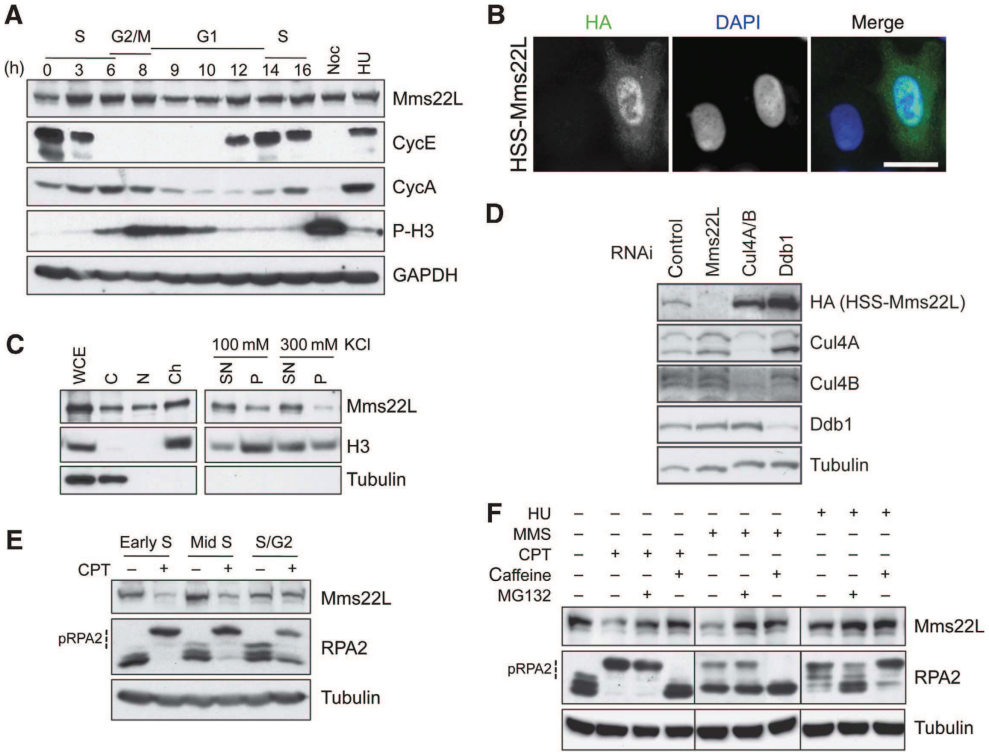


Figure 4 Mms22L levels are regulated throughout the cell cycle and upon DNA damage induced during S phase. (**A**) HeLa cells were synchronised in early S phase using the DTB/R protocol and harvested at the indicated time points after release from the second thymidine block (in hours). Nocodazole (Noc)- or HU-arrested cells were included as controls. Protein extracts were immunoblotted with antibodies against Mms22L and cell cycle markers cyclin E (S phase), cyclin A (S/G2) and phospho-Ser10 H3 (mitosis). GAPDH controls for equal loading. (**B**) The localisation of HSS-Mms22L was analysed after transient transfection by indirect immunofluorescence using anti-HA antibodies. DAPI visualises DNA; scale bar: 20 μm. (**C**) Mms22L is associated with chromatin. HeLa whole-cell extracts (WCE) were fractionated into cytosol (C), nucleoplasm (N) and chromatin (Ch) (left panels). The chromatin fraction was subjected to DNA digestion using micrococcal nuclease, incubated in buffer containing 100 or 300 mM KCl, and separated into soluble (SN) and pellet (P) fractions (right panels). Samples were analysed by immunoblotting with antibodies against Mms22L, the nuclear marker histone H3 and cytoplasmic tubulin. (**D**) HSS-Mms22L is stabilised in Cul4- and Ddb1-depleted cells. HeLa cells stably expressing HSS-Mms22L were RNAi-depleted of Mms22L (oligo 2), Cul4A and Cul4B or Ddb1 for 24 h. Doxycycline was added for an additional 24 h to induce HSS-Mms22L expression, and protein extracts were immunoblotted for the indicated proteins. (**E**, **F**) HeLa cells were synchronised by DTB/R and treated 2, 4 and 5.5 h after release with 1 μM CPT for 3 h. Mms22L levels were analysed by immunoblotting (**E**). HeLa cells synchronised in S phase (3 h after DTB/R) were treated with either 1 μM CPT, 0.05% (v/v) MMS, 2 mM HU, 20 μM MG132 or 5 mM caffeine, and analysed by immunoblotting with the indicated antibodies (**F**). Note that caffeine does not inhibit RPA2 phosphorylation induced by HU treatment, as demonstrated previously (Cortez, 2003).

2007; Zaidi *et al*, 2008), we next measured the clonogenic survival of Mms22L-depleted HeLa cells exposed to topoisomerase I (TopoI) poison camptothecin (CPT). As CPT-induced DSBs at replication forks are mainly repaired by HR-mediated mechanisms, depletion of the HR-promoting gene CtIP was included as a control (Sartori *et al*, 2007). Mms22L was required to protect HeLa cells from CPT treatment, although to a lesser extent than CtIP (Figure 3H). Together, we conclude that Mms22L identifies an evolutionarily conserved pathway required to repair DNA damage during S phase, possibly by promoting replication-associated HR.

Mms22L is degraded upon DNA damage induced during S phase

To characterise the Mms22L protein, we raised polyclonal antibodies against the N-terminal 325 amino acid fragment of Mms22L. Immunoblot analysis detected a single band of ~130 kDa, which was strongly reduced upon depletion of Mms22L by RNAi (Figure 3A). To examine cell cycle expression of endogenous Mms22L, we synchronised HeLa cells in early S phase using a double thymidine block/release (DTB/R) protocol (Sumara *et al*, 2007). Mms22L was expressed throughout S and G2 phase, but its levels were reduced upon entering G1 (Figure 4A), indicating that Mms22L may be regulated in a cell cycle-dependent manner.

To examine the subcellular localisation of Mms22L, we first analysed the localisation of an HA-2xStrep (HSS)-tagged version of Mms22L in transiently transfected HeLa cells. As shown in Figure 4B, HSS-Mms22L was primarily nuclear, and this localisation did not change during the cell cycle or after treatment of cells with CPT (data not shown). Consistent with these results, biochemical fractionation revealed that endogenous Mms22L was enriched in the chromatin fraction, but was solubilised by DNA digestion and high-salt treatment (Figure 4C). Together, these results suggest that a fraction of Mms22L is associated with chromosomes to support genome stability during S phase.

We observed that the levels of HSS-Mms22L strongly increased in cells RNAi-depleted for Cul4A/B or Ddb1 (Figure 4D), suggesting that Mms22L is an unstable protein that is degraded in a Cul4-dependent manner. Therefore, we

©2010 European Molecular Biology Organization

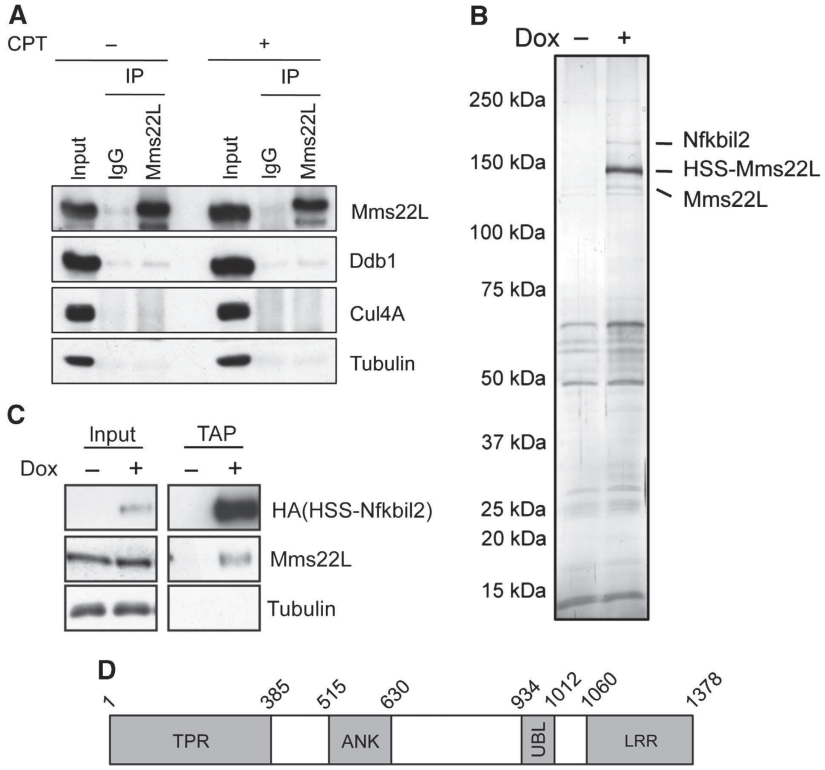


Figure 5 Mms22L stably interacts with the scaffold-like protein Nfkbil2. (**A**) Cul4 and Ddb1 do not co-immunoprecipitate with Mms22L. HeLa cells were treated (+) or not treated (−) with 1 μM CPT for 1 h. Total extracts (input) were immunoprecipitated (IP) with unspecific control IgG (IgG) or anti-Mms22L antibodies, and the presence of Cul4A and Ddb1 was analysed by immunoblotting. (**B**, **C**) HSS-Mms22L co-purifies with endogenous Nfkbil2. HeLa cells stably expressing HSS-Mms22L (**B**) or HSS-Nfkbil2 (**C**) from a doxycycline-inducible promoter were treated for 24 h with (+) or without (−) doxycycline (Dox). The tagged proteins were TAP purified from extracts and associated proteins visualised by silver staining after SDS–PAGE (**B**) or immunoblotting with the indicated antibodies (**C**). The indicated proteins in panel B were identified by mass spectrometry. (**D**) Schematic representation of the domain architecture of Nfkbil2. The following domains were identified; TPR—tetratricopeptide repeat domain, ANK—ankyrin repeat domain, UBL—ubiquitin-like fold, LRR—leucine-rich repeat domain.

tested the stability of endogenous Mms22L in asynchronous and S phase-arrested HeLa cells by CHX chase and found that Mms22L was stable under these conditions (Supplementary Figure 5 and data not shown). However, Mms22L levels were specifically reduced in S phase cells exposed to CPT, and the half-life of Mms22L decreased to ~2 h (Figure 4E and Supplementary Figure 5). A similar reduction was also observed after treating S phase cells with the DNA-methylating agent methyl methanesulphonate (MMS), but not hydroxyurea (HU), which stalls replication forks without inducing DSBs (Figure 4F). Although we were unable to detect ubiquitylated forms of Mms22L, its degradation was dependent on the activity of the ubiquitin-proteasome system (UPS) and DNA damage checkpoint signalling, as it was blocked by addition of the proteasome inhibitor MG132 and caffeine, respectively (Figure 4F and Supplementary Figure 5). Taken together, these results suggest that Mms22L activity upon replication stress is regulated by a Cul4- and ATM/ATR-dependent mechanism.

Mms22L stably interacts with Nfkbil2

Prompted by the homology to yeast Mms22, we first examined whether Mms22L may stably interact with Cul4 and its linker Ddb1. However, we were unable to detect Cul4A or Ddb1 in Mms22L immunoprecipitates, even when the cells were treated with CPT to induce DNA damage (Figure 5A). Similar results were also obtained by immunoprecipitating endogenous Cul4A or FLAG-tagged Mms22L overexpressed in HeLa or U2OS cells after transient transfection (Supplementary Figure 6). Thus, we conclude that, in contrast to yeast, human Mms22L does not stably interact with Cul4 complexes.

To find Mms22L interaction partners, we created a HeLa cell line stably expressing HSS-Mms22L from the tetracycline (Dox)-inducible promoter, and purified associated proteins by tandem-affinity purification (TAP) using streptavidin, followed by anti-HA beads. Eluted proteins were subjected to SDS–PAGE and visualised by silver staining (Figure 5B). In addition to a strong band at the expected molecular weight of HSS-Mms22L, we observed two specific interactors, which we identified by mass spectrometry, as Mms22L and Nfkbil2 (nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor-like 2) (Ray *et al*, 1995). To confirm the Mms22L–Nfkbil2 interaction, we constructed an HSS-tagged version of Nfkbil2 under control of the tetracycline-inducible promoter and stably integrated this construct in HeLa cells. Indeed, TAP purifications demonstrated that endogenous Mms22L was detected in induced but not in non-induced control samples (Figure 5C), demonstrating that these proteins form a stable complex *in vivo*. Bioinformatic analysis of the Nfkbil2 protein revealed several well-defined protein–protein interaction domains including TPR and ANK repeats, as well as an LRR domain at its C-terminus (Figure 5D). Moreover, we detected a

 ©2010 European Molecular Biology Organization

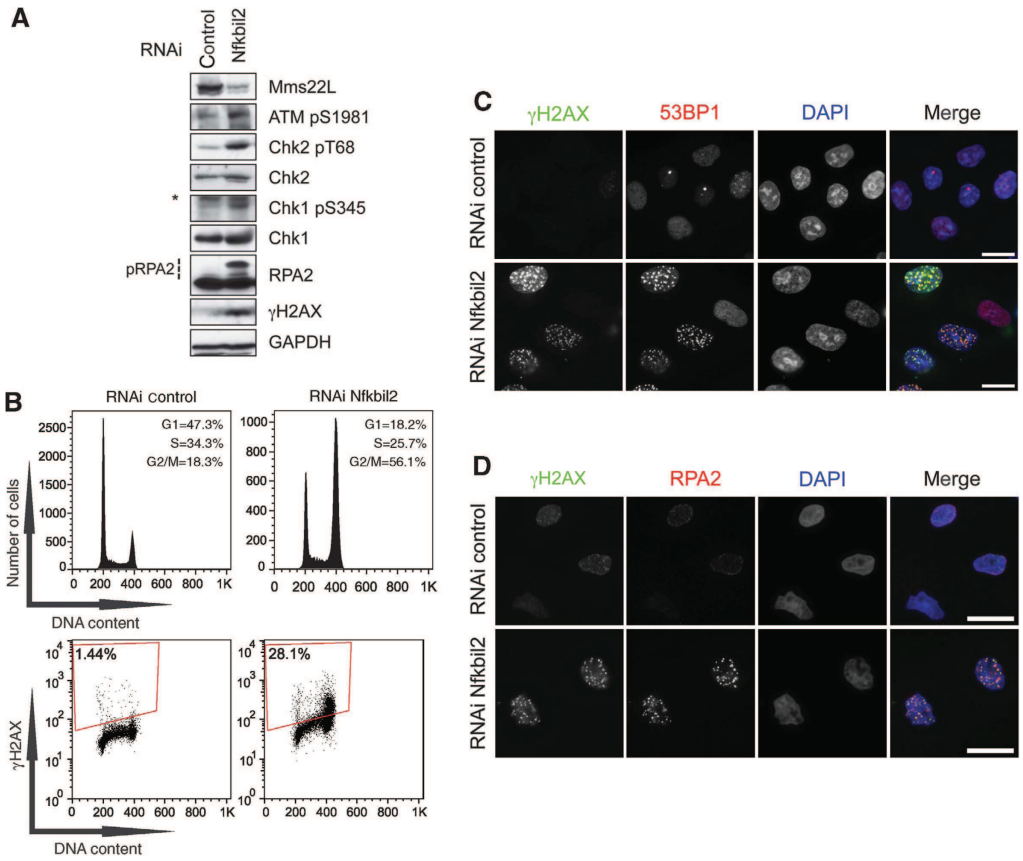


Figure 6 Nfkbil2 is functionally linked to Mms22L. (**A**) Extracts from HeLa cells treated with control or Nfkbil2 (oligo 2) siRNAs for 3 days were analysed by immunoblotting with the indicated antibodies. pRPA2 marks phosphorylated forms of RPA2, while GAPDH controls for equal loading. Nfkbil2 RNAi was confirmed by quantitative RT–PCR (Supplementary Figure 8). Note that Nfkbil2 downregulation leads to reduced levels of Mms22L. The asterisk denotes a cross-reactive band. (**B**) HeLa cells were treated with control or Nfkbil2 (oligo 2) siRNAs for 3 days, and the DNA content and accumulation of DSBs were quantified by flow cytometry after staining with propidium iodide and γH2AX antibodies. The average percentage of γH2AX-positive cells is indicated in the gated area. This experiment was performed in parallel with the one described in 3E, and therefore the same control sample is shown for comparison. (**C**, **D**) HeLa cells were treated with Nfkbil2 (oligo 2) or control siRNAs for 3 days and immunostained with anti-γH2AX, 53BP1 (**C**) and RPA2 (**D**) antibodies. DNA was visualised with DAPI. Scale bar: 20 μm.

conserved stretch with an unique ubiquitin-like (UBL) fold (Supplementary Figure 7). Together, these results demonstrate that Mms22L associates with Nfkbil2, which may function as a scaffolding unit to bridge to multiple protein complexes.

Nfkbil2 is required to maintain genomic stability during S phase

To investigate the functional importance of Nfkbil2, we RNAi-depleted Nfkbil2 from HeLa cells and monitored activation of the DNA damage checkpoint by immunoblot analysis using phospho-specific antibodies against activated checkpoint proteins. Similar to Mms22L, Nfkbil2 depletion resulted in activation of ATM, Chk2 and Chk1, which was accompanied by hyperphosphorylation of RPA2 and γH2AX (Figure 6A and Supplementary Figure 8). Moreover, flow cytometry and indirect immunofluorescence microscopy revealed a strong delay of these cells at the G2/M boundary, which was accompanied by an accumulation of γH2AX foci (Figure 6B, C and D). These γH2AX foci stained positive for 53BP1 and RPA2 (Figure 6C and D, Supplementary Figure 8), implying that cells require Nfkbil2 function to prevent the formation of DSBs during DNA replication. Interestingly, Mms22L levels were strongly decreased in the absence of Nfkbil2 (Figure 6A), indicating that binding of Nfkbil2 stabilises Mms22L *in vivo*. Taken together, these data suggest that Mms22L and Nfkbil2 may function together to maintain genome integrity during DNA replication.

Nfkbil2 links Mms22L function to components involved in DNA replication and repair

To better understand the function of the Mms22L–Nfkbil2 complex, we TAP-purified HSS-Nfkbil2 expressed from the tetracycline-inducible promoter in HeLa cells treated with or without CPT. In addition to Mms22L, silver-stained Nfkbil2 preparations separated by SDS–PAGE revealed multiple interacting proteins (Figure 7A). Mass spectrometry analysis identified several components involved in the regulation of DNA repair and replication, including two subunits of the Ku complex (Ku70/XRCC6 and Ku80/XRCC5), subunits of the replicative helicase (MCM2, 4 and 6), the histone chaperones Asf1A, Asf1B and FACT, as well as histones H1, H2A and H2B (Figure 7B and Supplementary Table 4). Interestingly, some proteins such as Asf1B and the subunits of the FACT complex Spt16 and Ssrp1 were only detected in samples treated with CPT. Immunoblotting with specific antibodies confirmed the

©2010 European Molecular Biology Organization

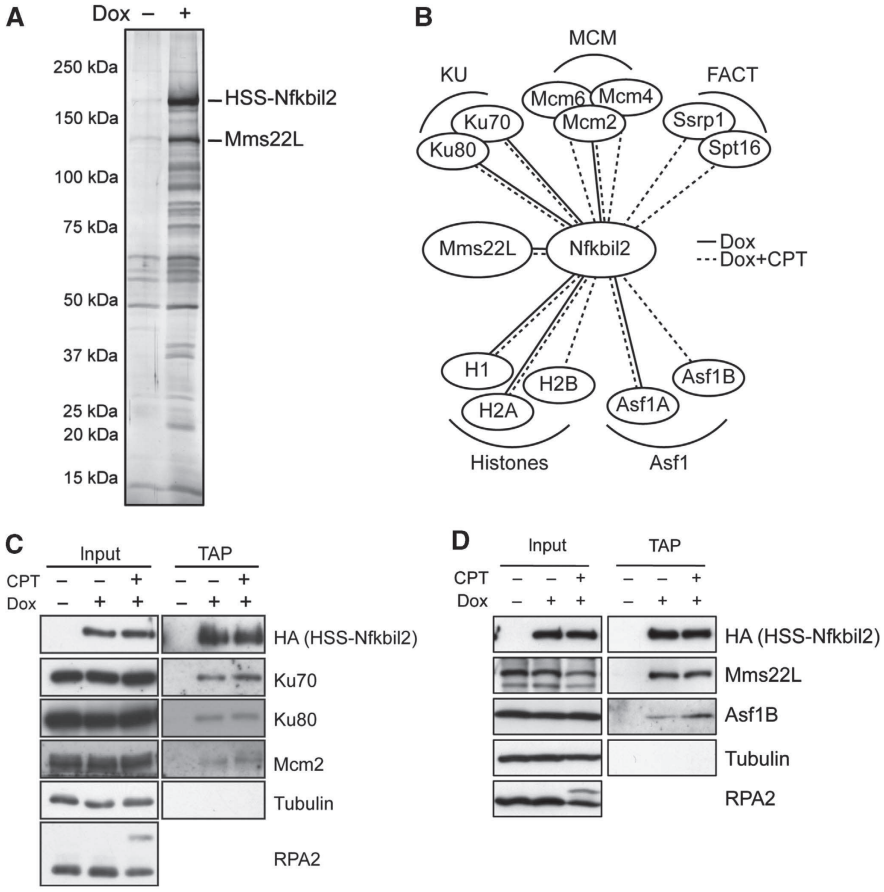


Figure 7 Nfkbil2 links Mms22L function to components involved in DNA replication and repair. TAP purifications from HeLa cells stably expressing HSS-Nfkbil2 induced (+) or not induced (−) with doxycycline (Dox) were visualised by silver staining (**A**). The positions of HSS-Nfkbil2 and endogenous Mms22L are indicated. Where indicated, cells were treated with 1 μM CPT for the last hour before harvesting (+ CPT). Purified proteins were identified by mass spectrometry (**B**, and Supplementary Table 2), and confirmed by immunoblotting with specific antibodies (**C**, **D**).

presence of Ku70 and Ku80 in HSS-Nfkbil2 purifications (Figure 7C) and their abundance was not significantly altered in the presence of CPT. In contrast, binding of Nfkbil2 to Mcm2 and Asf1B was slightly increased under these conditions (Figure 7C and D), indicating that some interactions with Nfkbil2 may indeed be regulated by DNA replication stress. Together, these findings suggest that Nfkbil2 and Mms22L are stably associated core components of a larger repair complex, which may be recruited to stalled replication forks to prevent the formation of DSBs.

Discussion

While the mechanisms and underlying machinery required to duplicate bulk genomic DNA are beginning to emerge, much less is known about how cells replicate through damaged templates or special chromosomal regions. In budding yeast, the Cul4-related Rtt101^{Mms22} complex is required for replication restart after fork collapse and cells accumulate many unreplicated gaps in the absence of this E3 ligase. By RNAi screening and automated phenotypic analysis of live-cell movies from HeLa cells expressing cell cycle markers H2B-mCherry and EGFP-PCNA, we have identified several human Cul4-associated proteins, which are required for faithful progression through G1 and S phase. We also identified and characterised two novel components, Mms22L and its interaction partner Nfkbil2, which function in a conserved pathway required to protect replication forks from collapse during normal S phase.

Multiple Cul4-based complexes regulate progression through G1 and S phase

Cul4 has been implicated in the regulation of cell cycle progression and various DNA transactions and chromatin remodelling (Higa and Zhang, 2007). More than 50 associated DCAFs have been identified, which interact via Ddb1 and are thought to serve as substrate-specific adaptors in Cul4-based ligase complexes (Lee and Zhou, 2007). Several DCAFs have previously been implicated in processes related to DNA replication and repair. For example, Cdt2 regulates degradation of the licensing factor Cdt1, and thereby prevents DNA re-replication (Jin *et al*, 2006). Cdt2 also triggers degradation of the translesion polymerase Polη upon DNA damage in *Caenorhabditis elegans* (Kim and Michael, 2008). Using a high-content RNAi-screening approach, we identified several *bona fide* DCAFs and Cul4-associated proteins inducing significant G1 delays. Among them, the two DCAFs EED and Wdr5 regulate histone methylation and interact with endogenous Cul4B (Higa *et al*, 2006). Likewise, downregulation of the putative oncoprotein WDSOF1 (Chin *et al*, 2007) and Tbl3

 ©2010 European Molecular Biology Organization

associated with polycystic kidney disease (Weinstat-Saslow *et al*, 1993) results in a strong G1 delay (Supplementary Table 2), but their precise functions remain to be explored. Two genes required for G1 progression, *Wdr12* and *Pwp2*, have been linked to ribosome biogenesis (Dosil and Bustelo, 2004; Rohrmoser *et al*, 2007). Wdr12 binds to the nucleolar proteins Bop1 and Pes1, while Pwp2 associates with 35S pre-rRNA, suggesting that the $Cul4^{Wdr12}$ and $Cul4^{Pwp2}$ complexes may ubiquitylate substrates involved in rRNA processing. Interestingly, only seven Cul4-linked genes including four *bona fide* DCAFs exhibit a specific S phase delay with no significant prolongation of G1 or G2. While the underlying defects and molecular mechanisms remain to be investigated, our results demonstrate that distinct Cul4-based E3 ligases regulate multiple processes during G1 and S phase, and provide an important step towards identifying biologically relevant substrates. In addition to *bona fide* DCAFs, we also examined the function of a large set of Cul4-interacting proteins for cell cycle progression. Although it is not clear how these binding partners affect Cul4 activity, our phenotypic analysis may help to link them to specific Cul4-dependent processes.

C6orf167/Mms22L is homologous to yeast Mms22, but may not function as a substrate adaptor in a Cul4 complex

We found that C6orf167/Mms22L exhibits significant sequence and functional similarities to yeast Mms22. Although the overall sequence homology is low and mainly confined to few stretches, evolutionary analysis revealed that many eukaryotic species encode at least one Mms22L (Supplementary Figure 1). In budding yeast, Mms22 supports progression of replication through natural pause sites and damaged DNA in a complex with Rtt101 and Mms1, homologues of human Cul4 and Ddb1 proteins, respectively (Zaidi *et al*, 2008). Yeast Mms22 also binds several replication fork-associated proteins, including Ctf4 and Rtt107, suggesting that it functions at stalled replication forks to promote fork repair and restart functions (Mimura *et al*, 2010). On the basis of interaction studies, we previously proposed that Mms22 might function as a substrate adaptor in the Rtt101/Cul4-based complex, which recognises and ubiquitylates proteins specifically at stalled replication forks. Interestingly, Mms22 is itself ubiquitylated and degraded in an Rtt101-dependent manner (Ben-Aroya *et al*, 2010), suggesting that Mms22 may also be a substrate of the Rtt101 complex. We were unable to detect a stable interaction between Mms22L and Cul4/Ddb1 in HeLa cells, but Mms22L stability was dependent on the presence of Cul4 and Ddb1. In addition, Mms22L was rapidly degraded in S phase cells exposed to DNA-damaging agents inducing DSBs such as CPT and MMS and this instability required the activity of the ATM/ATR checkpoint kinases. Although the function of this damage-induced degradation of Mms22L during S phase is not clear at present, it is tempting to speculate that it is linked to the Mms22L-mediated repair process; for example, removing the repair complex from the DNA template to resume DNA replication.

Mms22L stably interacts with Nfkbil2 to prevent replication fork collapse during S phase

Several lines of evidence suggest that Mms22L and Nfkbil2 function together regulating the integrity of stalled replication forks. First, Mms22L and Nfkbil2 form a stable complex and Mms22L levels are strongly reduced in the absence of Nfkbil2. Second, downregulation of either protein results in specific replication defects leading to a pronounced G2 delay caused by activation of the ATM/ATR checkpoint. Nfkbil2 has previously been implicated in the regulation of NFκB signalling based on its partial homology to inhibitors of NFκB (IκBs) (Ray *et al*, 1995). However, our results strongly suggest that the Mms22L–Nfkbil2 complex is involved in promoting replication fork progression during S phase, most likely by preventing replication fork collapse upon replication stress. Indeed, Mms22L- or Nfkbil2-depleted cells accumulate spontaneous DSBs accompanied by extended ssDNA stretches that may result from increased DNA end resection, a prerequisite for HR-mediated repair. These defects are reminiscent of yeast Mms22, which is required for HR-mediated repair upon replisome stalling, but is not necessary for HR repair of DSBs (Duro *et al*, 2008). Thus, we speculate that, analogous to yeast Mms22, the Mms22L–Nfkbil2 complex may be involved in the recognition and resolution of HR intermediates formed at replication forks stalled at sites that are particularly difficult to replicate, such as replication slow zones or fragile sites.

Interestingly, Nfkbil2 is characterised by the presence of three well-defined protein–protein interaction domains (seven tetratricopeptide repeats in the N-terminus, three central ankyrin repeats and six C-terminal leucine-rich repeats), and a unique type of ubiquitin-like fold (Supplementary Figure 7). Although Nfkbil2 has no obvious homologues in budding yeast, a similar UBL fold is present in Tof2, Net1 and possibly Esc2. All these proteins interact with the histone deacetylase Sir2 and are thought to prevent excessive HR at replication slow zones, in particular at telomeres and rDNA loci (Cuperus and Shore, 2002; Huang *et al*, 2006; Mankouri *et al*, 2009). Esc2 was recently reported to directly interact with the Rtt101–Mms1 complex (Mimura *et al*, 2010), suggesting an intriguing link to replication fork repair mechanisms.

The Mms22L–Nfkbil2 complex may function as a scaffold to assemble the replication fork repair machinery

Consistent with its scaffold-like domain composition, Nfkbil2 interacts with histones H1, H2A and H2B, and with several known chromatin remodelling and DNA replication/repair factors. The association with a subset of these components was slightly enhanced upon replication stress, indicating regulated recruitment to stalled replication forks. Asf1A/B and FACT are evolutionarily conserved histone deposition complexes that alter chromatin composition and thereby facilitate progression of DNA replication forks and enable efficient DNA repair (Ransom *et al*, 2010). The FACT complex promotes binding of DNA repair factors by replacing γH2AX at damaged sites with the canonical H2A variant (Heo *et al*, 2008) and is antagonised by the poly ADP ribose polymerase, PARP1, an enzyme modulating the choice between the NHEJ and HR repair pathways at stalled forks (Saberi *et al*, 2007). Thus, it is possible that the interaction of FACT with the Mms22L–Nfkbil2 complex may influence which DNA repair pathway is used at stalled forks. Consistent with this notion, yeast Mms22 promotes sister chromatid exchange induced by replisome stalling (Duro *et al*, 2008), possibly by regulating

©2010 European Molecular Biology Organization

Rtt101-dependent ubiquitylation of the FACT subunit Spt16 (Han *et al*, 2010). Moreover, Rtt101 is recruited to chromatin by a mechanism that requires the H3-K56 acetyltransferase Rtt109 and the histone chaperone Asf1 (Collins *et al*, 2007; Roberts *et al*, 2008). Human Asf1 has also been linked to H3-K56 acetylation, and this pathway is involved in recovery from replication stress (Yuan *et al*, 2009). Thus, it is tempting to speculate that the Mms22L–Nfkbil2 complex, together with FACT and Asf1, may influence repair pathways by regulating the chromatin state at stalled replication forks.

Surprisingly, we found that Nfkbil2 associates with Ku70 and Ku80, two proteins involved in NHEJ repair. Ku heterodimers bind with high affinity to DSBs and recruit DNA-PK and Ligase4-XRCC4 to ligate the termini without or with minimal homology. Although NHEJ operates preferentially during G1, both NHEJ and HR pathways have been implicated in repair of replication-dependent DNA damage in human cells (Arnaudeau *et al*, 2001; Lundin *et al*, 2002). Consistent with this notion, both Ku proteins are abundant nuclear proteins (Downs and Jackson, 2004), and DNA-PK is activated by DSBs occurring specifically during S phase (Chen *et al*, 2005). Thus, the HR and NHEJ machineries may cooperate in processing DSBs during S phase and the Mms22L–Nfkbil2 complex may interact with the Ku heterodimer to regulate specific types of repair at stalled forks. Ku proteins might also work independently of the catalytic components of NHEJ to cap DSB ends at collapsed forks and thereby prevent their promiscuous resection. Further studies are now required to demonstrate the functional importance of the interaction of Ku proteins with the Nfkbil2–Mms22L complex during replication stress.

Materials and methods

Cell culture

HeLa and U2OS cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS, PAA), 0.2 mM L-glutamine and standard antibiotics. Thymidine block and release experiments (DTB/R) were performed as described previously (Sumara *et al*, 2007). The FRT-TetR-HeLa cell line for creating stable cell lines using the Flp-In System (Invitrogen) was kindly provided by S Taylor (University of Manchester), and maintained as described (Tighe *et al*, 2008). The HSS-tagged Mms22L and Nfkbil2 cell lines were generated as described (Glatter *et al*, 2009). HeLa cells stably co-expressing H2B-mCherry and EGFP-PCNA were cultured in DMEM with 10% FBS containing 0.5 mg/ml G418 and 0.5 μg/ml puromycin (Held *et al*, 2010). For overexpression, DNA plasmid transfections were performed with Lipofectamine 2000 (Invitrogen) or JetPEI (PolyPlus) following the manufacturer's instructions. For RNAi experiments, HeLa or U2OS cells were transfected with 50 nM siRNAs using Lipofectamine RNAiMAX (Invitrogen) for 48 or 72 h. Downregulation of the targets was confirmed by immunoblotting with specific antibodies or quantitative RT–PCR. The sequences of all siRNA oligos used in this study are listed in Supplementary data.

For clonogenic survival assays, HeLa cells were split 2 days after RNAi and seeded into six-well dishes in triplicate (500 cells/well). After 24 h, 1 μM CPT was added for 1 h, washed 3 × with DMEM and incubated for 8–10 days. Colonies were counted after staining cells with 0.25% crystal violet in 80% methanol.

RNAi screening using automated live-cell microscopy

The siRNA oligos used in the screen are listed in Supplementary Table 2. RNAi screening was performed as described (Schmitz *et al*, 2010), with minor adjustments. Briefly, siRNA duplexes (20 nM final concentration) from Qiagen were reverse transfected with RNAiMAX (Invitrogen) in 96-well microscopy plates (μClear, Greiner). After 21 h, cells were washed three times with full media containing phenol red- and riboflavin-free DMEM (Invitrogen) and maintained therein. Automated microscopy was started 25 h after RNAi and continued for 47 h in an incubation chamber on a MD ImageXpress Micro screening microscope equipped with a 10 × 0.5 N.A. S Fluor dry objective (Nikon), controlled by Metamorph. Image analysis was performed using CellCognition software (Held *et al*, 2010). Briefly, cell nuclei and mitotic chromosome masses were detected in the RFP channel, and texture and shape features were calculated for each of these objects in the RFP- and GFP channels. Examples for each class were manually annotated for supervised classification, and the trained classifier then applied for the whole data set. Cells were tracked over time and mitotic events were detected on the basis of the transition from pro- to prometaphase, pro- to metaphase or prometaphase to metaphase. For analysing G1 and S phase, trajectories of ~19 h after mitosis were extracted; for G2 phase, trajectories of around 17 h before mitosis were used. After hidden Markov model-based error correction with a completely free transition model, the duration of the individual cell cycle phases for each cell was measured on the basis of the time between entry into and exit from the specific phase. For scoring hits, the median and the median average deviation for all negative controls were measured and a *z*-score was calculated for each siRNA on the basis of at least 15 independent measurements (Boutros *et al*, 2006).

Immunofluorescence microscopy, flow cytometry and DNA combing

Cultured cells grown on coverslips were fixed either with 4% paraformaldehyde (PFA, in PBS) for 10 min at room temperature (anti-RPA2 staining) or with methanol for 20 min at −20°C (anti-53BP1 and anti-HA stainings). For anti-RPA2 staining, cells were permeabilised for 5 min with 300 mM sucrose, 3 mM $MgCl_2$, 1 mM EDTA, 50 mM NaCl, 25 mM HEPES (pH 7.5), 0.5% Triton X-100 before PFA fixation. Samples were incubated for 1 h with antibodies diluted in PBS containing 0.01% Triton X-100 and 5% FBS. Secondary antibodies were labelled with Alexa fluor 488 or 568 (Invitrogen). Next, 1 μg/ml DAPI was added to visualise DNA. Samples were mounted using Immu-Mount (Thermo) and images were captured on a Leica DM6000B epifluorescence microscope.

For flow cytometry, cells were stained for DNA and γH2AX levels, as described previously (Olma *et al*, 2009). Samples were analysed with a FACSCalibur flow cytometer (BD Biosciences) using CellQuest and FlowJo software. DNA combing was performed as described previously (Tuduri *et al*, 2009), with minor modifications as described in Supplementary data.

Extract preparation and chromatin fractionation

Extracts from cultured cells were prepared in extraction buffer (20 mM Tris–HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 0.2% Nonidet P-40, 20 mM β-glycerophosphate, 10% glycerol, 1 mM NaF, 0.5 mM DTT and complete protease inhibitor cocktail; Roche) by passing the cell suspension through a 27G needle. For chromatin fractionation, 2×10^8 cells were suspended in 1 ml hypotonic buffer (10 mM Tris–HCl (pH 7.5), 10 mM KCl, 1.5 mM $MgCl_2$, 10 mM β-mercaptoethanol and 0.2 mM PMSF) and disrupted by Dounce homogenisation. Cytosol and nuclei were separated by centrifugation at 2000 *g* for 15 min at 4°C. Nuclei were resuspended in 1 ml extraction buffer (15 mM Tris–HCl (pH 7.5), 400 mM NaCl, 1 mM $MgCl_2$, 10% glycerol, 1 mM EDTA, 10 mM β-mercaptoethanol and 0.2 mM PMSF). After incubating on ice for 30 min, the samples were centrifuged at 20 000 *g* for 30 min at 4°C and the supernatants were used as nuclear fraction. The chromatin pellet was washed and resuspended in digestion buffer (20 mM Tris–HCl (pH 7.5), 100 mM KCl, 2 mM $MgCl_2$, 1 mM $CaCl_2$, 0.3 M sucrose, 0.1% Triton X-100 and complete protease inhibitor cocktail; Roche), and incubated for 1 h at 4°C with 2 U/ml of micrococcal nuclease. The reaction was terminated with 5 mM EGTA/EDTA, and the KCl concentration was adjusted to 300 mM in one-half of the sample. After 1 h at 4°C, the samples were centrifuged for 10 min at 8000 *g* and the supernatant used as solubilised chromatin fraction.

DNA and RNA manipulations, immunoblotting and immunoprecipitation experiments

Standard protocols were used for DNA and RNA manipulations as described in Supplementary data. For immunoblotting, proteins were resolved by SDS–PAGE and transferred to PVDF immobilon-P membrane (Millipore). Blocking and antibody incubations were carried out in 5% low-fat milk (Migros) in TBS-T (150 mM NaCl,

 ©2010 European Molecular Biology Organization

20 mM Tris (pH 8.0) and 0.1% Tween-20), and washings in TBS-T. Blots were developed using Immun-Star™ HRP (Biorad). For immunoprecipitation experiments, 1 μg of affinity-purified antibodies per 200 μg extracts was incubated for 1 h at 4°C and precipitated using Affiprep protein A beads (Biorad) for 1 h at 4°C. The beads were washed four times with extraction buffer, bound proteins eluted with sample buffer at 95°C and analysed by immunoblotting. All antibodies used in this study are described in Supplementary data.

TAP purifications and mass spectrometry analysis

TAP purifications were essentially carried out as described (Wyler *et al*, 2010). Briefly, expression of the bait protein in HeLa cells was induced by 1 μg/ml doxycyclin 24 h before harvesting by scratching. Cells were lysed using 27G needles in TAP buffer (10 mM Tris (pH 7.5), 100 mM KCl, 2 mM MgCl2, 0.5% NP40, 300 mM sucrose, 10 mM β-glycerophosphate, 0.2 mM Na_3VO_4, 1 mM ATP and complete protease inhibitors; Roche) containing 0.5 mM DTT. Extracts were cleared by centrifugation for 15 min at 5400 *g* and incubated with pre-equilibrated StrepTactin beads (IBA, 50 μl per 15 cm dish) for 30 min on an overhead shaker. Beads were washed four times with TAP buffer and proteins eluted with 3 × 300 μl TAP buffer containing 10 mM Biotin (Sigma). Eluates were incubated with pre-equilibrated anti-HA beads (Sigma; 12.5 μl beads per 15 cm dish) for 1 h. For analysis on SDS–PAGE, beads were washed four times with TAP buffer, once with TAP buffer without KCl and eluted with Laemmli buffer without DTT. After elution, DTT was added to 20 mM final concentration. Mass spectrometry analysis was performed as described in Supplementary data.

Supplementary data

Supplementary data are available at *The EMBO Journal* Online (http://www.embojournal.org).

Acknowledgements

We thank D Durocher, W Harper and J Rouse for communicating unpublished results; S Taylor, M Gstaiger, U Kutay and E Wyler for providing cell lines and plasmids; T Roberts for critical reading of the manuscript; and members of the Peter lab for helpful discussions. We are indebted to G Csucs and N Graf for advice on imaging issues and data storage, and the D-BIOL RNAi screening facility LMC/RISC. This work was supported by Oncosuisse, the Swiss National Science Foundation (SNF) and the ETH Zürich. The work was supported in part by a grant from the Scottish Government to the Scottish Institute for Cell Signaling.

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

References

Abbas T, Sivaprasad U, Terai K, Amador V, Pagano M, Dutta A (2008) PCNA-dependent regulation of p21 ubiquitylation and degradation via the CRL4Cdt2 ubiquitin ligase complex. *Genes Dev* **22:** 2496–2506

Anantha RW, Vassin VM, Borowiec JA (2007) Sequential and synergistic modification of human RPA stimulates chromosomal DNA repair. *J Biol Chem* **282:** 35910–35923

Arnaudeau C, Lundin C, Helleday T (2001) DNA double-strand breaks associated with replication forks are predominantly repaired by homologous recombination involving an exchange mechanism in mammalian cells. *J Mol Biol* **307:** 1235–1245

Ben-Aroya S, Agmon N, Yuen K, Kwok T, McManus K, Kupiec M, Hieter P (2010) Proteasome nuclear activity affects chromosome stability by controlling the turnover of Mms22, a protein important for DNA repair. *PLoS Genet* **6:** e1000852

Binz SK, Sheehan AM, Wold MS (2004) Replication protein A phosphorylation and the cellular response to DNA damage. *DNA Repair (Amst)* **3:** 1015–1024

Boutros M, Bras LP, Huber W (2006) Analysis of cell-based RNAi screens. *Genome Biol* **7:** R66

Branzei D, Foiani M (2008) Regulation of DNA repair throughout the cell cycle. *Nat Rev Mol Cell Biol* **9:** 297–308

Chen BP, Chan DW, Kobayashi J, Burma S, Asaithamby A, Morotomi-Yano K, Botvinick E, Qin J, Chen DJ (2005) Cell cycle dependence of DNA-dependent protein kinase phosphorylation in response to DNA double strand breaks. *J Biol Chem* **280:** 14709–14715

Chin SF, Teschendorff AE, Marioni JC, Wang Y, Barbosa-Morais NL, Thorne NP, Costa JL, Pinder SE, van de Wiel MA, Green AR, Ellis IO, Porter PL, Tavare S, Brenton JD, Ylstra B, Caldas C (2007) High-resolution aCGH and expression profiling identifies a novel genomic subtype of ER negative breast cancer. *Genome Biol* **8:** R215

Cimprich KA, Cortez D (2008) ATR: an essential regulator of genome integrity. *Nat Rev Mol Cell Biol* **9:** 616–627

Collins SR, Miller KM, Maas NL, Roguev A, Fillingham J, Chu CS, Schuldiner M, Gebbia M, Recht J, Shales M, Ding H, Xu H, Han J, Ingvarsdottir K, Cheng B, Andrews B, Boone C, Berger SL, Hieter P, Zhang Z *et al* (2007) Functional dissection of protein complexes involved in yeast chromosome biology using a genetic interaction map. *Nature* **446:** 806–810

Cortez D (2003) Caffeine inhibits checkpoint responses without inhibiting the ataxia-telangiectasia-mutated (ATM) and ATM- and Rad3-related (ATR) protein kinases. *J Biol Chem* **278:** 37139–37145

Cuperus G, Shore D (2002) Restoration of silencing in Saccharomyces cerevisiae by tethering of a novel Sir2-interacting protein, Esc8. *Genetics* **162:** 633–645

Dosil M, Bustelo XR (2004) Functional characterization of Pwp2, a WD family protein essential for the assembly of the 90 S pre-ribosomal particle. *J Biol Chem* **279:** 37385–37397

Downs JA, Jackson SP (2004) A means to a DNA end: the many roles of Ku. *Nat Rev Mol Cell Biol* **5:** 367–378

Duro E, Vaisica JA, Brown GW, Rouse J (2008) Budding yeast Mms22 and Mms1 regulate homologous recombination induced by replisome blockage. *DNA Repair (Amst)* **7:** 811–818

Fousteri M, Vermeulen W, van Zeeland AA, Mullenders LH (2006) Cockayne syndrome A and B proteins differentially regulate recruitment of chromatin remodeling and repair factors to stalled RNA polymerase II *in vivo*. *Mol Cell* **23:** 471–482

Glatter T, Wepf A, Aebersold R, Gstaiger M (2009) An integrated workflow for charting the human interaction proteome: insights into the PP2A system. *Mol Syst Biol* **5:** 237

Han J, Li Q, McCullough L, Kettelkamp C, Formosa T, Zhang Z (2010) Ubiquitylation of FACT by the cullin-E3 ligase Rtt101 connects FACT to DNA replication. *Genes Dev* **24:** 1485–1490

Held M, Schmitz MH, Fischer B, Walter T, Neumann B, Olma MH, Peter M, Ellenberg J, Gerlich DW (2010) CellCognition: time-resolved phenotype annotation in high-throughput live cell imaging. *Nat Methods* **7:** 747–754

Heo K, Kim H, Choi SH, Choi J, Kim K, Gu J, Lieber MR, Yang AS, An W (2008) FACT-mediated exchange of histone variant H2AX regulated by phosphorylation of H2AX and ADP-ribosylation of Spt16. *Mol Cell* **30:** 86–97

Higa LA, Wu M, Ye T, Kobayashi R, Sun H, Zhang H (2006) CUL4-DDB1 ubiquitin ligase interacts with multiple WD40-repeat proteins and regulates histone methylation. *Nat Cell Biol* **8:** 1277–1283

Higa LA, Zhang H (2007) Stealing the spotlight: CUL4-DDB1 ubiquitin ligase docks WD40-repeat proteins to destroy. *Cell Div* **2:** 5

Huang J, Brito IL, Villen J, Gygi SP, Amon A, Moazed D (2006) Inhibition of homologous recombination by a cohesin-associated clamp complex recruited to the rDNA recombination enhancer. *Genes Dev* **20:** 2887–2901

Jin J, Arias EE, Chen J, Harper JW, Walter JC (2006) A family of diverse Cul4-Ddb1-interacting proteins includes Cdt2, which is required for S phase destruction of the replication factor Cdt1. *Mol Cell* **23:** 709–721

Kapetanaki MG, Guerrero-Santoro J, Bisi DC, Hsieh CL, Rapic-Otrin V, Levine AS (2006) The DDB1-CUL4ADDB2 ubiquitin ligase is deficient in xeroderma pigmentosum group E and targets histone H2A at UV-damaged DNA sites. *Proc Natl Acad Sci USA* **103:** 2588–2593

Kim SH, Michael WM (2008) Regulated proteolysis of DNA polymerase eta during the DNA-damage response in C. elegans. *Mol Cell* **32:** 757–766

©2010 European Molecular Biology Organization

Kim Y, Kipreos ET (2007) Cdt1 degradation to prevent DNA re-replication: conserved and non-conserved pathways. *Cell Div* **2:** 18

Lee J, Zhou P (2007) DCAFs, the missing link of the CUL4-DDB1 ubiquitin ligase. *Mol Cell* **26:** 775–780

Lovejoy CA, Lock K, Yenamandra A, Cortez D (2006) DDB1 maintains genome integrity through regulation of Cdt1. *Mol Cell Biol* **26:** 7977–7990

Luke B, Versini G, Jaquenoud M, Zaidi IW, Kurz T, Pintard L, Pasero P, Peter M (2006) The cullin Rtt101p promotes replication fork progression through damaged DNA and natural pause sites. *Curr Biol* **16:** 786–792

Lundin C, Erixon K, Arnaudeau C, Schultz N, Jenssen D, Meuth M, Helleday T (2002) Different roles for nonhomologous end joining and homologous recombination following replication arrest in mammalian cells. *Mol Cell Biol* **22:** 5869–5878

Mankouri HW, Ngo HP, Hickson ID (2009) Esc2 and Sgs1 act in functionally distinct branches of the homologous recombination repair pathway in Saccharomyces cerevisiae. *Mol Biol Cell* **20:** 1683–1694

Mimura S, Yamaguchi T, Ishii S, Noro E, Katsura T, Obuse C, Kamura T (2010) Cul8/Rtt101 forms a variety of protein complexes that regulate DNA damage response and transcriptional silencing. *J Biol Chem* **285:** 9858–9867

Olma MH, Roy M, Le Bihan T, Sumara I, Maerki S, Larsen B, Quadroni M, Peter M, Tyers M, Pintard L (2009) An interaction network of the mammalian COP9 signalosome identifies Dda1 as a core subunit of multiple Cul4-based E3 ligases. *J Cell Sci* **122:** 1035–1044

Pintard L, Willems A, Peter M (2004) Cullin-based ubiquitin ligases: Cul3-BTB complexes join the family. *Embo J* **23:** 1681–1687

Ransom M, Dennehey BK, Tyler JK (2010) Chaperoning histones during DNA replication and repair. *Cell* **140:** 183–195

Ray P, Zhang DH, Elias JA, Ray A (1995) Cloning of a differentially expressed I kappa B-related protein. *J Biol Chem* **270:** 10680–10685

Roberts TM, Zaidi IW, Vaisica JA, Peter M, Brown GW (2008) Regulation of rtt107 recruitment to stalled DNA replication forks by the cullin rtt101 and the rtt109 acetyltransferase. *Mol Biol Cell* **19:** 171–180

Rohrmoser M, Holzel M, Grimm T, Malamoussi A, Harasim T, Orban M, Pfisterer I, Gruber-Eber A, Kremmer E, Eick D (2007) Interdependence of Pes1, Bop1, and WDR12 controls nucleolar localization and assembly of the PeBoW complex required for maturation of the 60S ribosomal subunit. *Mol Cell Biol* **27:** 3682–3694

Saberi A, Hochegger H, Szuts D, Lan L, Yasui A, Sale JE, Taniguchi Y, Murakawa Y, Zeng W, Yokomori K, Helleday T, Teraoka H, Arakawa H, Buerstedde JM, Takeda S (2007) RAD18 and poly(ADP-ribose) polymerase independently suppress the access of nonhomologous end joining to double-strand breaks and facilitate homologous recombination-mediated repair. *Mol Cell Biol* **27:** 2562–2571

Sartori AA, Lukas C, Coates J, Mistrik M, Fu S, Bartek J, Baer R, Lukas J, Jackson SP (2007) Human CtIP promotes DNA end resection. *Nature* **450:** 509–514

Schmitz MH, Held M, Janssens V, Hutchins JR, Hudecz O, Ivanova E, Goris J, Trinkle-Mulcahy L, Lamond AI, Poser I, Hyman AA, Mechtler K, Peters JM, Gerlich DW (2010) Live-cell imaging RNAi screen identifies PP2A-B55alpha and importin-beta1 as key mitotic exit regulators in human cells. *Nat Cell Biol* **12:** 886–893

Schultz LB, Chehab NH, Malikzay A, Halazonetis TD (2000) p53 binding protein 1 (53BP1) is an early participant in the cellular response to DNA double-strand breaks. *J Cell Biol* **151:** 1381–1390

Shiloh Y (2003) ATM and related protein kinases: safeguarding genome integrity. *Nat Rev Cancer* **3:** 155–168

Sonoda E, Sasaki MS, Buerstedde JM, Bezzubova O, Shinohara A, Ogawa H, Takata M, Yamaguchi-Iwai Y, Takeda S (1998) Rad51-deficient vertebrate cells accumulate chromosomal breaks prior to cell death. *EMBO J* **17:** 598–608

Sugasawa K, Okuda Y, Saijo M, Nishi R, Matsuda N, Chu G, Mori T, Iwai S, Tanaka K, Hanaoka F (2005) UV-induced ubiquitylation of XPC protein mediated by UV-DDB-ubiquitin ligase complex. *Cell* **121:** 387–400

Sumara I, Quadroni M, Frei C, Olma MH, Sumara G, Ricci R, Peter M (2007) A Cul3-based E3 ligase removes Aurora B from mitotic chromosomes, regulating mitotic progression and completion of cytokinesis in human cells. *Dev Cell* **12:** 887–900

Sutterluty H, Chatelain E, Marti A, Wirbelauer C, Senften M, Muller U, Krek W (1999) p45SKP2 promotes p27Kip1 degradation and induces S phase in quiescent cells. *Nat Cell Biol* **1:** 207–214

Tighe A, Staples O, Taylor S (2008) Mps1 kinase activity restrains anaphase during an unperturbed mitosis and targets Mad2 to kinetochores. *J Cell Biol* **181:** 893–901

Tourriere H, Pasero P (2007) Maintenance of fork integrity at damaged DNA and natural pause sites. *DNA Repair (Amst)* **6:** 900–913

Tuduri S, Crabbe L, Conti C, Tourriere H, Holtgreve-Grez H, Jauch A, Pantesco V, De Vos J, Thomas A, Theillet C, Pommier Y, Tazi J, Coquelle A, Pasero P (2009) Topoisomerase I suppresses genomic instability by preventing interference between replication and transcription. *Nat Cell Biol* **11:** 1315–1324

Wang B, Matsuoka S, Carpenter PB, Elledge SJ (2002) 53BP1, a mediator of the DNA damage checkpoint. *Science* **298:** 1435–1438

Wang H, Zhai L, Xu J, Joo HY, Jackson S, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Xiong Y, Zhang Y (2006) Histone H3 and H4 ubiquitylation by the CUL4-DDB-ROC1 ubiquitin ligase facilitates cellular response to DNA damage. *Mol Cell* **22:** 383–394

Weinstat-Saslow DL, Germino GG, Somlo S, Reeders ST (1993) A transducin-like gene maps to the autosomal dominant polycystic kidney disease gene region. *Genomics* **18:** 709–711

Wyler E, Zimmermann M, Widmann B, Gstaiger M, Pfannstiel J, Kutay U, Zemp I (2010) Tandem affinity purification combined with inducible shRNA expression as a tool to study the maturation of macromolecular assemblies. *RNA* (doi:10.1261/rna.2325911)

Yuan J, Pu M, Zhang Z, Lou Z (2009) Histone H3-K56 acetylation is important for genomic stability in mammals. *Cell Cycle* **8:** 1747–1753

Zaidi IW, Rabut G, Poveda A, Scheel H, Malmstrom J, Ulrich H, Hofmann K, Pasero P, Peter M, Luke B (2008) Rtt101 and Mms1 in budding yeast form a CUL4(DDB1)-like ubiquitin ligase that promotes replication through damaged DNA. *EMBO Rep* **9:** 1034–1040

 ©2010 European Molecular Biology Organization

Article II : Régulation de la RH au niveau des fourches de réplication et des DSB par la branche MRC1 du checkpoint de phase S chez S. Cerevisiae.

J'ai effectué mon stage de deuxième année de Master Biologie Santé dans le laboratoire de P. Pasero. J'ai travaillé avec d'une étudiante en thèse C. Alabert afin de comprendre les interactions entre la recombinaison homologue (HR) et le checkpoint de phase S chez la levure *S. cerevisiae.* Il a été montré que la HR est indispensable au redémarrage des fourches chez *E. coli* (Michel et al. 2007). Mais le rôle de la HR dans la réplication est moins bien connu chez les eucaryotes. Chez la levure, les mutants de gènes impliqués dans la recombinaison homologue sont hypersensibles au stress réplicatif, suggérant que la RH joue un rôle majeur dans le redémarrage des fourches (Chang et al. 2002). Mais d'un autre coté la formation de foyers de RH est inhibée par le checkpoint de réplication (Lisby et al. 2004; Meister et al. 2005). Tout d'abord ce travail nous a permis, en mesurant la RH grâce à la formation de foyers RAD52 par Immunofluorescence, de confirmer que l'inhibition du checkpoint entrainait une augmentation des foyers de RH. Nous avons ensuite pu mettre en évidence que l'induction de cassures doubles brins (DSB) par la Zéocine induisait l'apparition de foyers de RH en phase S dans des cellules sauvages alors que le blocage des fourches de réplication avec de l'HU n'entraine pas de formation de ces foyers. Nous avons ensuite observé que l'activation du checkpoint de réplication supprimait les foyers RAD52 formés par la présence de DSB, et ce en inhibant spécifiquement l'étape de résection.

Nous avons donc proposé que d'inhiber spécifiquement l'étape de résection de la RH permet en cas de stress réplicatif d'inhiber spécifiquement la RH au niveau de cassures double brin, qui pourrait être potentiellement toxique tout en permettant la recombinaison entre chromatides sœur au niveau des fourches de réplication ou cette résection est inutile car l'ADN simple brin est déjà présent.

The EMBO Journal (2009) 28, 1131–1141 | © 2009 European Molecular Biology Organization | All Rights Reserved 0261-4189/09
www.embojournal.org

THE
EMBO
JOURNAL

Differential regulation of homologous recombination at DNA breaks and replication forks by the Mrc1 branch of the S-phase checkpoint

Constance Alabert, Julien N Bianco and Philippe Pasero*

Department of Genome Dynamics, Institute of Human Genetics, CNRS UPR 1142, Montpellier, France

The Rad52 pathway has a central function in the recombinational repair of chromosome breaks and in the recovery from replication stress. Tolerance to replication stress also depends on the Mec1 kinase, which activates the DNA replication checkpoint in an Mrc1-dependent manner in response to fork arrest. Although the Mec1 and Rad52 pathways are initiated by the same single-strand DNA (ssDNA) intermediate, their interplay at stalled forks remains largely unexplored. Here, we show that the replication checkpoint suppresses the formation of Rad52 foci in an Mrc1-dependent manner and prevents homologous recombination (HR) at chromosome breaks induced by the HO endonuclease. This repression operates at least in part by impeding resection of DNA ends, which is essential to generate 3′ ssDNA tails, the primary substrate of HR. Interestingly, we also observed that the Mec1 pathway does not prevent recombination at stalled forks, presumably because they already contain ssDNA. Taken together, these data indicate that the DNA replication checkpoint suppresses genomic instability in S phase by blocking recombination at chromosome breaks and permitting helpful recombination at stalled forks.

The EMBO Journal (2009) **28,** 1131–1141. doi:10.1038/emboj.2009.75; Published online 26 March 2009
Subject Categories: genome stability & dynamics
Keywords: checkpoints; DNA replication; genomic instability; homologous recombination; *S. cerevisiae*

Introduction

The genome of eukaryotic cells is particularly vulnerable during the S phase of the cell cycle, when replication forks encounter DNA lesions or natural obstacles such as tightly bound protein complexes and highly expressed genes. Stalled forks are unstable structures that can induce chromosomal rearrangements if they are not properly processed and restarted (Labib and Hodgson, 2007; Tourriere and Pasero, 2007). Arrested forks are detected by a surveillance pathway called the intra-S checkpoint, which coordinate fork repair mechanisms and arrest cell cycle progression (Branzei and Foiani, 2008). In budding yeast, this checkpoint response is initiated with the recruitment of the checkpoint kinase Mec1 onto RPA-coated single-strand DNA (ssDNA) in a Ddc2-dependent manner (Rouse and Jackson, 2002). Phosphorylation of the checkpoint mediator Mrc1 by Mec1 promotes the hyperactivation of the effector kinase Rad53 (Alcasabas *et al*, 2001; Osborn and Elledge, 2003). Mec1 and Rad53 execute multiple functions, the most important being the maintenance of arrested forks (Lopes *et al*, 2001; Tercero *et al*, 2003). To this end, checkpoint kinases regulate the activity and/or the association of several fork components, including RPA (Brush *et al*, 1996), DNA polymerases (Pellicioli *et al*, 1999; Cobb *et al*, 2003), MCMs (Cobb *et al*, 2005) and Exo1 (Cotta-Ramusino *et al*, 2005; Segurado and Diffley, 2008). These modifications prevent the collapse of arrested forks and the formation of abnormal replication intermediates, including double-strand breaks (DSBs).

DSBs can be repaired by different pathways, the most important being homologous recombination (HR) and non-homologous end joining (NHEJ). Although NHEJ operates throughout the cell cycle, HR is restricted to S and G_2/M phases. Recombination is initiated at DSBs with the nucleolytic degradation of DNA ends to generate 3′-ended ssDNA. This resection process depends on the coordinated action of Mre11, Exo1, Sgs1 and Sae2 (Paques and Haber, 1999; Krogh and Symington, 2004; Llorente and Symington, 2004; Clerici *et al*, 2005; Mimitou and Symington, 2008; Zhu *et al*, 2008) and requires high cyclin-dependent kinase (CDK) activity (Aylon *et al*, 2004; Ira *et al*, 2004; Huertas *et al*, 2008; Zierhut and Diffley, 2008). Homology search and DNA-strand exchange is catalysed by the assembly of Rad51–ssDNA nucleoprotein filaments on RPA-coated ssDNA, a process that is mediated by Rad52 and by the Rad55–57 heterodimer. Strand invasion, promoted by the dsDNA translocase Rad54, leads to the synthesis of the DNA sequence disrupted at the DSB (San Filippo *et al*, 2008).

Recombination-related processes have a central function in the recovery of stalled or collapsed replication forks. Broken forks can be repaired by a single-ended invasion recombination mechanism called break-induced replication (Wang *et al*, 2004; Llorente *et al*, 2008). Arrested forks can also be restarted by recombinational repair, a process that has been extensively studied in *Escherichia coli* (Michel *et al*, 2007). However, the importance of recombination-mediated fork restart mechanisms remains to be established in eukaryotic cells. Indeed, unlike bacteria, eukaryotic genomes contain a large excess of replication origins, which can be used to compensate for stalled forks (Ge *et al*, 2007; Ibarra *et al*, 2008). Moreover, although cells mutated for members of the *RAD52* epistasis group are hypersensitive to replication inhibitors (Chang *et al*, 2002; Lundin *et al*, 2005), it has been difficult to determine whether this pathway is necessary for

*Corresponding author. Department of Genome Dynamics, Institute of Human Genetics, CNRS UPR 1142, 141 rue de la Cardonille, 34396 Montpellier cedex 5, France. Tel.: +33 499 61 9943; Fax: +33 499 61 9901; E-mail: ppasero@igh.cnrs.fr

Received: 17 September 2008; accepted: 4 March 2009; published online: 26 March 2009

©2009 European Molecular Biology Organization

the recovery of stalled forks in S phase or for the repair of residual replication-dependent DSBs in G_2.

Homologous recombination must be tightly regulated to prevent genomic instability in S phase. Central to this regulation are specialized DNA helicases such as Srs2, Mph1 and Sgs1, which modulate different steps of the HR process (Gangloff *et al*, 2000; Krejci *et al*, 2003; Veaute *et al*, 2003; Branzei and Foiani, 2007; Prakash *et al*, 2009). Some of these mechanisms depend on the ubiquitinylation and/or sumoylation of PCNA (Pfander *et al*, 2005; Branzei *et al*, 2006; Davies *et al*, 2008). The DNA replication checkpoint has also been implicated in the regulation of HR. However, it is not clear whether the Mec1 pathway has a positive or a negative role in this process. Thus, recent reports indicate that Mec1 promotes HR in budding yeast by phosphorylating recombination proteins such as Rad55 and Slx4 in response to MMS (Bashkirov *et al*, 2000; Herzberg *et al*, 2006; Flott *et al*, 2007). Similarly, ATR and Chk1 activate HR in mammalian cells by phosphorylating Rad51, Nbs1 and FANCD2 (Sorensen *et al*, 2005; Branzei and Foiani, 2008). In contrast, the checkpoint kinase Cds1 prevents the activity of Mus81 and Rad60 at stalled forks in fission yeast (Boddy *et al*, 2003; Kai *et al*, 2005; Raffa *et al*, 2006). Moreover, live cell imaging studies in budding and fission yeast indicate that Rad52–GFP recombination foci are absent from wild-type cells exposed to hydroxyurea (HU), but accumulate in checkpoint-deficient cells (Lisby *et al*, 2004; Meister *et al*, 2005). These data suggest that HR foci are actively suppressed by the replication checkpoint. Alternatively, recombination foci could be absent from wild-type cells because checkpoint-proficient cells do not accumulate recombinogenic substrates in HU.

To help clarify the effect of the replication checkpoint on recombinational repair during S phase, we have monitored how *Saccharomyces cerevisiae* cells respond to genotoxic agents that generate different types of replication stress. HU is an inhibitor of ribonucleotide reductase that slows down fork progression by reducing dNTP pools (Koc *et al*, 2004; Alvino *et al*, 2007). Methyl methanesulphonate (MMS) induces a stable fork arrest by methylating DNA on N^7-deoxyguanine and N^3-deoxyadenine (Vázquez *et al*, 2008). Importantly, both HU and MMS elicit a robust replication checkpoint response but do not generate DSBs in checkpoint-proficient cells (Lundin *et al*, 2005; Tourriere and Pasero, 2007). In contrast, the topoisomerase I inhibitor camptothecin (CPT) induces checkpoint-blind lesions that are not detected by the replication checkpoint but generate DSBs upon passage of the fork (Redon *et al*, 2003). Finally, the radiomimetic agent Zeocin induces chromosome breaks independently of DNA replication. Using different combinations of these drugs, we show here that both the formation of recombination foci and the recombinational repair of DSBs are actively repressed by drugs that activate the DNA replication checkpoint—such as HU and MMS—but not by CPT. Moreover, we provide direct evidence that recombination occurs during S phase to promote the recovery of stalled forks, regardless of checkpoint activity. Finally, we show that HU and MMS impede the resection of DNA ends in an Mrc1-dependent manner. As ssDNA is already present at stalled forks, we propose that inhibition of resection under replication stress prevents toxic recombination events in S phase without interfering with helpful recombination at stalled replication forks.

Results and discussion

HR foci assemble in cells exposed to Zeocin or CPT, but not to HU or MMS

To monitor the cellular response to different types of genotoxic insults, we first examined the ability of *S. cerevisiae* cells to assemble Rad52 subnuclear foci at Zeocin-induced DSBs. Haploid cells carrying a GFP-tagged version of Rad52 (Lisby *et al*, 2001) were arrested in G_1 with α-factor and were exposed or not to Zeocin. Cells were then either released into S phase or maintained in G_1 for the indicated period of time (Figure 1A). The percentage of cells presenting HR foci was determined microscopically. As reported earlier (Lisby *et al*, 2001, 2004), we measured a 5- to 10-fold increase of spontaneous Rad52 foci upon entry into S phase (Figure 1B), which form at chromosome breaks occurring during normal DNA replication. After Zeocin treatment, we observed a further five-fold increase of Rad52 foci in S-phase cells (Figure 1B). However, Zeocin did not induce Rad52 foci in G_1-arrested cells, which is consistent with the fact that high CDK activity is required for the resection of DNA ends and the formation of RPA-coated ssDNA, the substrate recognized by Rad52 (Lisby *et al*, 2001; Aylon *et al*, 2004; Ira *et al*, 2004).

Next, we investigated whether genotoxic drugs that affect replication fork progression such as HU, MMS and CPT are also able to induce Rad52 foci in S phase. CPT blocks the Top1–DNA cleavable complex and generates nicks that are converted into DSBs upon passage of the replication fork (Pommier, 2006). As expected, we found that CPT induces the formation of Rad52 foci to a level comparable to Zeocin (Figure 1C). In contrast, the fraction of cells presenting Rad52 foci after HU or MMS exposure was even lower than in untreated cells (Figure 1C). The lack of Rad52 foci could reflect the fact that HU- and MMS-treated cells are arrested too early in S phase to be competent for HR. To address this possibility, we monitored the ability of cells arrested at the *CDC7* execution point to assemble HR foci at DSBs induced by Zeocin. The Cdc7 kinase is essential for the activation of replication origins and *cdc7*-4 mutants accumulate at the G_1/S transition at 37°C with an unreplicated genome and elevated CDK activity (Bousset and Diffley, 1998). Interestingly, we found that *cdc7*-4 cells are equally able to form Rad52 foci when arrested at the G_1/S transition or released into S phase in the presence of Zeocin (Figure 1D and E). Taken together, these data indicate that exit from G_1, but neither the initiation of DNA replication nor the presence of homologous sequences, is required to form recombination foci at Zeocin-induced DSBs.

HU and MMS prevent the formation of HR foci at DSBs induced by Zeocin

Our data indicate that CPT induces Rad52 foci in S phase, but HU or MMS do not (Figure 1C). This difference could be due to the fact that unlike CPT, HU and MMS do not generate DSBs in checkpoint-proficient cells (Sogo *et al*, 2002; Lundin *et al*, 2005). To test this hypothesis, we induced DSBs with Zeocin prior to the addition of HU, MMS or CPT and we monitored cells' ability to assemble Rad52 foci. As shown in Figure 2A, addition of CPT did not prevent HR foci assembly in cells previously exposed to Zeocin. In contrast, formation of Rad52 foci at Zeocin-induced breaks was strongly suppressed by HU or MMS. As HU and MMS, but not CPT, elicit a

 ©2009 European Molecular Biology Organization

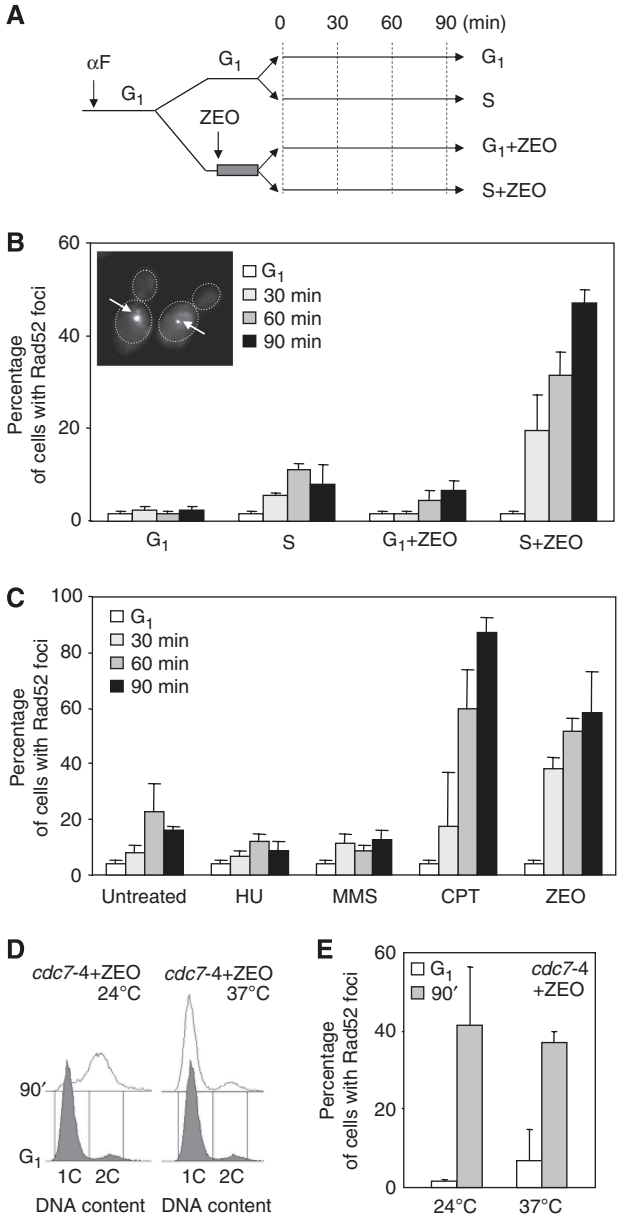


Figure 1 Genotoxic agents differentially affect the formation of Rad52 foci in S phase. (**A**) Overview of the assay. Wild-type cells (PP534) expressing Rad52–GFP were arrested in G_1 with α-factor for 120 min. Half of the culture was exposed to the radiomimetic agent Zeocin (ZEO) for 30 min to generate DSBs. Cells treated with or without Zeocin were either maintained in G_1 or released into S phase for the indicated time. (**B**) The percentage of G_1- and S-phase cells forming spontaneous and Zeocin-induced Rad52 foci was scored as described in Materials and Methods. Representative images of cells showing Rad52–GFP foci are shown. (**C**) Percentage of wild-type cells forming Rad52 foci in response to genotoxic drugs. Rad52–GFP cells were arrested in G_1 and were released into S phase in the absence of drugs (untreated) or in the presence of 200 mM hydroxyurea (HU), 0.033% methyl methanesulphonate (MMS), 20 μM camptothecin (CPT) or 100 μg/ml Zeocin (ZEO). The fraction of cells showing Rad52–GFP foci was determined for the indicated time after release from α-factor. (**D**, **E**) Cells arrested at the G_1/S transition are competent to form Rad52 foci. Thermosensitive *cdc7*-4 cells (PP544) expressing Rad52–GFP were arrested in G_1 with α-factor for 120 min and exposed to 100 μg/ml Zeocin for 30 min in the presence of α-factor. Cells were then released into S phase at the permissive (24°C) or restrictive (37°C) temperature for the *cdc7*-4 mutation and the percentage of cells forming Rad52 foci was scored 90 min after release from G_1. Flow cytometry analysis indicates that although *cdc7*-4 cells are blocked at the G_1/S transition (D), they are able to assemble Rad52 foci (E).

robust activation of the replication checkpoint (Redon *et al*, 2003), these data suggest that the DNA replication checkpoint prevents the formation of Rad52 foci at DSBs.

Next, we investigated whether HU treatment is sufficient to induce a disassembly of preformed Rad52 foci. G_1-arrested cells were exposed to Zeocin and were released into S phase as described above. HU was either added to the culture immediately after release from G_1 or was added 50 or 90 min later (Figure 2B). Cells were harvested 130 min after release and the fraction of cells presenting Rad52–GFP foci was determined. As shown above, addition of HU immediately after release from G_1 suppressed the formation of HR foci and induced a two-fold reduction of cell viability (Supplementary Figure 1A). However, Rad52 foci were not affected when HU was added 50 min later (Figure 2C). To verify that HU is able to block S-phase progression when added 50 min after release from G_1, we monitored the electrophoretic mobility of chromosomes by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) (Figure 2D). The fact that this mobility was still altered reflects the persistence of unreplicated chromosomes. We therefore conclude that replication fork arrest prevents the formation of HR foci but does not affect their maintenance once formed.

HU inhibits DNA replication by depleting dNTP pools. As dNTPs are also required for HR, we checked whether HU suppresses Rad52 foci by blocking fork progression or by altering dNTP pools. To this end, we generated DSBs with Zeocin in cells arrested at the G_1/S transition with the *cdc7*-4 mutation and we measured the capacity of HU treatment to prevent Rad52 foci formation in the absence of DNA replication. Under these conditions, Rad52 foci formed even in the presence of HU, indicating that HU-arrested forks—and not HU itself—inhibit recombination foci (Figure 2E).

HU- and MMS-arrested forks prevent the repair of HO-induced DSBs

As MMS and HU prevent the formation of Rad52 foci, we next investigated whether these drugs also inhibit HR at DSBs. A unique DSB was generated at the *MAT* locus with the HO endonuclease and the ability of HU- or MMS-treated cells to repair this break was monitored by Southern blot hybridization after *Sty*I digestion (Sugawara and Haber, 2006). Cleavage of MATa with a galactose-inducible HO generates a small HO-cut fragment (C) that is further converted into a larger repair product (R) by gene conversion using the *HML*α locus as a template (Figure 3A). In untreated or CPT-treated cells, this gene conversion product was detected 2–3 h after HO induction (Figure 3B and C). In contrast, gene conversion was strongly delayed in HU-exposed cells and was completely suppressed after MMS treatment (Figure 3B and C). This repression was further confirmed by semiquantitative PCR analysis of the gene conversion product (Supplementary Figure 2). These data indicate that MMS and HU prevent both the formation of Rad52 foci and the recombinational repair of chromosome breaks.

HU and MMS impede resection at HO-induced DSBs

Homologous recombination is initiated with the resection of DNA ends to generate a 3′ ssDNA overhang. To check whether this process is affected by genotoxic drugs, a non-reparable HO cut was induced at the MATa locus of donorless cells (Figure 4A) and the 3′–5′ resection of DSB ends was

©2009 European Molecular Biology Organization

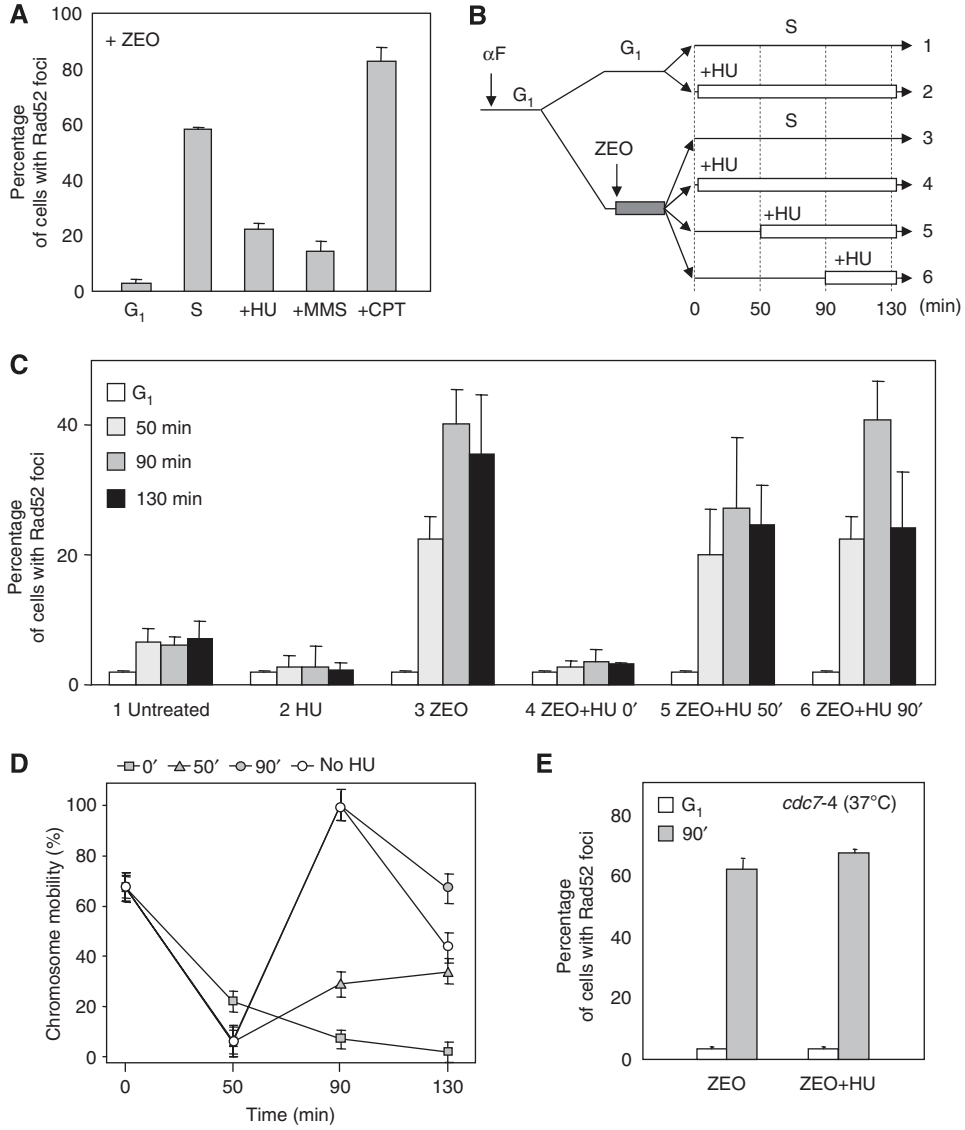


Figure 2 HU and MMS prevent the assembly of Rad52 foci at DSBs. (**A**) Wild-type cells (PP534) expressing Rad52–GFP were arrested in G_1, exposed to Zeocin as described in Figure 1 and released into S phase for 90 min in fresh medium containing no drug (S), 200 mM HU, 0.033% MMS or 20 μM CPT. The fraction of cells showing Rad52 foci was scored. (**B**) Wild-type cells expressing Rad52–GFP were arrested in G_1 for 120 min and cells were maintained in G_1 for another 30 min in the presence or absence of 100 μg/ml Zeocin (grey box). Cells were then released into S phase and HU was added to the culture at the indicated time (white boxes). (**C**) Percentage of cells presenting Rad52–GFP foci. (**D**) PFGE analysis of chromosome mobility in Zeocin-treated cells exposed to HU at the indicated time points after release from G_1. Averaged values for a representative set of chromosomes are shown. (**E**) *cdc7*-4 mutants (PP544) were arrested in G_1 for 120 min at 24°C and exposed to 100 μg/ml Zeocin for another 60 min at 24°C. Cells were then released into S phase for 90 min in the presence (ZEO + HU) or the absence (ZEO) of 200 mM hydroxyurea. The percentage of cells presenting Rad52 foci is shown.

monitored on Southern blot hybridization (Ira *et al*, 2004). During the resection process, the intensity of the cut fragment (Figure 4B, fragment C) and of adjacent *Sty*I fragments (Figure 4B, fragments 2 and 3) diminishes as *Sty*I restriction sites are inactivated (Figure 4B; Exp.). To determine whether resection activity varies during the cell cycle and whether it is affected by replication stress, cells were arrested in G_1 with α-factor and were released in the presence of nocodazole or HU to arrest cells in G_2 or in S phase, respectively (Figure 4D). As shown earlier (Ira *et al*, 2004), we observed an efficient resection of the HO DSB in exponentially growing and G_2-arrested cells, but not in cells blocked in G_1 (Figure 4B and C). We also observed a strong inhibition of resection in cells exposed to HU (Figure 4B and C) and to MMS, but not in cells treated with CPT (Figure 4E; Supplementary Figure 3). These data are consistent with the fact that HU and MMS exposure prevent DSB repair in S phase (Figures 2 and 3), presumably by impeding the formation of 3′ssDNA tails.

Mrc1-dependent inhibition of resection in response to replication stress

Activation of Rad53, the effector kinase of the Mec1 pathway, depends on two mediator proteins called Rad9 and Mrc1 (Alcasabas *et al*, 2001; Gilbert *et al*, 2001). Although Rad9 functions as a general mediator of the DNA damage response, Mrc1 is active only at stalled replication forks (Tourriere and Pasero, 2007). To determine which branch of the intra-S-phase checkpoint is implicated in the regulation of HR, we next monitored Rad52 foci formation in *mrc1*Δ and *rad9*Δ cells. Wild-type and mutant cells were arrested in G_1 with

 ©2009 European Molecular Biology Organization

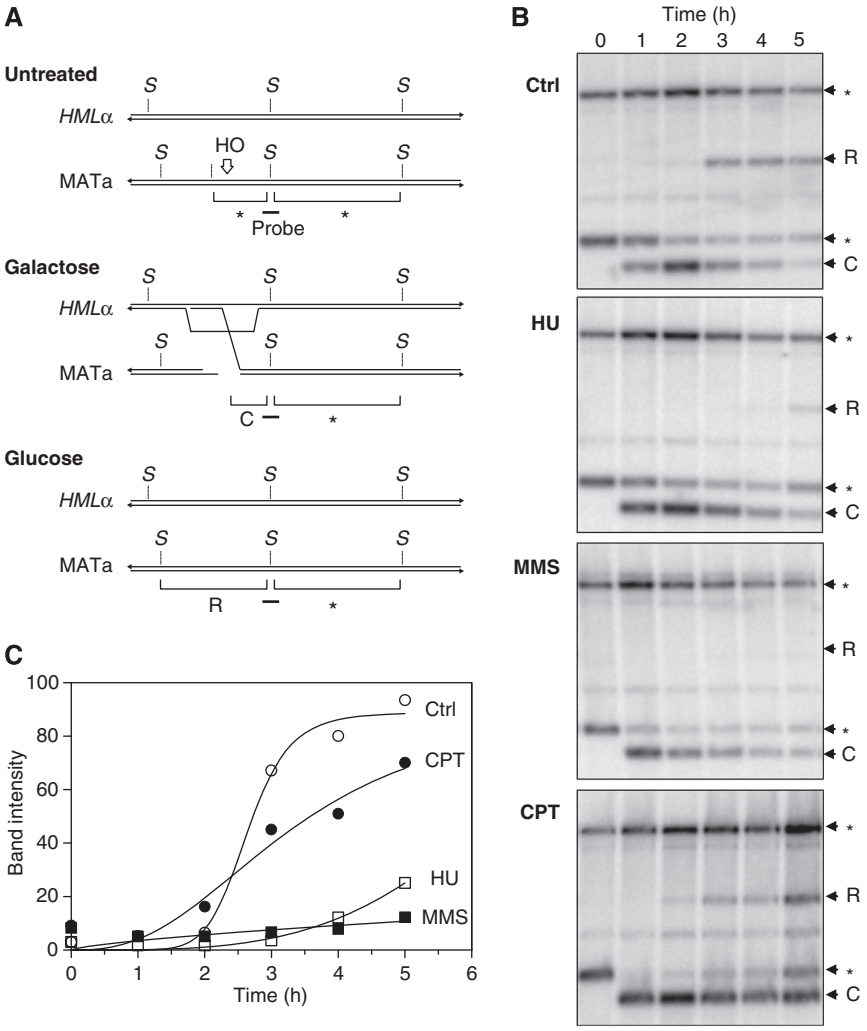


Figure 3 Cells exposed to HU or MMS are unable to repair HO-induced DSBs. (**A**) Overview of the assay. Early log-phase cultures of wild-type cells (PP723) bearing a GAL-HO construct were exposed to 200 mM HU for 4 h, 0.033% MMS for 2 h or 20 μM CPT for 3 h prior to HO induction (see Supplementary Figure 1B for DNA content profiles). Expression of the HO endonuclease was induced for 60 min with 2% galactose and repressed with 2% glucose. Genomic DNA was extracted at the indicated time points and was digested with *Sty*I (S). The smallest of the two *Sty*I fragments (*) generates fragment C (cut) upon cleavage with HO. Homologous recombination with *HMLα* generates fragment R (repair). (**B**) Southern blot analysis of DSB repair in untreated cells (ctrl) or in cells exposed to HU, MMS or CPT. (**C**) Relative intensity of the repair band in untreated control cells and in cells exposed to HU, MMS and CPT.

α-factor and treated with Zeocin, as described in Figure 2A. Cells were then released into S phase in the presence or absence of HU and their ability to form Rad52 foci was scored. In wild-type cells and in *rad9*Δ mutants, we observed a sharp induction of Rad52 foci that was largely reduced upon addition of HU (Figure 5A). In contrast, *mrc1*Δ cells were unable to repress the formation of HR foci in response to HU (Figure 5A) and to MMS (Figure 5B), indicating that the assembly of Rad52 foci is primarily repressed by the Mrc1-dependent branch of the Mec1 pathway.

It has recently been reported that Mrc1 has a structural function at replication forks that is distinct from its checkpoint function (Szyjka *et al*, 2005; Tourriere *et al*, 2005). To determine which function of Mrc1 is important to regulate HR, we analysed Rad52 foci formation in the separation-of-function allele $mrc1^{AQ}$, which is only defective for the checkpoint function of Mrc1 (Osborn and Elledge, 2003; Szyjka *et al*, 2005). Surprisingly, Rad52 foci were still repressed in HU-treated $mrc1^{AQ}$ mutants (Figure 5A), indicating either that Mrc1 prevents HR independently of its checkpoint function or that the replication checkpoint is still partially active in $mrc1^{AQ}$ cells. We favour the second hypothesis as we observed that $mrc1^{AQ}$ cells still repress a significant fraction of their late replication origins, including *ARS1212* and *ARS1413* (CA, unpublished results). As Rad9 is partially able to compensate for the checkpoint defect of *mrc1*Δ mutants (Alcasabas *et al*, 2001), we monitored the assembly of Rad52–GFP foci in $mrc1^{AQ}$ *rad9*Δ double mutants. We observed a derepression of HR foci formation in HU comparable to *mrc1*Δ mutants (Figure 5A). We therefore conclude that the checkpoint function of Mrc1 is required to prevent the formation of Rad52 foci in response to replication stress, this function being complemented by Rad9 in $mrc1^{AQ}$ cells.

Next, we checked whether Mrc1 is also implicated in the HU-dependent repression of resection. Wild-type and *mrc1*Δ cells were exposed to HU and resection was monitored at the *MAT*α locus after induction of HO, as described in Figure 4 (see Supplementary Figure 4A for a map of *Sty*I fragments at the *MAT*α locus). Interestingly, we found that the HU- and

©2009 European Molecular Biology Organization

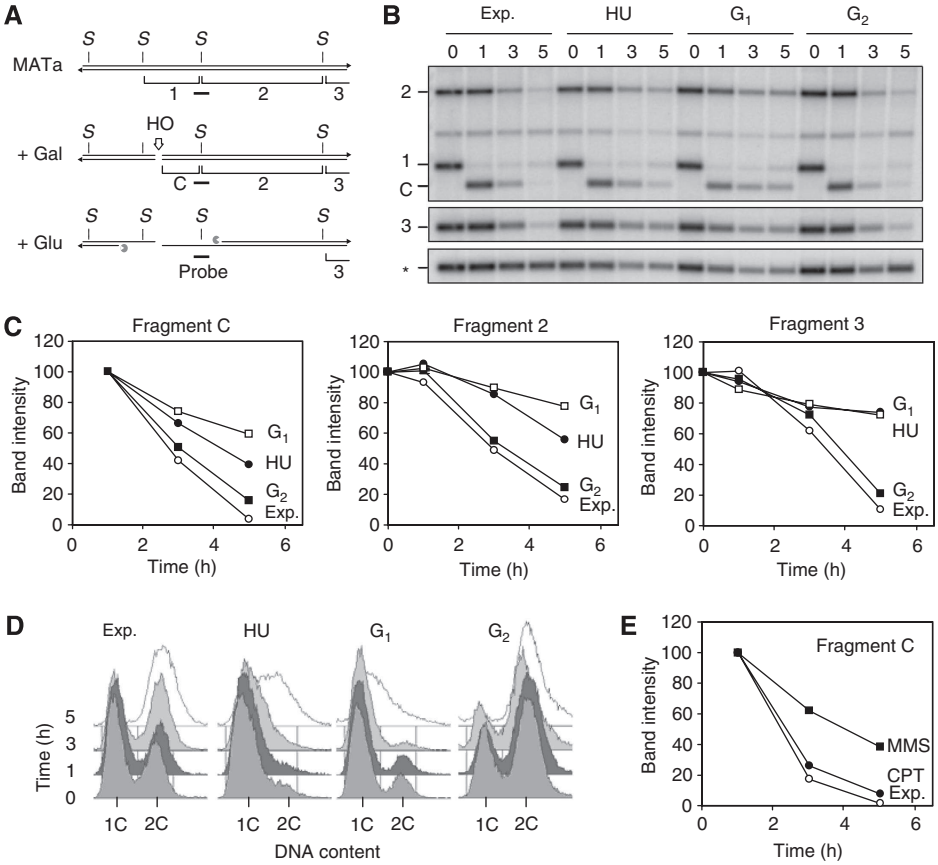


Figure 4 HU and MMS impede resection of HO-induced DSB. (**A–C**) Exponentially growing (Exp.) wild-type cells (PP1123) bearing a GAL-HO construct were arrested in G_1 with α-factor, in G_2 with 15 μg/ml nocodazole or in S phase with 200 mM HU. HO expression was induced as described above and the resection of HO-induced DSB at the MATa locus was monitored by Southern blot hybridization. The rate of disappearance of the HO-cut band (fragment C) and of adjacent *Sty*I fragments (2 and 3) was expressed for each time point as a percentage of the intensity of the initial band. The intensity of resection bands was normalized to the intensity of the *RAD9* gene (*). (**D**) Flow cytometry analysis of DNA content in exponentially growing cells and in cells arrested in G_1, G_2 or with HU. (**E**) Southern blot analysis of the resection rate of HO-induced DSB in the presence of 0.033% MMS or 20 μM CPT.

MMS-dependent inhibition of DSB resection was strongly reduced in *mrc1*Δ mutants, to a level comparable to CPT-treated cells (Figure 5C–E). Taken together, these data indicate that the DNA replication checkpoint prevents HR under replication stress by impeding the formation of 3′ ssDNA overhangs at DSBs.

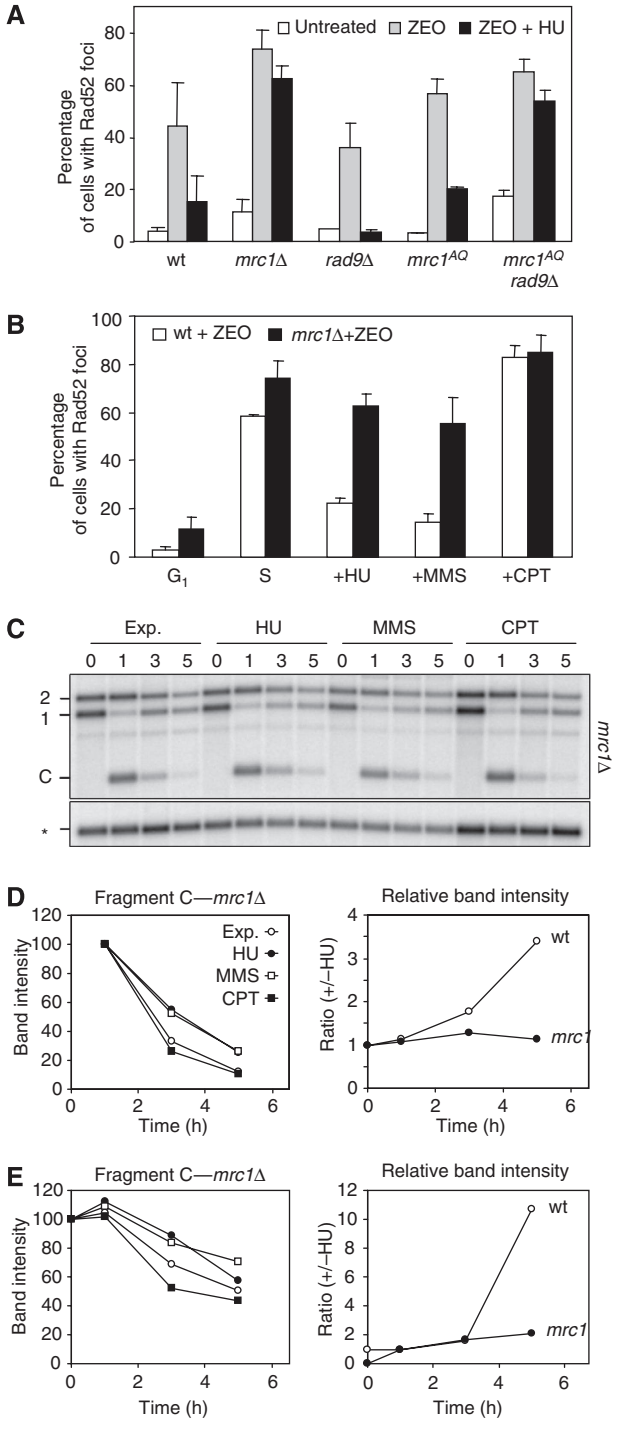
Rad51 is required for the recovery of stalled replication forks

Our observation that HR is suppressed under replication stress is in apparent contradiction to the fact that mutants of the Rad52 pathway are exquisitely sensitive to agents inducing fork arrest (Chang *et al*, 2002). It has been proposed that HR is repressed at stalled forks in checkpoint-proficient cells but is still required to repair residual DSBs after the completion of S phase. Alternatively, the Rad52 pathway could have a function at stalled forks that is distinct from DSB repair and that is not repressed by the replication checkpoint. The view that recombination is active at stalled forks under replication stress is supported by a recent report showing that replication forks progress at a very slow rate in MMS-treated *rad52*Δ cells (Vázquez *et al*, 2008). To test whether recombination is essential to complete S phase after MMS exposure, DNA replication was monitored in *rad51*Δ cells using a variety of assays, including PFGE, 2D gel electrophoresis and DNA combing. Wild-type and *rad51*Δ cells were arrested in G_1 and released synchronously into S phase in the presence of BrdU and MMS. Cells were then released from MMS, and DNA samples were processed as described earlier (Luke *et al*, 2006; Zaidi *et al*, 2008). As shown in Figure 6A, chromosomes do not migrate into the PFGE gel after release from G_1 due to the presence of replication intermediates but complete replication in wild-type cells ∼90 min after removal of the drug. In *rad51*Δ cells, chromosomes failed to reenter the gel even 130 min after release (Figure 6A and B), indicating that Rad51 is essential to complete DNA replication after MMS exposure.

To confirm that the altered electrophoretic mobility of chromosomes in *rad51*Δ cells reflects the persistence of stalled forks, we followed the kinetics of fork recovery at the level of individual molecules by DNA combing. DNA fibres were stretched on silanised coverslips, and BrdU-labelled sites were visualized by immunofluorescence (Figure 6C). The percentage of replication was determined for each individual DNA fibre and the number of unreplicated gaps was scored. This analysis confirmed that *rad51*Δ cells are unable to complete S phase after MMS treatment because of the persistence of unreplicated gaps (Figure 6D). After 130 min, ∼40 gaps per haploid genome were detected in *rad51*Δ cells, which is sufficient to explain the

 ©2009 European Molecular Biology Organization

altered electrophoretic mobility of these chromosomes. Using 2D gel electrophoresis, we confirmed the presence of Rad51-dependent recombination intermediates in MMS-treated cells (Figure 6E). These intermediates generate a so-called 'X-spike', which accumulate in MMS-treated *sgs1*Δ cells used here as a positive control (Branzei and Foiani, 2007), but are not detected in *rad51*Δ cells. The presence of this X-spike correlates also with an increase of unequal sister-chromatid recombination events (Supplementary Figure 4B) in a Rad51-dependent manner (Fasullo *et al*, 2001; Duro *et al*, 2008). Taken together, these data indicate that recombination mechanisms operate at stalled forks and are essential to complete S phase after replication stress.



Conclusion

Here, we show that activation of the Mrc1-dependent branch of the intra-S-phase checkpoint prevents HR at DNA DSBs, presumably to suppress HR-mediated genomic instability under replication stress. Yet, we also found that Rad51-dependent recombination events occur at stalled forks and are essential to complete DNA replication after MMS treatment. To reconcile these apparently conflicting observations, we propose that the DNA replication checkpoint differentially regulates recombination at DSBs and at stalled forks. The major difference between these two types of recombination is that DSB repair depends on the formation of 3′ ssDNA overhangs, whereas ssDNA is already present at stalled forks and can be used to initiate recombination with the sister chromatid (Fabre *et al*, 2002). By impeding resection, the replication checkpoint would therefore function as a switch to prevent potentially dangerous HR at DSBs and to allow helpful SCR at stalled forks (Figure 7). It has recently been reported that SCR depends on specific factors such as Rtt109, Asf1 and Rtt101, which are fully dispensable for HR (Duro *et al*, 2008). It is therefore possible that SCR and HR take place in different subnuclear compartments and/or operate with different kinetics, which would explain why cells exposed to MMS do not show Rad52 foci. Finally, it is now important to determine how the replication checkpoint prevents the formation of ssDNA at DSBs. Recent evidence indicates that resection of DNA ends is a complex process that depends on the regulation of multiple DNA helicases and exonucleases (Raynard *et al*, 2008). One of these enzymes, Exo1, is repressed by Rad53 to protect stalled forks and uncapped telomeres (Cotta-Ramusino *et al*, 2005; Morin *et al*, 2008; Segurado and Diffley, 2008). Whether Exo1 or other resection factors are also inhibited by Rad53 to suppress HR is an important question that remains to be addressed.

Materials and methods

Strains and growth conditions

Strains used in this study are listed in Supplementary Table I. Cells were grown at 25°C in synthetic complete medium and were arrested in G_1 for 2.5 h with 2 μg/ml α-factor (GenePep, France). Cells were released from G_1 by the addition of Pronase and were resuspended in fresh medium containing 200 mM HU (Sigma), 0.033% methyl methanesulphonate (Sigma) or 20 μM CPT (Sigma).

Figure 5 Mrc1 suppresses the formation HR foci and ssDNA overhangs in response to replication stress. (**A**) Wild-type (PP534), *mrc1*Δ (PP388), *rad9*Δ (PP1154), $mrc1^{AQ}$ (PP471) and $mrc1^{AQ}$ *rad9*Δ (PP1064) cells were arrested in G_1 and were exposed or not to Zeocin (ZEO) as indicated in Figure 2A. Cells were then released into S phase for 90 min in the presence or absence of 200 mM HU. The percentage of cells containing Rad52–GFP foci is indicated. (**B**) Percentage of wild-type (PP534) and *mrc1*Δ (PP388) cells forming Zeocin-induced Rad52 foci in S phase after exposure to HU, MMS or CPT. Cells were arrested in G_1, treated with Zeocin and were released into S phase for 90 min in the presence (HU, MMS and CPT) or absence (S) of drugs as described in Figure 1B. (**C**) Analysis of DSB resection at *MAT*α in untreated *mrc1*Δ (PP736) cells (Exp.) or in cells exposed to HU, MMS or CPT. Experiment was performed as described in Figure 4. (**D**, **E**) Resection rate at the HO-cut band (fragment C) and at the adjacent *Sty*I fragment (fragment 2) in untreated *mrc1*Δ cells (Exp.) and in cells exposed to drugs (HU, MMS and CPT). The ratio of intensity of fragments in the presence or absence of HU is indicated for wild-type and *mrc1*Δ cells.

©2009 European Molecular Biology Organization

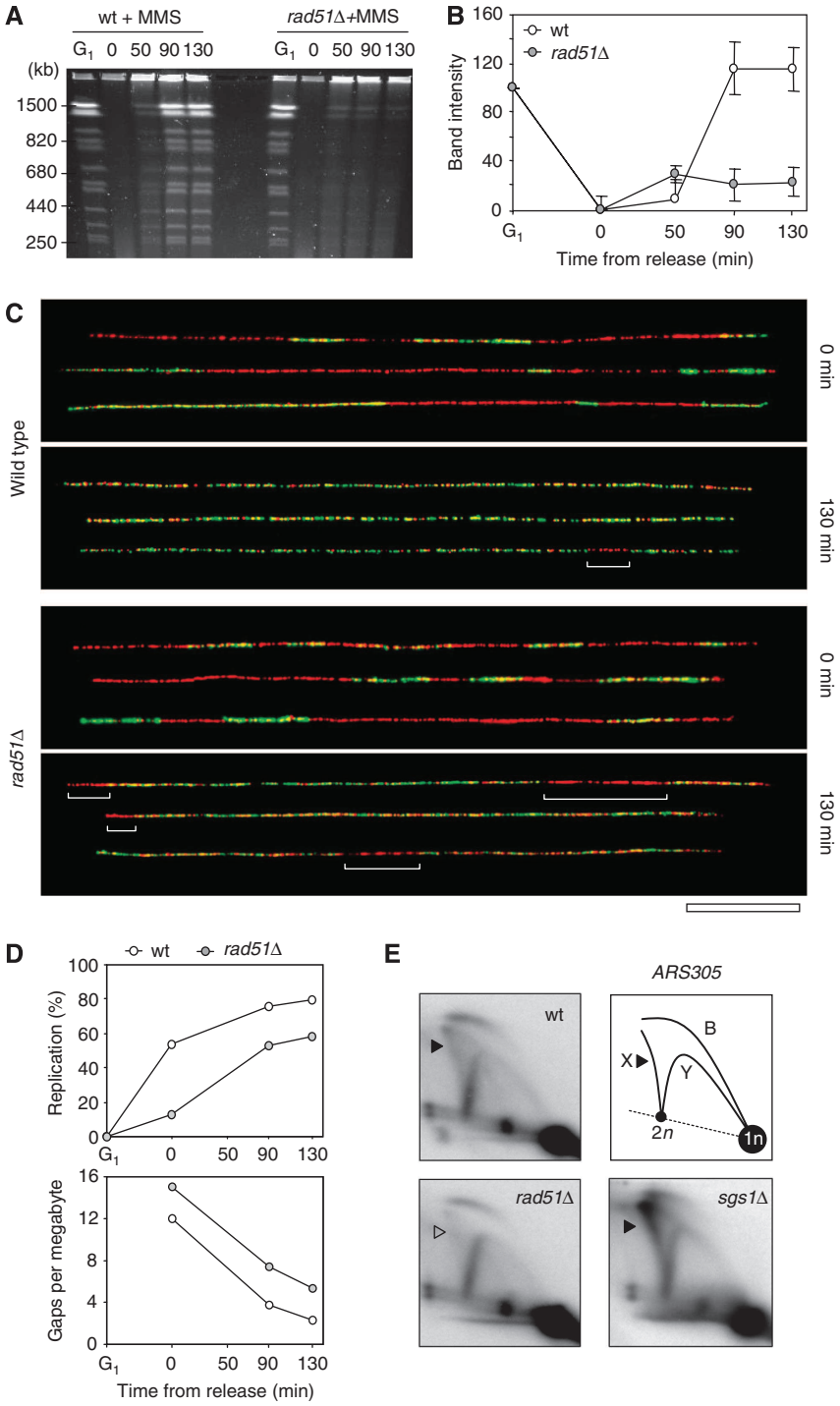


Figure 6 Rad51 is required for the recovery of MMS-induced replication fork stalling. Wild-type (PP633) and *rad51*Δ (PP484) cells were arrested in G_1 with α-factor and released synchronously into S phase in the presence of 400 μg/ml BrdU and 0.033% MMS for 60 min. Cells were then collected and resuspended in fresh medium containing BrdU for the indicated time after MMS release ($t = 0$). (**A**) PFGE analysis of chromosome mobility in wild-type and *rad51*Δ cells after release from MMS arrest. (**B**) Quantitation of chromosome mobility during release from MMS. (**C**) DNA fibres from wild-type and *rad51*Δ cells treated as indicated above were analysed by DNA combing. Representative DNA fibres from MMS-treated cells are shown. Red: DNA; green: BrdU; white: BrdU channel alone; brackets: unreplicated gaps. Scale bar is 50 kb. (**D**) Quantitation of the percentage of replication and the number of unreplicated gaps per megabyte of genomic DNA in wild-type and *rad51*Δ cells released from MMS arrest. (**E**) 2D gel analysis of replication intermediates in wild-type, *rad51*Δ and *sgs1*Δ cells exposed for 60 min to 0.1% MMS. 2D gel electrophoresis was performed as described, using a probe against the early origin *ARS305* (Tourriere *et al*, 2005). X, X-spike; B, bubble arc; Y, Y arc. Closed and open arrowheads point to the presence or the absence of X-spikes, respectively.

DSBs were induced in G1 with the addition of 100 μg/ml Zeocin (InvivoGen). Thermosensitive *cdc7*-4 cells were arrested at the G_1/S transition by shifting the culture to 37°C 1 h before release from α-factor. Cell cycle progression was monitored by flow cytometry (FACScan).

Microscopy

All experiments were performed at 25°C to allow the GFP chromophore to form efficiently. Cells were immediately fixed with 4% paraformaldehyde and immobilized on a glass slide with 1.2% low melting agarose (Lisby *et al*, 2004). Images were acquired by

 ©2009 European Molecular Biology Organization

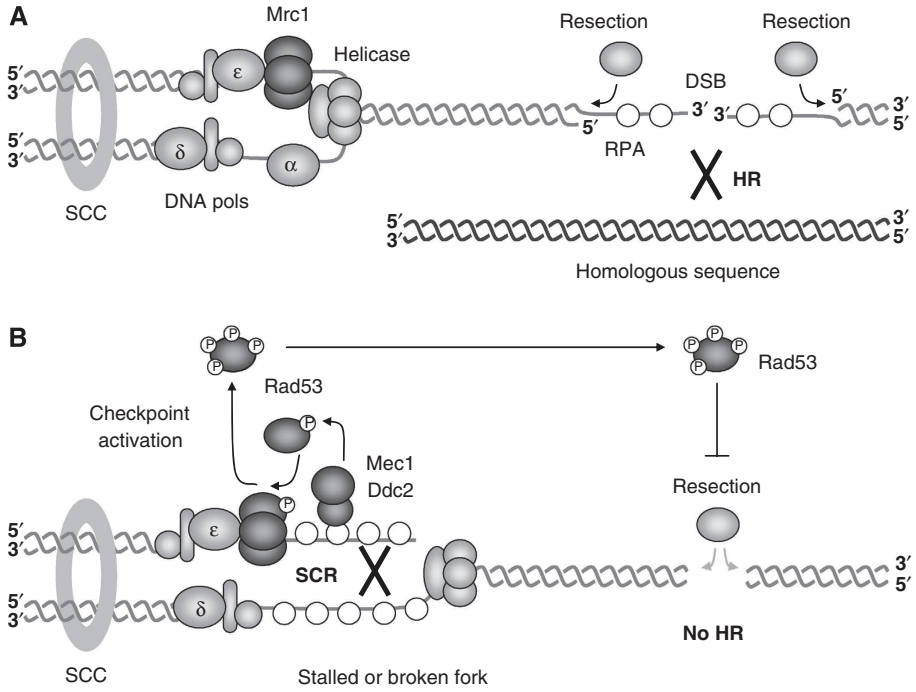


Figure 7 Differential regulation of homologous recombination at DNA double-strand breaks and stalled forks under replication stress. (**A**) DSBs are efficiently repaired by homologous recombination (HR) during S phase after the formation of 3′ ssDNA overhangs. (**B**) In the presence of HU or MMS, stalled replication forks induce the activation of the DNA replication checkpoint in an Mrc1-dependent manner through the recruitment of the Mec1–Ddc2 complex on RPA-coated ssDNA. Hyperphosphorylated Rad53 functions in *trans* to prevent HR at DSBs, presumably by blocking the formation of ssDNA tails. In contrast, sister-chromatid recombination occurs at stalled forks, which already contain ssDNA (see text for details). SCC, sister-chromatid cohesion.

using a CoolSNAP HQ CCD camera mounted on a Leica DM6000B microscope. For each field of view, eight fluorescent images were acquired at 0.5-μm intervals along the *z*-axis. Rad52–GFP foci were counted by inspecting all focal planes for at least 300 cells. To stain genomic DNA, 10 μg/ml DAPI was added to the culture 30 min before imaging.

Analysis of HO cleavage, repair and DNA resection

DNA was extracted from cells before and after HO induction and digested with *Sty*I as described (Sugawara and Haber, 2006). The digested DNA was separated on 1% agarose gel, blotted to GeneScreen nylon membranes (NEN) and probed with radiolabelled probe as indicated in Figure 3A. Bands were quantitated using a Typhoon Trio (Amersham GE) and signals were normalized to a *Sty*I fragment containing the *RAD9* gene. The same protocol was used for the analysis of ssDNA resulting from strand resection, except that *Sty*I fragments were run on a 1% agarose gel in denaturing conditions (50 mM NaOH and 1 mM EDTA) as described (Sugawara and Haber, 2006).

Dynamic molecular combing

DNA combing was performed as described earlier (Michalet *et al*, 1997; Versini *et al*, 2003). BrdU was detected with a rat monoclonal antibody (BU1/75; AbCys; 1/20) and a secondary antibody-coupled Alexa 488 (Molecular Probes; 1/50). DNA molecules were counterstained with a mouse monoclonal antibody against ssDNA (MAB3034; Chemicon; 1/500) and an anti-mouse coupled to Alexa 546 (Molecular Probes; 1/50). Images were recorded on a Leica DM6000B microscope and were processed as described (Pasero *et al*, 2002). For each experiment, the total length of unreplicated gaps (red-only stretches larger than 5 kb) was measured for >20 Mb of randomly selected DNA fibres and was expressed as an average number of gaps per megabyte of total DNA. The percentage of replication was determined as the ratio of the total length of replicated stretches to the total length of unreplicated DNA gaps.

Unequal sister-chromatid exchange assay

Unequal sister-chromatid exchange was measured as described earlier (Fasullo *et al*, 2001). Briefly, cells were grown in rich medium with glucose and adenine (YPAD) to 5×10^6 cells per ml and then exposed for 45 min to 0.02% MMS. Here, 2×10^6 cells were plated on solid synthetic medium without histidine (SC-His) agar and 200 cells on YPAD plates. After 3 days at 30°C, colonies were counted. Relative unit represents the number of His+ colony per 200 YPAD colonies. Values represent the average of three independent experiments.

Supplementary data

Supplementary data are available at *The EMBO Journal* Online (http://www.embojournal.org).

Acknowledgements

We thank L Crabbé, A Lengronne, H Tourrière and S Schmidt for critical comments on the paper. We are also grateful to G Ira, S Jackson, D Lydall, M Peter, J Rouse and E Schwob for strains. We thank the DNA Combing Facility of Montpellier for silanised coverslips. Work in the PP lab is supported by FRM (Equipe FRM), CNRS (ATIP) and INCa. CA thanks ARC (Association pour la Recherche contre le Cancer) for fellowship.

References

Alcasabas AA, Osborn AJ, Bachant J, Hu F, Werler PJ, Bousset K, Furuya K, Diffley JF, Carr AM, Elledge SJ (2001) Mrc1 transduces signals of DNA replication stress to activate Rad53. *Nat Cell Biol* **3:** 958–965

Alvino GM, Collingwood D, Murphy JM, Delrow J, Brewer BJ, Raghuraman MK (2007) Replication in hydroxyurea: it's a matter of time. *Mol Cell Biol* **27:** 6396–6406

©2009 European Molecular Biology Organization

Aylon Y, Liefshitz B, Kupiec M (2004) The CDK regulates repair of double-strand breaks by homologous recombination during the cell cycle. *EMBO J* **23:** 4868–4875

Bashkirov VI, King JS, Bashkirova EV, Schmuckli-Maurer J, Heyer WD (2000) DNA repair protein Rad55 is a terminal substrate of the DNA damage checkpoints. *Mol Cell Biol* **20:** 4393–4404

Boddy MN, Shanahan P, McDonald WH, Lopez-Girona A, Noguchi E, Yates IJ, Russell P (2003) Replication checkpoint kinase Cds1 regulates recombinational repair protein Rad60. *Mol Cell Biol* **23:** 5939–5946

Bousset K, Diffley JF (1998) The Cdc7 protein kinase is required for origin firing during S phase. *Genes Dev* **12:** 480–490

Branzei D, Foiani M (2007) RecQ helicases queuing with Srs2 to disrupt Rad51 filaments and suppress recombination. *Genes Dev* **21:** 3019–3026

Branzei D, Foiani M (2008) Regulation of DNA repair throughout the cell cycle. *Nat Rev Mol Cell Biol* **9:** 297–308

Branzei D, Sollier J, Liberi G, Zhao X, Maeda D, Seki M, Enomoto T, Ohta K, Foiani M (2006) Ubc9- and Mms21-mediated sumoylation counteracts recombinogenic events at damaged replication forks. *Cell* **127:** 509–522

Brush GS, Morrow DM, Hieter P, Kelly TJ (1996) The ATM homologue MEC1 is required for phosphorylation of replication protein A in yeast. *Proc Natl Acad Sci USA* **93:** 15075–15080

Chang M, Bellaoui M, Boone C, Brown GW (2002) A genome-wide screen for methyl methanesulfonate-sensitive mutants reveals genes required for S phase progression in the presence of DNA damage. *Proc Natl Acad Sci USA* **99:** 16934–16939

Clerici M, Mantiero D, Lucchini G, Longhese MP (2005) The *Saccharomyces cerevisiae* Sae2 protein promotes resection and bridging of double strand break ends. *J Biol Chem* **280:** 38631–38638

Cobb JA, Bjergbaek L, Shimada K, Frei C, Gasser SM (2003) DNA polymerase stabilization at stalled replication forks requires Mec1 and the RecQ helicase Sgs1. *EMBO J* **22:** 4325–4336

Cobb JA, Schleker T, Rojas V, Bjergbaek L, Tercero JA, Gasser SM (2005) Replisome instability, fork collapse, and gross chromosomal rearrangements arise synergistically from Mec1 kinase and RecQ helicase mutations. *Genes Dev* **19:** 3055–3069

Cotta-Ramusino C, Fachinetti D, Lucca C, Doksani Y, Lopes M, Sogo J, Foiani M (2005) Exo1 processes stalled replication forks and counteracts fork reversal in checkpoint-defective cells. *Mol Cell* **17:** 153–159

Davies AA, Huttner D, Daigaku Y, Chen S, Ulrich HD (2008) Activation of ubiquitin-dependent DNA damage bypass is mediated by replication protein A. *Mol Cell* **29:** 625–636

Duro E, Vaisica JA, Brown GW, Rouse J (2008) Budding yeast Mms22 and Mms1 regulate homologous recombination induced by replisome blockage. *DNA Repair (Amst)* **7:** 811–818

Fabre F, Chan A, Heyer WD, Gangloff S (2002) Alternate pathways involving Sgs1/Top3, Mus81/Mms4, and Srs2 prevent formation of toxic recombination intermediates from single-stranded gaps created by DNA replication. *Proc Natl Acad Sci USA* **99:** 16887–16892

Fasullo M, Giallanza P, Dong Z, Cera C, Bennett T (2001) *Saccharomyces cerevisiae* rad51 mutants are defective in DNA damage-associated sister chromatid exchanges but exhibit increased rates of homology-directed translocations. *Genetics* **158:** 959–972

Flott S, Alabert C, Toh GW, Toth R, Sugawara N, Campbell DG, Haber JE, Pasero P, Rouse J (2007) Phosphorylation of Slx4 by Mec1 and Tel1 regulates the single-strand annealing mode of DNA repair in budding yeast. *Mol Cell Biol* **27:** 6433–6445

Gangloff S, Soustelle C, Fabre F (2000) Homologous recombination is responsible for cell death in the absence of the Sgs1 and Srs2 helicases. *Nat Genet* **25:** 192–194

Ge XQ, Jackson DA, Blow JJ (2007) Dormant origins licensed by excess Mcm2–7 are required for human cells to survive replicative stress. *Genes Dev* **21:** 3331–3341

Gilbert CS, Green CM, Lowndes NF (2001) Budding yeast Rad9 is an ATP-dependent Rad53 activating machine. *Mol Cell* **8:** 129–136

Herzberg K, Bashkirov VI, Rolfsmeier M, Haghnazari E, McDonald WH, Anderson S, Bashkirova EV, Yates III JR, Heyer W-D (2006) Phosphorylation of Rad55 on serines 2, 8, and 14 is required for efficient homologous recombination in the recovery of stalled replication forks. *Mol Cell Biol* **26:** 8396–8409

Huertas P, Cortes-Ledesma F, Sartori AA, Aguilera A, Jackson SP (2008) CDK targets Sae2 to control DNA-end resection and homologous recombination. *Nature* **455:** 689–692

Ibarra A, Schwob E, Mendez J (2008) Excess MCM proteins protect human cells from replicative stress by licensing backup origins of replication. *Proc Natl Acad Sci USA* **105:** 8956–8961

Ira G, Pellicioli A, Balijja A, Wang X, Fiorani S, Carotenuto W, Liberi G, Bressan D, Wan L, Hollingsworth NM, Haber JE, Foiani M (2004) DNA end resection, homologous recombination and DNA damage checkpoint activation require CDK1. *Nature* **431:** 1011–1017

Kai M, Boddy MN, Russell P, Wang TS (2005) Replication checkpoint kinase Cds1 regulates Mus81 to preserve genome integrity during replication stress. *Genes Dev* **19:** 919–932

Koc A, Wheeler LJ, Mathews CK, Merrill GF (2004) Hydroxyurea arrests DNA replication by a mechanism that preserves basal dNTP pools. *J Biol Chem* **279:** 223–230

Krejci L, Van Komen S, Li Y, Villemain J, Reddy MS, Klein H, Ellenberger T, Sung P (2003) DNA helicase Srs2 disrupts the Rad51 presynaptic filament. *Nature* **423:** 305–309

Krogh BO, Symington LS (2004) Recombination proteins in yeast. *Annu Rev Genet* **38:** 233–271

Labib K, Hodgson B (2007) Replication fork barriers: pausing for a break or stalling for time? *EMBO Rep* **8:** 346–353

Lisby M, Barlow JH, Burgess RC, Rothstein R (2004) Choreography of the DNA damage response; spatiotemporal relationships among checkpoint and repair proteins. *Cell* **118:** 699–713

Lisby M, Rothstein R, Mortensen UH (2001) Rad52 forms DNA repair and recombination centers during S phase. *Proc Natl Acad Sci USA* **98:** 8276–8282

Llorente B, Smith CE, Symington LS (2008) Break-induced replication: what is it and what is it for? *Cell Cycle* **7:** 859–864

Llorente B, Symington LS (2004) The Mre11 nuclease is not required for 5′ to 3′ resection at multiple HO-induced double-strand breaks. *Mol Cell Biol* **24:** 9682–9694

Lopes M, Cotta-Ramusino C, Pellicioli A, Liberi G, Plevani P, Muzi-Falconi M, Newlon CS, Foiani M (2001) The DNA replication checkpoint response stabilizes stalled replication forks. *Nature* **412:** 557–561

Luke B, Versini G, Jaquenoud M, Zaidi IW, Kurz T, Pintard L, Pasero P, Peter M (2006) The cullin Rtt101p promotes replication fork progression through damaged DNA and natural pause sites. *Curr Biol* **16:** 786–792

Lundin C, North M, Erixon K, Walters K, Jenssen D, Goldman AS, Helleday T (2005) Methyl methanesulfonate (MMS) produces heat-labile DNA damage but no detectable *in vivo* DNA double-strand breaks. *Nucleic Acids Res* **33:** 3799–3811

Meister P, Taddei A, Vernis L, Poidevin M, Gasser SM, Baldacci G (2005) Temporal separation of replication and recombination requires the intra-S checkpoint. *J Cell Biol* **168:** 537–544

Michalet X, Ekong R, Fougerousse F, Rousseaux S, Schurra C, Hornigold N, van Slegtenhorst M, Wolfe J, Povey S, Beckmann JS, Bensimon A (1997) Dynamic molecular combing: stretching the whole human genome for high-resolution studies. *Science* **277:** 1518–1523

Michel B, Boubakri H, Baharoglu Z, LeMasson M, Lestini R (2007) Recombination proteins and rescue of arrested replication forks. *DNA Repair (Amst)* **6:** 967–980

Mimitou EP, Symington LS (2008) Sae2, Exo1 and Sgs1 collaborate in DNA double-strand break processing. *Nature* **455:** 770–774

Morin I, Ngo HP, Greenall A, Zubko MK, Morrice N, Lydall D (2008) Checkpoint-dependent phosphorylation of Exo1 modulates the DNA damage response. *EMBO J* **27:** 2400–2410

Osborn AJ, Elledge SJ (2003) Mrc1 is a replication fork component whose phosphorylation in response to DNA replication stress activates Rad53. *Genes Dev* **17:** 1755–1767

Paques F, Haber JE (1999) Multiple pathways of recombination induced by double-strand breaks in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev* **63:** 349–404

Pasero P, Bensimon A, Schwob E (2002) Single-molecule analysis reveals clustering and epigenetic regulation of replication origins at the yeast rDNA locus. *Genes Dev* **16:** 2479–2484

Pellicioli A, Lucca C, Liberi G, Marini F, Lopes M, Plevani P, Romano A, Di Fiore PP, Foiani M (1999) Activation of Rad53 kinase in response to DNA damage and its effect in modulating phosphorylation of the lagging strand DNA polymerase. *EMBO J* **18:** 6561–6572

 ©2009 European Molecular Biology Organization

Pfander B, Moldovan G-L, Sacher M, Hoege C, Jentsch S (2005) SUMO-modified PCNA recruits Srs2 to prevent recombination during S phase. *Nature* **436:** 428–433

Pommier Y (2006) Topoisomerase I inhibitors: camptothecins and beyond. *Nat Rev Cancer* **6:** 789–802

Prakash R, Satory D, Dray E, Papusha A, Scheller J, Kramer W, Krejci L, Klein H, Haber JE, Sung P, Ira G (2009) Yeast Mph1 helicase dissociates Rad51-made D-loops: implications for crossover control in mitotic recombination. *Genes Dev* **23:** 67–79

Raffa GD, Wohlschlegel J, Yates III JR, Boddy MN (2006) SUMO-binding motifs mediate the Rad60-dependent response to replicative stress and self-association. *J Biol Chem* **281:** 27973–27981

Raynard S, Niu H, Sung P (2008) DNA double-strand break processing: the beginning of the end. *Genes Dev* **22:** 2903–2907

Redon C, Pilch DR, Rogakou EP, Orr AH, Lowndes NF, Bonner WM (2003) Yeast histone 2A serine 129 is essential for the efficient repair of checkpoint-blind DNA damage. *EMBO Rep* **4:** 678–684

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

San Filippo J, Sung P, Klein H (2008) Mechanism of eukaryotic homologous recombination. *Annu Rev Biochem* **77:** 229–257

Segurado M, Diffley JFX (2008) Separate roles for the DNA damage checkpoint protein kinases in stabilizing DNA replication forks. *Genes Dev* **22:** 1816–1827

Sogo JM, Lopes M, Foiani M (2002) Fork reversal and ssDNA accumulation at stalled replication forks owing to checkpoint defects. *Science* **297:** 599–602

Sorensen CS, Hansen LT, Dziegielewski J, Syljuasen RG, Lundin C, Bartek J, Helleday T (2005) The cell-cycle checkpoint kinase Chk1 is required for mammalian homologous recombination repair. *Nat Cell Biol* **7:** 195–201

Sugawara N, Haber JE (2006) Repair of DNA double strand breaks: *in vivo* biochemistry. *Methods Enzymol* **408:** 416–429

Szyjka SJ, Viggiani CJ, Aparicio OM (2005) Mrc1 is required for normal progression of replication forks throughout chromatin in *S. cerevisiae*. *Mol Cell* **19:** 691–697

Tercero JA, Longhese MP, Diffley JF (2003) A central role for DNA replication forks in checkpoint activation and response. *Mol Cell* **11:** 1323–1336

Tourriere H, Pasero P (2007) Maintenance of fork integrity at damaged DNA and natural pause sites. *DNA Repair (Amst)* **6:** 900–913

Tourriere H, Versini G, Cordon-Preciado V, Alabert C, Pasero P (2005) Mrc1 and tof1 promote replication fork progression and recovery independently of Rad53. *Mol Cell* **19:** 699–706

Vázquez MV, Rojas V, Tercero JA (2008) Multiple pathways cooperate to facilitate DNA replication fork progression through alkylated DNA. *DNA Repair (Amst)* **7:** 1693–1704

Veaute X, Jeusset J, Soustelle C, Kowalczykowski SC, Le Cam E, Fabre F (2003) The Srs2 helicase prevents recombination by disrupting Rad51 nucleoprotein filaments. *Nature* **423:** 309–312

Versini G, Comet I, Wu M, Hoopes L, Schwob E, Pasero P (2003) The yeast Sgs1 helicase is differentially required for genomic and ribosomal DNA replication. *EMBO J* **22:** 1939–1949

Wang X, Ira G, Tercero JA, Holmes AM, Diffley JFX, Haber JE (2004) Role of DNA replication proteins in double-strand break-induced recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **24:** 6891–6899

Zaidi IW, Rabut G, Poveda A, Scheel H, Malmstrom J, Ulrich H, Hofmann K, Pasero P, Peter M, Luke B (2008) Rtt101 and Mms1 in budding yeast form a CUL4(DDB1)-like ubiquitin ligase that promotes replication through damaged DNA. *EMBO Rep* **9:** 1034–1040

Zhu Z, Chung W-H, Shim EY, Lee SE, Ira G (2008) Sgs1 helicase and two nucleases Dna2 and exo1 resect DNA double-strand break ends. *Cell* **134:** 981–994

Zierhut C, Diffley JF (2008) Break dosage, cell cycle stage and DNA replication influence DNA double strand break response. *EMBO J* **27:** 1875–1885

©2009 European Molecular Biology Organization