



**HAL**  
open science

**Etude du rôle de la protéine phosphatase de type 1 Glc7 dans l'inactivation des mécanismes de surveillance de l'ADN et analyse des interrégulations entre le mécanisme de surveillance de l'ADN et celui du fuseau mitotique chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*.**

Céline Clemenson

► **To cite this version:**

Céline Clemenson. Etude du rôle de la protéine phosphatase de type 1 Glc7 dans l'inactivation des mécanismes de surveillance de l'ADN et analyse des interrégulations entre le mécanisme de surveillance de l'ADN et celui du fuseau mitotique chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*.. Sciences du Vivant [q-bio]. Ecole Centrale Paris, 2007. Français. NNT : . tel-00361210

**HAL Id: tel-00361210**

**<https://theses.hal.science/tel-00361210>**

Submitted on 13 Feb 2009

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

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



**ÉCOLE CENTRALE DES ARTS  
ET MANUFACTURES  
« ÉCOLE CENTRALE PARIS »**

**THÈSE**  
présentée par

**Céline CLEMENSON**

pour l'obtention du

**GRADE DE DOCTEUR**

**Spécialité : Génétique Moléculaire**

**Laboratoire d'accueil : LGPM**

**SUJET :**

*Etude du rôle de la protéine phosphatase de type 1 Glc7 dans l'inactivation des mécanismes de surveillance de l'ADN et analyse des interrégulations entre le mécanisme de surveillance de l'ADN et celui du fuseau mitotique chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*.*

**soutenue le : 4 Mai 2007**

**devant un jury composé de :**

**Alain PHILIPPON  
Stefania FRANCESCONI  
Etienne SCHWOB  
Roger KARESS  
Marie-Claude MARSOLIER-KERGOAT  
Gérard DINE**

**Président  
Rapporteur  
Rapporteur  
Examineur  
Examineur  
Directeur de thèse**

**Laboratoire de recherche :  
GEMSA/SBIGeM/iBiTec-S  
Commissariat à l'Energie Atomique de Saclay  
91 191 Gif sur Yvette cedex**

**N° d'ordre : 2007-21**



# RÉSUMÉ

Chez les eucaryotes, la transmission correcte du patrimoine génétique au cours de la division cellulaire repose en partie sur l'existence de voies de surveillance ou « checkpoints » contrôlant d'une part l'intégrité de l'ADN et d'autre part la répartition équitable du génome dupliqué dans les cellules-filles au cours de la mitose. Des altérations dans la machinerie de ségrégation des chromosomes activent le checkpoint du fuseau mitotique, tandis que les checkpoints de l'ADN sont activés suite à des lésions de l'ADN ou à des défauts de la réplication. Ces systèmes de surveillance contrôlent de multiples réponses dont des arrêts de la progression du cycle de division cellulaire. Ces voies de surveillance sont très conservées chez les eucaryotes et des mutations affectant leurs composants sont fréquemment retrouvées dans des lignées tumorales humaines.

L'activation des checkpoints de l'ADN est, à ce jour, assez bien appréhendée et met en jeu de nombreux événements de phosphorylation. La reprise du cycle concomitante à la désactivation de ces checkpoints est moins bien comprise alors qu'elle constitue une étape tout aussi essentielle à la survie cellulaire. Nous avons montré que la protéine phosphatase de type 1 Glc7 était impliquée dans l'inactivation des checkpoints de l'ADN en cas de cassures double-brin de l'ADN chez un eucaryote modèle, la levure *Saccharomyces cerevisiae*.

Les checkpoints de l'ADN et du fuseau étaient considérés comme des voies indépendantes, mais nos travaux ont montré qu'il existe des interconnexions entre les deux. Nous avons observé que, d'une part, l'activité du checkpoint du fuseau et ses composants influencent la réponse aux stress génotoxiques, et que, d'autre part, l'état de phosphorylation de deux composants centraux des checkpoints de l'ADN, Rad53 et Rad9, était modifié en cas d'activation du checkpoint du fuseau. Nous présentons ici la caractérisation de ces modifications post-traductionnelles ainsi que la recherche de leurs significations physiologiques.



# TABLE DES MATIÈRES

<b>PRÉAMBULE</b>	<b>7</b>
<b>INTRODUCTION</b>	<b>9</b>
<b>Introduction sur les checkpoints de l'ADN</b>	<b>11</b>
1. Introduction	11
1.1. Le ou les checkpoints de l'ADN ?	13
1.2. Le signal	14
2. Les composants des checkpoints de l'ADN	15
2.1. Les complexes Rad17/Mec3/Ddc1 ('PCNA-like') et Rad24/Rfc2-5 ('RFC-like')	16
2.2. Les kinases Mec1 et Tel1	17
2.3. Les kinases Chk1 et Rad53	18
2.4. Les adaptateurs Rad9 et Mrc1	19
2.5. Le modèle	21
3. Les réponses induites par l'activation des checkpoints de l'ADN	22
3.1. Arrêts du cycle	23
3.1.1. L'arrêt en G1	25
3.1.2. La phase S	25
3.1.3. L'arrêt en G2/M	27
3.1.3.1. Régulations de la transition métaphase/anaphase et de la sortie de mitose	27
3.1.3.2. Le checkpoint de l'ADN et Pds1	30
3.1.3.3. Le checkpoint de l'ADN et Bub2/Bfa1	31
3.1.3.4. Le modèle	31
3.1.3.5. L'arrêt en G2/M chez les autres organismes	32
3.2. Induction transcriptionnelle	32
3.3. Réparation	33
3.4. Les foci	35
4. La désactivation des checkpoints de l'ADN	36
4.1. Les phénomènes d'adaptation et de rétablissement	36
4.1.1. Introduction	36
4.1.2. Identification du phénomène d'adaptation chez la levure <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	37
4.2. Quelques éléments sur le mécanisme moléculaire	40
4.2.1. La désactivation des protéines du checkpoint de l'ADN	40
4.2.2. Les mutants d'adaptation	40
4.2.3. Rad53, Ptc2, Ptc3 et CK2	43
4.3. L'adaptation chez les autres organismes	44
4.3.1. La levure fissipare	44
4.3.2. Les eucaryotes supérieurs	44
4.4. La régulation de l'adaptation	45
4.4.1. L'histone H2AX, le rétablissement et l'adaptation	45
4.4.2. Le checkpoint, l'ADN simple-brin et la résection	46
4.4.3. Le mécanisme d'adaptation	46
4.5. Conclusion	48
<b>Introduction sur le checkpoint du fuseau</b>	<b>49</b>
1. Introduction	49
2. Les composants du checkpoint du fuseau	50
2.1. L'identification des principaux composants du checkpoint du fuseau	50
2.2. Les protéines	52
2.3. La localisation des protéines du checkpoint du fuseau et l'origine du signal	53
3. L'activation du checkpoint du fuseau	55
3.1. Un checkpoint activé à chaque cycle ?	55
3.2. Le signal	56
3.3. L'arrêt du cycle	58
3.3.1. Les cibles	58
3.3.1.1. Pds1	58
3.3.1.2. Bub2/Bfa1 et le MEN	59

3.3.2. Les deux voies	61
3.3.3. Le modèle	63
3.4. Le mécanisme d'activation	65
3.4.1. Inhibition de Cdc20	65
3.4.1.1. Mad2 et Cdc20	66
3.4.1.2. BubR1 et Cdc20	68
3.4.2. L'activation de Mad2 par Mad1	69
3.4.3. Les complexes	73
4. La désactivation du checkpoint du fuseau	75
<b>Introduction sur Glc7</b>	<b>77</b>
1. Introduction sur les phosphatases	77
2. Les protéines phosphatases de type 1	79
3. La phosphatase Glc7	80
3.1. Quelques voies cellulaires dans lesquelles Glc7 est impliquée	81
3.1.1. Glc7 et le métabolisme du glycogène	81
3.1.2. Glc7 et la répression par le glucose	82
3.1.3. Glc7, l'intégrité cellulaire et la morphogenèse	83
3.1.4. Glc7 et les checkpoints du pachytène	83
3.2. Glc7 et la mitose	86
3.2.1. Glc7 et Ipl1	86
3.2.1.1. Ipl1, les interactions kinétochores/microtubules et le checkpoint du fuseau	86
3.2.1.2. Glc7, Ipl1, les interactions kinétochores/microtubules et le checkpoint du fuseau	88
3.2.1.3. Glc7 et Ipl1 régulent-elles l'état de phosphorylation d'un ensemble commun de protéines au cours de la mitose ?	89
3.2.1.3.1. Ndc10	89
3.2.1.3.2. Dam1	90
3.2.1.3.3. H3	91
3.2.2. Sous-unités potentiellement impliquées dans les rôles de la PP1c en mitose	92
3.2.2.1. Sds22	92
3.2.2.2. Glc8	93
3.2.2.3. Gip3 et Gip4	94
3.2.2.4. Bud14	94
4. Les PP1 chez les autres organismes	95
4.1. La PP1 chez <i>S. pombe</i>	95
4.2. La PP1 chez les mammifères	96
<b>RÉSULTATS ET DISCUSSION</b>	<b>99</b>
<b>Glc7 et l'inactivation des mécanismes de surveillance de l'ADN</b>	<b>101</b>
1. Contexte	101
1.1. Les moyens d'étude de l'adaptation	101
1.2. Principe du crible à l'origine de l'étude de Glc7	103
1.3. Le crible	104
2. Résultats	105
2.1. La surexpression de GLC7 supprime partiellement le défaut d'adaptation de nombreux mutants.	105
2.2. La surexpression de GLC7 accélère la désactivation du checkpoint chez le mutant <i>ptc2Δ</i> .	112
2.3. La surexpression de GLC7 a peu d'effet sur l'adaptation de la souche sauvage.	114
2.4. Quelques hypothèses	115
2.5. La surexpression de GLC7 améliore le rétablissement du mutant <i>ptc2Δ</i> .	116
2.6. La phosphorylation de Rad53 après cassure HO est prolongée lors de l'extinction de l'expression de GLC7.	117
2.7. Etude avec la camptothécine	119
2.8. Glc7 et Chk1	122
2.8.1. Influence de la délétion de CHK1 sur l'adaptation après une cassure double-brin de l'ADN	124
2.8.2. Influence de la délétion de CHK1 sur la réponse à la camptothécine	127
2.8.3. Glc7 et la phosphorylation de Chk1	130
2.8.4. Conclusion	131
2.9. Glc7 et Mad2	132
2.9.1. Influence de la délétion de MAD2 sur la réponse aux stress génotoxiques	133
2.9.1.1. Influence de la délétion de MAD2 sur l'adaptation après cassure HO	133
2.9.1.2. Influence de la délétion de MAD2 sur la réponse à la camptothécine	139
2.9.1.3. Conclusion	141

2.9.2. Glc7 et le checkpoint du fuseau	141
3. Discussion	142
3.1. Glc7 et l'inactivation des checkpoints de l'ADN	142
3.1.1. La déphosphorylation de Rad53 est requise pour la reprise du cycle après une cassure HO ou un traitement à la camptothécine.	142
3.1.2. Glc7 est impliquée dans une voie modulant l'inactivation des checkpoints de l'ADN après une cassure HO ou un traitement à la camptothécine.	143
3.2. Chk1 et le maintien des checkpoints de l'ADN	144
3.2.1. Quel est le rôle de Chk1 au sein du checkpoint de l'ADN chez <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ?	144
3.2.2. Pds1, la cible de Chk1 pour le contrôle de la progression cellulaire	147
3.2.3. Comment expliquer le peu d'effet de la délétion de CHK1 sur la sensibilité aux stress génotoxiques ?	147
3.3. Mad2 et la réponse aux stress génotoxiques	148
3.3.1. Checkpoint de l'ADN et checkpoint du fuseau	148
3.3.2. Chk1 et Mad2, une voie commune ?	150
3.4. Le mécanisme d'action de Glc7 ?	150
3.4.1. Glc7 et Mad2	151
3.4.2. Glc7 et Chk1	151
3.4.3. Perspectives pour l'étude de Glc7 dans la régulation du checkpoint de l'ADN	152
<b>Les phosphorylations de Rad53 et Rad9 induites par le checkpoint du fuseau</b>	<b>155</b>
1. Contexte	155
2. Résultats	163
2.1. Les modifications de Rad9 et Rad53 induites par le nocodazole sont dépendantes du checkpoint du fuseau.	164
2.1.1. La présence des phosphorylations de Rad9 et Rad53 induites par le nocodazole est restreinte à une partie de la mitose.	164
2.1.2. Les phosphorylations de Rad9 et Rad53 induites par le nocodazole dépendent des gènes codant pour les protéines du checkpoint du fuseau, mais pas des gènes codant pour les protéines des checkpoints de l'ADN.	166
2.1.3. Conclusion	166
2.2. Les caractéristiques du doublet	167
2.2.1. Le doublet ne semble pas correspondre à une forme active de Rad53.	167
2.2.2. La ou les kinases responsables de la phosphorylation de Rad53 induite par le nocodazole	167
2.2.2.1. Bub1 et Mps1	167
2.2.2.2. Cdc5	168
2.2.2.3. Cdc28	169
2.2.3. Influence de Glc7, Ptc2 et Ptc3 sur la phosphorylation de Rad53 induite par le nocodazole	172
2.3. Quelles peuvent être les significations physiologiques des modifications de Rad9 et Rad53 induites par le nocodazole ?	172
2.3.1. Les modifications de Rad9 et Rad53 induites par le nocodazole sont-elles nécessaires à la réponse aux dommages du fuseau ?	172
2.3.2. Les phosphorylations de Rad9 et Rad53 induites par le nocodazole modifient-elles la réponse aux stress génotoxiques ?	178
2.3.2.1. L'accélération de la « désactivation » de Rad53 est dépendante du checkpoint du fuseau.	180
2.3.2.2. L'accélération de la « désactivation » de Rad53 est-elle le signe d'une désactivation globale plus rapide du checkpoint de l'ADN lorsque le checkpoint du fuseau est activé ?	180
2.3.2.3. Le doublet est-il une forme pré-activée de Rad53 ?	180
2.3.2.4. L'accélération de la déphosphorylation de Rad53 est-elle la conséquence d'un meilleur blocage en G2/M ?	183
2.3.2.4.1. Blocage de la sortie de mitose	184
2.3.2.4.2. Blocage de la transition métaphase/anaphase	185
2.3.2.5. Conclusion : le traitement au nocodazole modifie la réponse aux stress génotoxiques	189
3. Discussion	189
3.1. Les phosphorylations de Rad53 et Rad9 induites par le nocodazole	189
3.1.1. Caractérisation	189
3.1.2. Signification(s) physiologique(s) des phosphorylations de Rad9 et Rad53 induites par le nocodazole	191
3.1.2.1. Rad9 et Rad53 sont-elles impliquées dans la réponse aux dommages du fuseau ?	191
3.1.2.2. Les phosphorylations de Rad9 et Rad53 induites par le nocodazole modifient-elles leur réponse en cas de stress génotoxique ?	197
3.2. Les interrégulations entre checkpoint du fuseau et checkpoints de l'ADN	198



3.2.1. Implication des checkpoints de l'ADN dans la réponse aux dommages du fuseau	198
3.2.2. Implication du checkpoint du fuseau dans la réponse aux dommages de l'ADN	200
3.2.2.1. Chez <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	200
3.2.2.2. Chez <i>Schizosaccharomyces pombe</i>	203
3.2.2.3. Chez les eucaryotes supérieurs	204
3.3. Pph3 et les réponses aux dommages du fuseau et aux dommages de l'ADN	207
<b><i>BIBLIOGRAPHIE</i></b>	<b>211</b>
<b><i>ANNEXES</i></b>	<b>223</b>
Abréviations	223
Cdc28 et les cyclines	225
Souches de levure utilisées dans l'étude	226
Table des figures	229
Article	231
<b><i>REMERCIEMENTS</i></b>	<b>234</b>

# PRÉAMBULE

La division d'une cellule en deux cellules génétiquement identiques est un des mécanismes fondamentaux du vivant. Elle permet aux organismes unicellulaires de se reproduire et aux organismes plus complexes de se développer à partir d'une cellule unique. Chez l'homme, même adulte, des milliards de divisions cellulaires ont lieu chaque jour pour permettre à l'organisme de fonctionner normalement et de maintenir sa structure.

Au cours du cycle de division, les molécules d'ADN doivent être dupliquées puis séparées et être équitablement réparties dans les deux cellules-filles. Ces molécules, support de l'information génétique, sont contenues dans le noyau des cellules eucaryotes. Elles subissent quotidiennement des milliers de lésions qui peuvent survenir de façon endogène à cause du métabolisme de la cellule ou qui peuvent être induites par des agents exogènes comme les rayons ultraviolets du soleil. Ces lésions peuvent prendre différentes formes (dégradation ou perte de base, cassure de l'un ou des deux brins de la chaîne d'ADN, pontage entre l'ADN et d'autres molécules,...) et mettre en péril la conservation du patrimoine génétique. Si les dommages sont importants, des mécanismes de surveillance sont activés et freinent la progression dans le cycle. Ils permettent par l'activation de différentes voies de réponse de maintenir l'intégrité du génome. Des mutations affectant les composants de ces mécanismes de surveillance sont fréquemment retrouvées dans des cancers humains sporadiques ou familiaux. Certaines mutations peuvent d'ailleurs conférer des prédispositions génétiques au développement de certaines tumeurs, par exemple du sein ou de l'ovaire. Enfin, certaines protéines impliquées dans ces systèmes de contrôle sont associées à des maladies comme l'ataxie telangiectasie ou le syndrome de Li-Fraumeni.

Les mécanismes de surveillance de l'ADN sont très conservés chez les eucaryotes. Au cours de ma thèse, j'ai travaillé sur la levure de boulangerie *Saccharomyces cerevisiae*. Cet organisme modèle eucaryote unicellulaire présente plusieurs avantages. Il est aisément manipulable et les techniques permettant son étude sont très développées. De plus, il a l'avantage d'avoir un génome complètement séquencé et très bien annoté. Cette levure a un temps de génération de deux heures environ en croissance exponentielle (contre vingt-quatre heures en moyenne pour les cellules humaines) et est étudié dans les laboratoires principalement sous sa forme haploïde. Son cycle de développement est illustré sur la première figure.



# **INTRODUCTION**



# Introduction sur les checkpoints de l'ADN

## 1. Introduction

L'existence de voies de surveillance de l'intégrité du génome a été réellement mise en évidence il y a moins de 20 ans par T.Weinert et L.Hartwell. Il avait été observé auparavant que les bactéries et les cellules de mammifères retardaient la division cellulaire après un stress génotoxique. Mais le fait d'identifier un gène chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* (cf figure n°11) dont la mutation supprime ce retard a permis de montrer que celui-ci ne résultait pas de contraintes physiques mais qu'il était la conséquence d'un système de contrôle externe (Weinert and Hartwell, 1988). C'est ainsi que la première protéine impliquée dans les mécanismes de surveillance du génome a été clairement identifiée via l'étude de la réponse du mutant *rad9* aux rayons X. Ce mutant ne montre pas d'arrêt lors de la première ou de la deuxième mitose après un traitement aux rayons X, contrairement aux cellules sauvages, et progresse dans le cycle de manière similaire à une souche non irradiée. Contrairement à la souche sauvage, le mutant *rad9* forme de petites microcolonies et meurt rapidement en cas de dommages de l'ADN. Ce comportement est différent de celui du mutant *rad52* affecté pour la réparation (Rad52 est une protéine impliquée dans la recombinaison homologue), qui est lui aussi sensible aux rayons X mais qui ne montre pas de défaut d'arrêt du cycle (Weinert and Hartwell, 1988).

Ce système de contrôle étant mis à jour, T.Weinert et L.Hartwell ont étendu le concept de « mécanisme de surveillance » ou « checkpoint » à la dépendance qui semblait exister entre les différents événements du cycle cellulaire (Hartwell and Weinert, 1989). Nous entendons par événement les phénomènes tels que la réplication de l'ADN, la duplication du centrosome, l'assemblage et l'élongation du fuseau, la condensation des chromosomes, la cytokinèse,... Pour assurer la survie des cellules et la transmission correcte du matériel génétique, ces événements doivent avoir lieu dans un ordre précis et T.Weinert et L.Hartwell ont constaté que certains de ces événements semblaient en effet dépendre de l'exécution d'événement(s) antérieur(s). Par exemple, de manière similaire aux dommages de l'ADN, un blocage de la progression de la réplication empêche la division cellulaire. Ils ont émis deux hypothèses quant aux mécanismes permettant d'imposer ces relations de dépendance :

- la dépendance peut être imposée par une relation « mécanique », par exemple si le produit d'un événement A est nécessaire au démarrage de l'événement B suivant,
- la dépendance peut être imposée par un mécanisme externe qui vérifie que l'événement A s'est déroulé de façon correcte et retarde l'événement B tant que l'évènement A n'est pas achevé.

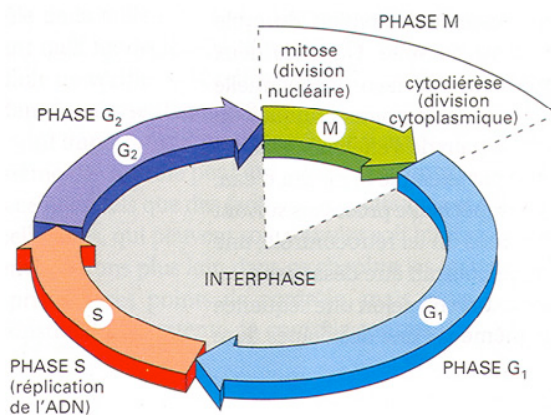
Cette seconde hypothèse fut la première définition de la notion de « checkpoint ». Il a été proposé que l'existence d'un tel système de contrôle pouvait être démontrée en trouvant des conditions (mutation, traitement par une drogue,...) qui permettent à un événement tardif d'avoir lieu même si l'événement précédent, normalement requis et engendrant un retard du second en cas de non-exécution, n'était pas achevé (Hartwell and Weinert, 1989).

L'étude des checkpoints a ainsi débuté en s'appuyant sur cette idée simple et logique et a abouti à une notion plus nuancée et plus complexe aujourd'hui qui est encore loin d'être arrêtée. En fait, le checkpoint du fuseau mitotique sied beaucoup mieux au concept défini par T.Weinert et L.Hartwell que le checkpoint de l'ADN considéré pour un temps comme un mécanisme détectant la complétude de la réplication (Hartwell and Weinert, 1989). Le checkpoint du fuseau

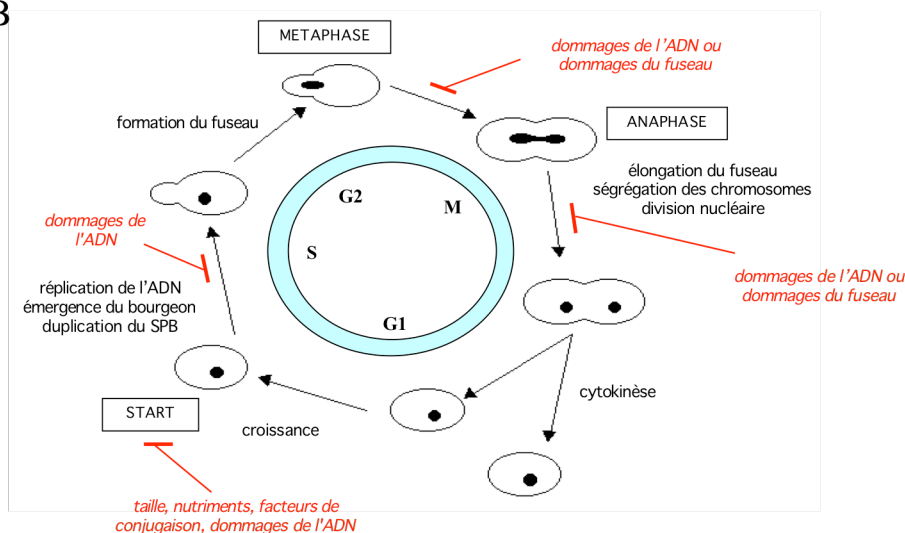
retarde en effet la ségrégation des chromatides sœurs lors de la mitose tant que tous les chromosomes ne sont pas attachés de façon correcte au fuseau. Le ou les checkpoint(s) de l'ADN, quant à eux, détectent les dommages sur l'ADN à tout moment du cycle ou les blocages au niveau des fourches de réplication pendant la phase S et mettent en place la réponse à ses lésions, notamment en bloquant la progression du cycle. Un stress génotoxique n'entrave pas à proprement parler un événement du cycle cellulaire, mais le terme « checkpoint » a tout de même été conservé. Aujourd'hui, le concept de « checkpoint » caractérise les mécanismes qui inhibent la progression dans le cycle soit en cas d'anomalies soit lorsqu'un événement antérieur n'a pas été achevé.

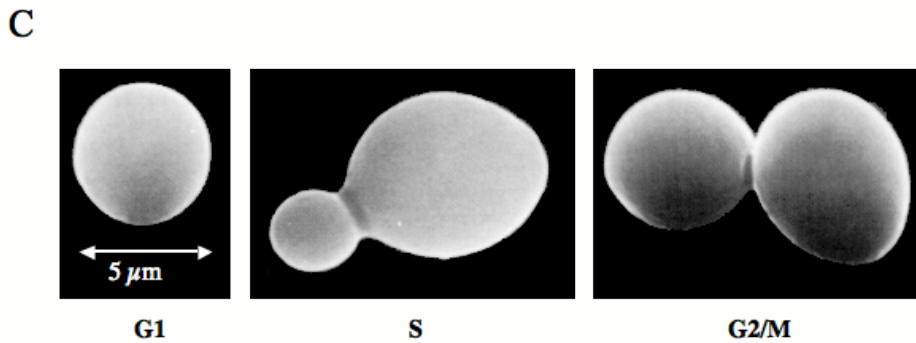
Figure n°II

A



B





**Le cycle cellulaire chez les eucaryotes et chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*.**

- A. Les quatre phases du cycle chez les eucaryotes : phase G1 (« Gap 1 »), phase S (phase de synthèse d'ADN), phase G2 (« Gap 2 ») et phase M (mitose).
- B. Le cycle cellulaire de la levure *Saccharomyces cerevisiae*. En rouge, sont indiqués différents points de blocage du cycle induits par des stress exogènes. La levure *S. cerevisiae* se divise par bourgeonnement, c'est pourquoi elle est parfois appelée levure bourgeonnante (« budding yeast »).
- C. La levure *S. cerevisiae* dans différentes phases du cycle. Les phases G2 et M sont difficiles à distinguer chez cet organisme.

### 1.1. Le ou les checkpoints de l'ADN ?

Les principales avancées faites depuis 1988 sur la compréhension des checkpoints de l'ADN concernent leur activation et leur influence sur le cycle. La reconnaissance des dommages, leurs différentes cibles, la manière dont ils sont régulés en fonction du type de dommages, leur désactivation, ... ne sont pas encore bien compris.

C'est tout d'abord l'influence sur la progression du cycle qui a été étudiée. Il a été montré très tôt que l'arrêt induit par un stress génotoxique pouvait avoir lieu en plusieurs points du cycle. Ainsi, les cellules de la levure *Saccharomyces cerevisiae* traitées aux rayons X s'arrêtent avec un gros bourgeon et un noyau situé à l'étranglement entre cellule mère et cellule fille de façon dépendante de *RAD9* (Weinert and Hartwell, 1988). Ce point d'arrêt est communément appelé « arrêt G2/M ». Le terme est vague car lorsque ce point de blocage a été identifié, le stade précis était difficile à définir. D'autres points d'arrêt distincts de celui observé en G2/M existent. Des radiations UV ou  $\gamma$  retardent la progression dans le cycle des cellules préalablement synchronisées en G1 avec de l' $\alpha$ -facteur<sup>1</sup> : on observe un délai de l'apparition du bourgeon et du début de la réplication (Siede et al., 1993). Ce délai dépend de *RAD9* et constitue un deuxième point d'arrêt : l'arrêt en G1 (Siede et al., 1993). Il a par la suite été montré qu'en cas de lésions de l'ADN survenant pendant la phase S, celle-ci subissait un ralentissement via l'inhibition du démarrage des origines tardives de réplication (Allen et al., 1994; Paulovich et al., 1997; Santocanale and Diffley, 1998; Weinert et al., 1994). Ceci constitue le troisième point de « blocage » du cycle en cas de stress génotoxique. Ces trois points d'arrêt sont assez bien conservés chez les eucaryotes, notamment chez la levure fissipare, le xénope et les cellules de mammifères. Des spécificités pour chaque organisme sont bien entendu observées.

Le mécanisme d'activation du checkpoint diffère légèrement selon le point d'arrêt notamment pour celui qui concerne les dommages intra-S. Les différences mises à jour seront

<sup>1</sup> Phéromone de la levure *Saccharomyces cerevisiae* utilisée pour synchroniser les cellules en G1.



détaillées dans la suite de l'exposé. Il semble par ailleurs assez évident que l'ensemble des cibles, encore assez mal connues à ce jour, puissent différer aussi selon le stade d'arrêt, au moins celles impliquées dans le blocage de la progression du cycle. Par ailleurs, il est aujourd'hui clair que la réponse diffère aussi selon le type de dommages subi par la cellule (adduit, « gap », cassure double-brin, pontages, ...). D'ailleurs, nous savons maintenant que si l'inhibition de la réplication ou plus précisément la présence de fourches de réplication bloquées<sup>1</sup> active des mécanismes similaires à ceux mis en jeu lors de la présence effective de dommages de l'ADN, il s'agit d'un cas un peu différent du stress génotoxique à proprement parler. Par souci de clarté, le mécanisme de surveillance mis en place pour faire face aux fourches de réplication bloquées est parfois appelé « checkpoint de la réplication ». Cependant, la séparation entre checkpoint de l'ADN et checkpoint de la réplication n'est pas encore bien appréhendée, notamment parce que l'on pense que des lésions de l'ADN en tant que telles peuvent être à l'origine du blocage de fourches de réplication mais aussi parce que ces deux types d'anomalies font intervenir de nombreuses protéines communes. De plus, il est possible que dans certains cas, ce ne soit pas la lésion en tant que telle qui active le checkpoint mais le blocage de la fourche de réplication. Seule l'utilisation de l'hydroxyurée, un agent anti-cancéreux qui inhibe spécifiquement la production de dNTP, permet de bloquer les fourches de réplication et d'activer le checkpoint de la réplication sans la présence simultanée de dommages de l'ADN. Du fait de leur accointance, les voies de réponse à un stress réplicatif et à un réel stress génotoxique sont donc souvent regroupées sous le terme générique de « checkpoints de l'ADN ».

## 1.2. Le signal

La reconnaissance des dommages, point de départ du signal, est encore assez mal comprise aujourd'hui. De nombreux agents génotoxiques sont capables d'entraîner une activation des checkpoints en engendrant des dommages de natures très différentes sur l'ADN (cassure double-brin, cassure simple-brin, perte de base, pontage entre bases, alkylation, ...). Nous ne savons pas vraiment si les checkpoints sont capables de reconnaître chaque type de lésions. Mais le fait que l'activation nécessite les mêmes protéines quel que soit le type de stress a fait naître l'idée que les dommages primaires pourraient être métabolisés en un ou plusieurs intermédiaires communs qui seraient eux détectés par les protéines « senseurs ».

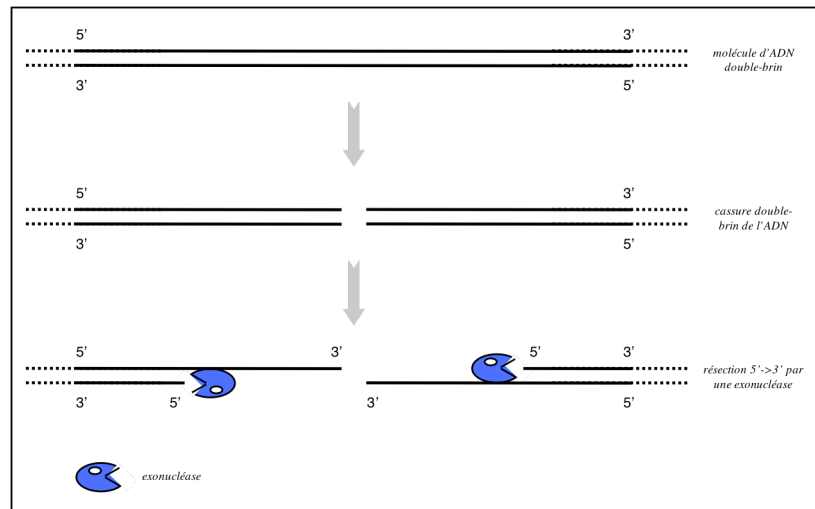
L'ADN simple-brin pourrait constituer un de ces intermédiaires. Cette structure n'existe pas sous forme nue dans la cellule : elle est couverte de molécules du complexe RPA (« Replication Protein A »). La génération de complexes ADN simple-brin-RPA pourrait être primordiale pour l'activation du checkpoint. En effet, de l'ADN simple-brin est généré suite à la maturation de nombreuses lésions. C'est le cas pour les cassures double-brin dont les extrémités subissent une résection 5'→3' (cf figure n°12). De même, de grandes quantités d'ADN simple-brin ont été observées par microscopie électronique lors d'un traitement à l'hydroxyurée chez *Saccharomyces cerevisiae* (Sogo et al., 2002). Sa formation au niveau des fourches de réplication bloquées pourrait résulter de la dissociation du replisome (découplage entre l'hélicase et la polymérase, ou entre la synthèse du brin tardif et du brin précoce, ...) (Branzei and Foiani, 2005). De plus, l'accumulation d'ADN simple-brin au niveau des télomères (comme on peut l'observer par exemple chez le mutant *cdc13-1*) entraîne l'activation du checkpoint de l'ADN (Weinert and Hartwell, 1993). Le complexe RPA possède une grande affinité pour l'ADN simple-brin et il a

---

<sup>1</sup> L'absence totale de réplication, observée par exemple en cas de déplétion du composant du complexe pré-réplicatif Cdc6, n'active pas le checkpoint de l'ADN, probablement à cause de l'absence de fourches de réplication bloquées, sites générant le signal activant le mécanisme de surveillance.

été montré que son recrutement au niveau de la chromatine augmentait suite à une irradiation UV chez les cellules de mammifères (Zou and Elledge, 2003). Le complexe RPA est même nécessaire au recrutement de certaines protéines des checkpoints en cas de stress réplcatif ou de stress génotoxique (Zou and Elledge, 2003). Il a été proposé que ce soit l'activité continue de résection plutôt que la présence d'une importante quantité d'ADN simple-brin qui soit à l'origine de l'activation et du maintien du checkpoint (Ira et al., 2004).

**Figure n°12**



**Mécanisme de résection des extrémités des cassures double-brin.**

Les extrémités des cassures double-brin peuvent subir une maturation et être dégradées par des exonucléases 5'→3'. Cette maturation fait apparaître de grandes régions d'ADN simple-brin.

## 2. Les composants des checkpoints de l'ADN

Les checkpoints de l'ADN sont considérés comme des voies de transduction du signal, constituées de protéines dites « senseurs » qui détectent les dommages, de « transducteurs » qui reçoivent et amplifient le signal et qui vont activer des « effecteurs » pour mettre en place la réponse au stress réplcatif ou génotoxique. En fait, seules les protéines clés situées en amont de ces voies et indispensables à l'activation du checkpoint ont été clairement identifiées et l'on commence à peine à bien appréhender les interactions et les dépendances des unes par rapport aux autres. Ceci a toutefois permis d'établir un modèle d'activation des checkpoints de l'ADN faisant intervenir de nombreux complexes protéiques. Ce modèle se trouve être bien conservé chez les eucaryotes et est exposé ci-après. Les noms de gènes mentionnés correspondent à ceux de notre organisme d'étude, la levure *Saccharomyces cerevisiae*. Sauf indication contraire, des homologues ont été retrouvés chez la levure fissipare, le xénope et les cellules de mammifères pour tous ces complexes et sont présentés sur la figure n°13. Des différences fonctionnelles ont toutefois été mises en évidence entre les différents organismes et feront l'objet de quelques digressions.

Figure n°I3

Class of check-point protein	<i>S. cerevisiae</i>	<i>S. pombe</i>	<i>Xenopus</i>	Mammalian
Sensors	Rad24	<b>Rad17</b>	Rad17	Rad17
	Ddc1	<b>Rad9</b>	Rad9	Rad9
	Mec3	<b>Hus1</b>	Hus1	Hus1
	Rad17	<b>Rad1</b>	Rad1	Rad1
	Mec1	Rad3	ATR	<b>ATR</b>
	Ddc2	<b>Rad26</b>	ATRIP	ATRIP
	Tel1	Tel1	ATM	<b>ATM</b>
Adaptors	Rad9	Crb2	???	BRCA1, 53BP1 ???
	Mrc1	Mrc1	<b>Claspin</b>	Claspin
Effector kinases	Rad53	Cds1	Cds1	<b>Chk2</b>
	Chk1	<b>Chk1</b>	Chk1	Chk1

Les protéines des checkpoints de l'ADN chez les eucaryotes. D'après (Melo and Toczyski, 2002). Correspondance entre gènes homologues.

### 2.1. Les complexes *Rad17/Mec3/Ddc1* ('PCNA-like') et *Rad24/Rfc2-5* ('RFC-like')

La délétion des gènes *RAD17*, *MEC3*, *DDC1* et *RAD24* confère un important défaut de checkpoint caractérisé par une déficience pour l'arrêt de la progression du cycle et une hypersensibilité aux stress génotoxiques (voire par exemple, (de la Torre-Ruiz et al., 1998)). *RAD24* montre une forte similarité de séquence avec *RFC1*, qui code pour la plus grande sous-unité du complexe RFC (« Replication Factor C »). Rad24 s'associe avec les 4 autres sous-unités de ce complexe (Rfc2, Rfc3, Rfc4 et Rfc5) (Green et al., 2000). Les protéines Rad17, Mec3 et Ddc1 quant à elles forment un autre complexe dont la structure semble similaire à celle du complexe réplicatif PCNA (« Proliferating Cell Nuclear Antigen ») (Paciotti et al., 1998; Venclovas and Thelen, 2000). Par souci de simplification, nous désignerons le complexe Rad24/Rfc2/Rfc3/Rfc4/Rfc5 'RFC-like' et le complexe Rad17/Mec3/Ddc1 'PCNA-like' par la suite. RFC est un complexe capable d'ouvrir le complexe PCNA afin que celui-ci soit chargé sur l'ADN. Ce dernier est un facteur de la réplication qui ancre les polymérase δ et ε et d'autres facteurs de la réplication sur le brin modèle. PCNA encercle l'ADN et est capable de glisser sur lui. D'après les similarités de structure, il a été imaginé très tôt que le complexe RFC-like puisse charger le complexe PCNA-like au niveau des lésions et que ces deux complexes puissent être impliqués dans la reconnaissance des dommages.

Quelques données biochimiques semblent montrer en effet que le complexe PCNA-like puisse être chargé par RFC-like sur l'ADN et glisser le long de cette structure (Majka and Burgers, 2003). Il a par ailleurs été montré que ces deux complexes agissent de façon coordonnée, les déficiences de l'un engendrant les mêmes défauts de checkpoint que les déficiences de l'autre (de la Torre-Ruiz et al., 1998; Longhese et al., 1997). De nombreuses données font penser que le complexe PCNA-like s'accumule effectivement sur les sites endommagés de façon dépendante du complexe RFC-like (Kondo et al., 2001; Melo et al., 2001; Paciotti et al., 1998). Cependant, la formation du complexe PCNA-like ne dépend pas de l'induction d'un stress génotoxique (Paciotti et al., 1998). Il a donc été proposé que ce complexe

soit chargé sur l'ADN après son ouverture par le complexe RFC-like et qu'il circule sur l'ADN à la recherche d'éventuelles lésions. Une phosphorylation de chacun des composants de ces deux complexes induite par des dommages a été observée chez la levure comme chez l'homme et semble être importante pour l'activation du checkpoint. Le rôle exact de chacune de ces phosphorylations n'est pas encore bien compris (Melo and Toczyski, 2002). Toutefois, elles pourraient favoriser les interactions entre les composants des checkpoints de l'ADN (Furuya et al., 2004).

Les complexes PCNA-like et RFC-like interviennent pour les checkpoints en G1 et en G2/M. Par contre, il n'est pas clair qu'ils soient impliqués dans le checkpoint intra-S chez *S. cerevisiae* (Paulovich et al., 1997; Vialard et al., 1998). Ils sont indispensables à l'activation de kinases clés en aval mais leur(s) rôle(s) précis reste(nt) à définir. Ils pourraient aider au recrutement des autres protéines du checkpoint ou de protéines de réparation, voire aider à la maturation des lésions.

## 2.2. Les kinases Mec1 et Tel1

Les kinases Mec1 et Tel1 sont des protéines centrales de la réponse aux dommages de l'ADN. Ces deux protéines comme leurs homologues chez les autres eucaryotes (ATR et ATM chez les mammifères, Rad3 et Tel1 chez *S. pombe*) présentent des homologies avec les kinases de la famille PI3K (« Phosphoinositide-3 Kinase ») qui phosphorylent le phosphatidyl inositol. Une signification éventuelle de cette homologie n'a pas été mise en évidence.

Mec1 forme un complexe avec Ddc2 de façon constitutive (Paciotti et al., 2000; Rouse and Jackson, 2000). Ce complexe est recruté sur les sites de dommages de façon indépendante des complexes RFC-like et PCNA-like. Ceci a été montré initialement chez *S. cerevisiae* par immunoprécipitation de la chromatine et par observation de protéines fusionnées à la GFP (« Green Fluorescent Protein ») dans le cas d'une cassure double-brin induite par une endonucléase (Kondo et al., 2001; Melo et al., 2001). Ddc2 peut se lier à l'ADN de façon indépendante de Mec1 et semble être responsable du recrutement de Mec1 sur les sites de dommages (Rouse and Jackson, 2002b). Il est probable que ce complexe se lie plus précisément à l'ADN simple-brin, comme cela a été suggéré dans le cas d'une cassure double-brin pour laquelle il a été montré que le recrutement au niveau de l'ADN était dépendant de RPA (Zou and Elledge, 2003). Dans le sens inverse, le recrutement du complexe PCNA-like ne dépend pas non plus de Mec1 (Kondo et al., 2001). Par contre, une phosphorylation de Ddc1 dépendante de Mec1 a été observée chez la levure comme chez les mammifères (Melo and Toczyski, 2002; Paciotti et al., 1998). De même, RPA et Ddc2 subissent des phosphorylations dépendantes de Mec1 après dommages (Brush et al., 1996; Paciotti et al., 2000). Mec1 est également recrutée au niveau des fourches de réplication bloquées.

Tel1 a un rôle mineur apparemment redondant avec celui de Mec1 chez *Saccharomyces cerevisiae*, et qui est seulement détectable lorsque Mec1 est inactivée. Il a toutefois été montré que Tel1 était recrutée sur les sites de cassure double-brin. Il est probable qu'elle se fixe sur l'ADN via son interaction avec la protéine Xrs2, un des composants du complexe MRX (Mre11/Rad50/Xrs2) (Nakada et al., 2003). Le complexe MRX est en plus impliqué dans la réparation et la résection des cassures double-brin, rôle qui semble indépendant de son implication dans le recrutement de Tel1 au niveau de la lésion (Nakada et al., 2003). Par ailleurs, suite à un stress génotoxique dans une souche *mec1Δ*, Mre11 et Xrs2 subissent toutes deux une phosphorylation dépendante de Tel1. Tel1/MRX semble constituer une « voie » de transmission du signal parallèle à celle de Mec1/Ddc2, et cela pas seulement dans le cas d'une cassure double-

brin (Clerici et al., 2004; Nakada et al., 2003; Usui et al., 2001). Cette « voie » agit sur les mêmes cibles en aval, à savoir les kinases Rad53 et Chk1 qui font l'objet du paragraphe suivant, mais ne fait pas intervenir les complexes RFC-like et PCNA-like (Grenon et al., 2001; Nakada et al., 2003; Usui et al., 2001).

Tel1 ne semble pas être impliquée dans la réponse au blocage des fourches de réplication. Chez les cellules de mammifères, les importances relatives d'ATR et ATM (homologues de Mec1 et Tel1) ne semblent pas être conservées. Il apparaît qu'ATM est requis pour faire face aux cassures double-brin alors qu'ATR est nécessaire à la réponse à tous types de dommages et au blocage des fourches de réplication. Les deux « voies » Mec1/Ddc2 et Tel1/MRX semblent toutefois être conservées chez l'homme et correspondent respectivement à ATR/ATRIP et ATM/MRN. L'hypothèse suivante a été émise : ATR/ATRIP serait activé via la reconnaissance du complexe ADN simple-brin/RPA alors que ATM/MRN se lierait aux extrémités des cassures double-brin (Melo and Toczyski, 2002; Nyberg et al., 2002).

### 2.3. Les kinases Chk1 et Rad53

Chk1 et Rad53 sont deux sérine/thréonine kinases qui sont, comme Mec1 et Tel1, conservées de la levure à l'homme. Cependant, leurs rôles respectifs dépendent des organismes comme nous l'avons vu pour Mec1 et Tel1. Ainsi, chez *S. pombe*, l'arrêt en G2 dépend seulement de Chk1, alors que la réponse au blocage des fourches de réplication dépend principalement de la kinase Cds1 (homologue de Rad53). Cds1 semble d'ailleurs agir spécifiquement en phase S. Chez les mammifères, il semble que Chk1 et Chk2 (homologue de Rad53) soient impliquées toutes les deux dans l'ensemble des réponses aux dommages de l'ADN et au blocage des fourches de réplication (Melo and Toczyski, 2002).

Chez *Saccharomyces cerevisiae*, Rad53 joue un rôle primordial que ce soit après des dommages de l'ADN ou en cas de fourches bloquées (Allen et al., 1994). Le rôle de Chk1 est mineur : sa délétion n'entraîne pas d'hypersensibilité aux stress génotoxiques ou réplicatifs et ne montre pas de phénotype fort. Son rôle dans les mécanismes de surveillance du génome a toutefois été mis en évidence dans le checkpoint en G2/M : Chk1 est impliquée dans le maintien de l'arrêt et il a été montré pour un stress particulier (chez le mutant *cdc13-1*) que l'abrogation totale de cet arrêt requiert l'inactivation concomitante de Rad53 et Chk1 (Liu et al., 2000; Sanchez et al., 1999). Le modèle place ainsi ces deux kinases en amont de deux voies parallèles assurant ensemble la réponse aux stress génotoxiques.

Ces kinases sont activées suite à un stress génotoxique via leur phosphorylation qui dépend de Mec1/Ddc2 et dans une moindre mesure (chez *Saccharomyces cerevisiae*) de Tel1. Rad53 subit également une phosphorylation dépendante de Mec1 en présence de fourches de réplication bloquées (Clerici et al., 2004; Rouse and Jackson, 2000; Sun et al., 1996; Vialard et al., 1998). Ces phosphorylations induites par les kinases en amont du checkpoint (Mec1/Tel1) sont conservées chez les cellules de mammifères. Dans le modèle actuel, on pense que suite à cette modification, Rad53 s'autophosphoryle *en trans*, ce qui achèverait son activation. Elle quitterait alors les sites de dommages, propagerait le signal dans la cellule et modifierait les protéines qui influent sur l'arrêt du cycle, la réparation,...

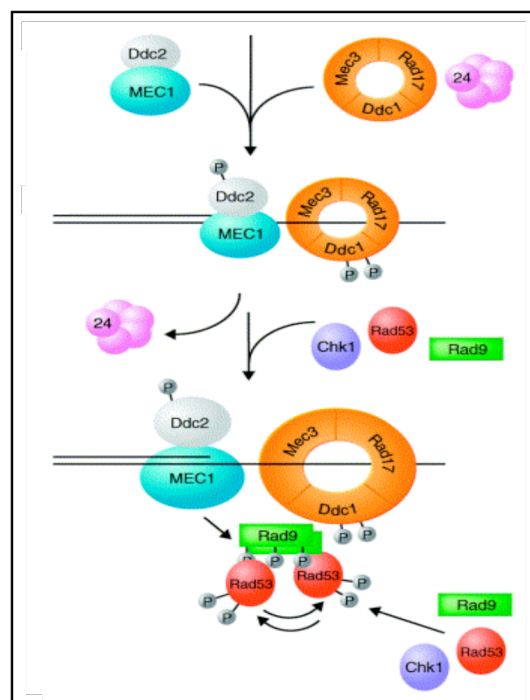
Les complexes RFC-like et PCNA-like sont requis pour une phosphorylation efficace de Rad53 suite à un stress génotoxique (Vialard et al., 1998). Le mécanisme moléculaire n'est à ce jour pas connu.

## 2.4. Les adaptateurs Rad9 et Mrc1

La protéine Rad9 est également requise pour la phosphorylation et l'activation de Chk1 et Rad53 après un stress génotoxique (Sanchez et al., 1999; Vialard et al., 1998). En fait, Rad9 est phosphorylée de manière dépendante de Mec1 (et éventuellement Tel1) (Emili, 1998), peut-être au niveau des sites de lésions. En tout cas, il a été montré qu'elle était recrutée au niveau des cassures double-brin et qu'elle interagissait avec Rad53 de façon dépendante de Mec1/Ddc2 (Naiki et al., 2004; Rouse and Jackson, 2000). Rad53 interagit préférentiellement avec les formes phosphorylées de Rad9 (Sun et al., 1998).

Ces données suggèrent que Rad9 pourrait être recrutée sur les sites de dommages via une interaction avec Mec1 qui va par ailleurs la phosphoryler. Une fois phosphorylée, Rad9 peut interagir avec Rad53 et amener cette kinase à proximité de Mec1 qui peut alors initier la phosphorylation de Rad53. L'interaction entre Rad9 et Rad53 pourrait aussi permettre d'augmenter la concentration locale de Rad53 et favoriser son autophosphorylation. La phosphorylation de Rad53 promeut sa dissociation d'avec Rad9. La kinase peut alors propager le signal à l'intérieur du noyau (Gilbert et al., 2001; Ma et al., 2006). Rad9 est ainsi considéré comme un 'adaptateur' favorisant l'activation de Rad53 et Chk1 (cf figure n°14). L'homologue de Rad9 chez les mammifères n'est pas clairement identifié, même si les protéines Brcal et 53BP1 ont toutes les deux été proposées comme homologue potentiel.

Figure n°14



**Rôle de l'adaptateur Rad9 dans l'activation du checkpoint de l'ADN. Extrait de (Melo and Toczyski, 2002).**

Modèle d'activation de Rad53 et Chk1 en cas de cassure double-brin de l'ADN. Les complexes Mec1/Ddc2 et « PCNA-like » sont recrutés de façon indépendante sur le site de la cassure. Rad9 est recrutée et phosphorylée par Mec1. Rad9 recrute alors Rad53 et permet sa phosphorylation par Mec1. Rad53 subit par la suite une autophosphorylation.

Rad9 n'intervient pas dans la réponse à un stress réplicatif, contrairement à Mec1 et Rad53. Une autre protéine semble jouer le rôle d'adaptateur entre les deux kinases en cas de blocage des fourches de réplication : il s'agit de la protéine Mrc1. Mrc1 est en effet phosphorylée de manière dépendante de Mec1 et est requise pour une phosphorylation efficace de Rad53 lors d'un traitement à l'hydroxyurée. De plus, le mutant *mrc1* est, comme le mutant *rad53*, déficient pour l'arrêt du cycle induit par un stress réplicatif (Alcasabas et al., 2001). Par contre, Mrc1 n'intervient pas dans la réponse à un stress génotoxique (Alcasabas et al., 2001). En plus de son rôle dans le checkpoint de la réplication, Mrc1 semble aussi être impliquée dans la réplication. Cette protéine est localisée au niveau des fourches de réplication pendant la phase S et progresse sur l'ADN avec elles (Katou et al., 2003). De plus, le délétant *mrc1Δ* montre un ralentissement de la phase S et une phosphorylation de Rad53 qui est dépendante de Rad9. En outre, la survie du mutant *mrc1Δ* dépend de *RAD9*. Des lésions de l'ADN surviennent donc probablement chez ce mutant pendant la phase S (Alcasabas et al., 2001). Une progression plus lente des fourches pourrait expliquer la phase S ralentie de ce mutant (Tourriere et al., 2005).

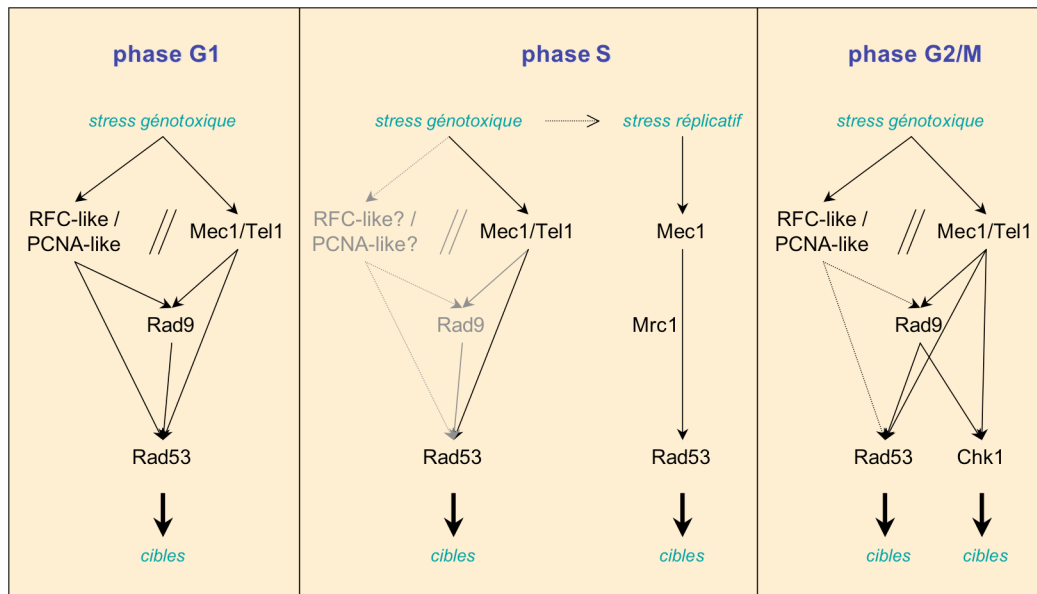
Mrc1 pourrait jouer aussi le rôle d'effecteur au sein du checkpoint. Il a en effet été montré que sa phosphorylation était en partie dépendante de Rad53 (Alcasabas et al., 2001). Un modèle d'activation a été proposé : suite au blocage d'une fourche de réplication, le complexe Mec1/Ddc2 serait recruté au niveau de l'ADN simple-brin via le complexe RPA. Mec1 pourrait alors phosphoryler Mrc1 qui est déjà au niveau de la fourche. Il s'en suivrait le recrutement et l'activation de Rad53 qui en retour achèverait de phosphoryler Mrc1 (Osborn and Elledge, 2003).

Les données testant l'influence des complexes PCNA-like et RFC-like sur l'activation de Rad9 ne permettent pas d'aboutir à une conclusion simple. La phosphorylation de Rad9 après un stress UV dépend clairement des gènes *RAD17* et *RAD24* si les cellules sont synchronisées en G1 ( $\alpha$ -facteur). La dépendance apparaît comme partielle, voire nulle si les cellules sont synchronisées en G2/M (nocodazole) avant de subir l'irradiation UV (Vialard et al., 1998) ou suite à une cassure double-brin (dommage qui engendre un blocage des cellules en G2/M) (Naiki et al., 2004). En tout cas, *RAD24* et *RAD17* sont requis pour un recrutement efficace de Rad9 au niveau de la cassure double-brin (Naiki et al., 2004). L'étude de l'arrêt induit par des radiations ultraviolettes fait penser que *RAD9* d'une part, et les gènes *RAD24*, *RAD17*, *MEC3* et *DDC1* d'autre part, constituent deux groupes d'épistasie distincts qui doivent être éliminés de façon concomitante pour avoir une abrogation totale de l'arrêt induit par un stress génotoxique (de la Torre-Ruiz et al., 1998). Certains éléments amènent ainsi à penser que Rad9 et Rad17/Rad24 agissent en parallèle alors que d'autres font penser que l'activation de Rad9 dépend des complexes RFC-like et PCNA-like. Il est possible que cela dépende de la phase du cycle. Cependant, on peut se demander si les synchronisations artificielles à l'aide de drogue ou de phéromone sont vraiment représentatives de la réalité des phases d'un cycle non perturbé et quel biais elles peuvent amener. J'ai d'ailleurs montré au cours de ma thèse que le traitement au nocodazole, qui est censé bloquer les cellules en G2/M était capable de modifier la réponse aux stress génotoxiques. De plus, l'étude des protéines des checkpoints lors de la réponse à un stress génotoxique sur une population de cellules préalablement synchronisée en phase S avec de l'hydroxyurée (Vialard et al., 1998) doit certainement être prise avec précaution puisque certaines de ces protéines interviennent pour la réponse au stress réplicatif et sont donc certainement déjà localisées au niveau de l'ADN.

## 2.5. Le modèle

La figure n°15 présente un modèle d'activation des checkpoints selon la phase du cycle et selon le type de stress (génétoxique ou réplcatif) pour la levure *Saccharomyces cerevisiae*. Ce modèle n'est pas immuable et possède encore des zones d'ombre. Il faut en effet garder à l'esprit que l'étude pratique d'un seul de ces stress dans une phase donnée du cycle est très difficile. L'interprétation des données publiées est donc parfois délicate.

Figure n°15



**Les protéines des checkpoints de l'ADN intervenant dans la réponse aux stress génotoxique ou réplcatif selon la phase du cycle.**

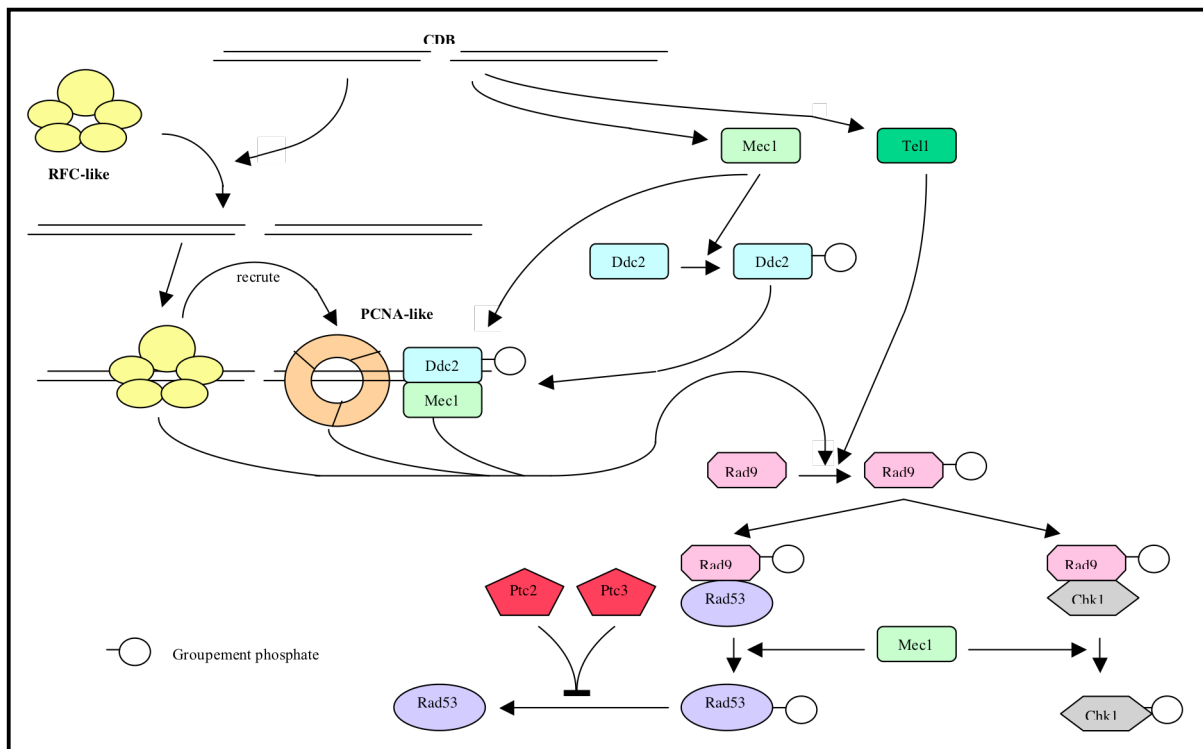
Ce schéma indique les protéines impliquées dans la réponse aux stress génotoxique ou réplcatif selon la phase du cycle. Il s'agit d'un modèle construit à partir des données bibliographiques actuellement disponibles. Les parties grisées correspondent aux éléments méritant encore quelques éclaircissements. Les parties en pointillé correspondent à des éléments peu sûrs.

Pour simplifier, les checkpoints de l'ADN sont considérés comme une voie de transduction du signal avec, en amont des transducteurs, les kinases « PI3K-like » (Mec1 et Tel1) qui semblent fonctionner en complexe avec Ddc2 et MRX respectivement et qui transmettent le signal aux kinases effectrices Rad53 et Chk1 à l'aide des adaptateurs Rad9 et Mrc1 (cf, pour exemple, figure n°16).

Le nombre de sites de phosphorylation pour chacune des protéines Rad53, Rad9 et Mrc1 est très important (Naiki et al., 2004; Osborn and Elledge, 2003; Smolka et al., 2005; Sweeney et al., 2005). Il est probable, notamment pour Rad53, que les résidus phosphorylés dépendent du stress génotoxique. Ces différences pourraient affecter le comportement de la kinase, par exemple via la modification de sa ou ses surfaces d'interaction et orienter la réponse selon le stress subi.



Figure n°16

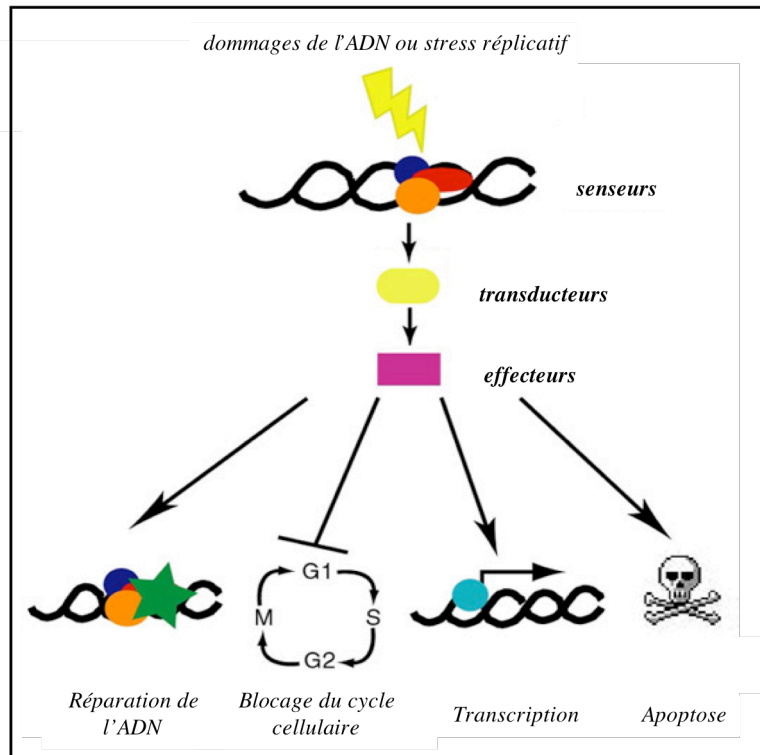


Modèle d'activation du checkpoint de l'ADN en G2/M en cas de cassure double-brin de l'ADN.

### 3. Les réponses induites par l'activation des checkpoints de l'ADN

Le checkpoint induit différents mécanismes en réponse aux dommages de l'ADN, comme l'arrêt ou le ralentissement du cycle et la stabilisation des fourches de réplication bloquées. Il a aussi été montré que suite à l'activation du checkpoint, l'expression de certains gènes était modifiée et que l'apoptose pouvait être induite chez les cellules de mammifères. On pense également que le checkpoint influence les voies de réparation (cf figure n°17). En fait, seul ce qui concerne l'activation du checkpoint est assez bien décrypté à ce jour, par contre on ne sait pas encore vraiment comment le checkpoint agit. En effet, très peu de cibles de Rad53 et Chk1 ont été identifiées.

Figure n°17



**Les réponses engendrées par l'activation des checkpoints de l'ADN. D'après (Zhou and Elledge, 2000).**

La voie de transduction constituée de protéines dites « senseurs », de « transducteurs » et d'« effecteurs » est activée en cas de dommages de l'ADN ou de stress réplicatif. Cette voie influence les mécanismes de réparation de l'ADN, la progression du cycle cellulaire, l'expression de certains gènes et peut induire l'apoptose chez les mammifères.

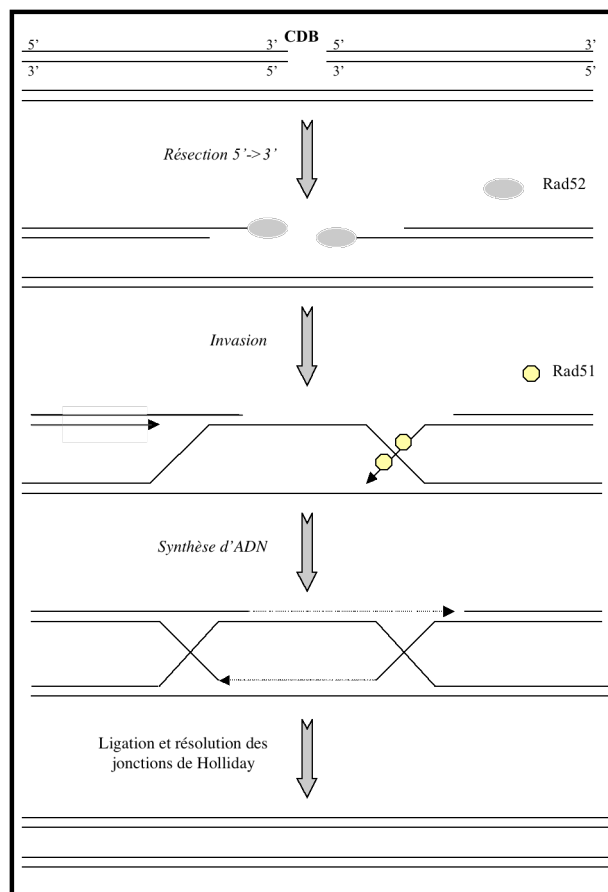
### 3.1. Arrêts du cycle

Cet événement induit en cas d'activation du checkpoint a été le premier observé et c'est lui qui a permis de mettre en évidence la présence du système de contrôle que constituent les mécanismes de surveillance de l'ADN. Il a tout d'abord été suggéré que l'arrêt ou le ralentissement de la progression cellulaire permettait d'avoir un laps de temps supplémentaire pour la réparation des lésions et qu'il était interrompu lorsqu'il n'y avait plus de dommage. Cette idée reposait sur le fait que l'hypersensibilité du mutant *rad9* aux rayons X soit complètement supprimée si les cellules de ce mutant sont maintenues artificiellement en G2/M pendant 4 heures (par ajout d'un inhibiteur de la polymérisation des microtubules) (Weinert and Hartwell, 1988). Cependant, la suppression de la létalité par un blocage artificiel en G2/M n'est pas observée dans le cas d'une irradiation UV (Aboussekhra et al., 1996). La résistance aux UV du mutant *rad9* n'est pas non plus augmentée si l'on bloque les cellules artificiellement en G1 avec de l' $\alpha$ -facteur. Au contraire, la sensibilité de la souche sauvage et du mutant *rad9* est même exacerbée dans ces conditions (Siede et al., 1993). De même, la survie des cellules AT n'augmente pas même si l'on bloque artificiellement leur cycle (Rotman and Shiloh, 1999). À l'inverse, le

délétant *chk1Δ*, qui montre un défaut dans le maintien de l'arrêt induit par une irradiation  $\gamma$  ou une irradiation UV, n'est pas hypersensible à ces stress génotoxiques (Liu et al., 2000; Sanchez et al., 1999). La corrélation entre arrêt du cycle et survie après un stress génotoxique est donc loin d'être évidente. On peut toutefois imaginer que les blocages du cycle empêchent l'accumulation éventuelle de dommages.

L'importance des différents points d'arrêt dépend des organismes et du type de dommages. Par exemple, en présence de cassures double-brin, la levure *Saccharomyces cerevisiae* bloque le cycle en G2/M. Cette phase est un moment propice pour la réparation par recombinaison (cf figure n°18), mécanisme principal de réparation des cassures double-brin chez cet organisme, puisque la chromatide sœur est alors présente. Les cellules de mammifères, quant à elles, bloquent le cycle plutôt en G1 en présence de ce type de dommages qu'elles répareront plutôt par le mécanisme de NHEJ<sup>1</sup> (« Non Homologous End Joining »).

**Figure n°18**



**Le mécanisme de réparation d'une cassure double brin de l'ADN par recombinaison homologue.**  
 Les extrémités de la cassure double brin (CDB) sont résectées de 5' vers 3'. Rad51 se lie à l'ADN simple-brin et le nucléofilament ainsi formé localise la séquence homologue avec laquelle l'appariement aura lieu. La synthèse d'ADN, la ligation et la résolution des jonctions de Holliday permettent l'achèvement de la réparation.

### 3.1.1. L'arrêt en G1

L'arrêt en G1 est très important chez les cellules de mammifères. La protéine p53 joue un rôle essentiel dans ce checkpoint : elle est requise pour l'arrêt induit par un stress génotoxique et pour l'apoptose qui peut en résulter. En cas de dommages, on observe une accumulation de la protéine p53 dépendante d'ATM/ATR, ce qui entraîne l'induction transcriptionnelle de p21 et inhibe ainsi le complexe Cdk2/Cycline E nécessaire à l'entrée en phase S. p53 est la seule protéine des checkpoints qui soit souvent mutée dans les cancers sporadiques (Nyberg et al., 2002).

Chez *Saccharomyces cerevisiae*, l'arrêt en G1 a tout d'abord été mis en évidence à l'aide de cellules synchronisées à l' $\alpha$ -facteur. Si l'on traite ces cellules aux UV, au MMS<sup>2</sup> ou avec des rayons  $\gamma$ , on observe un retard de l'initiation de la réplication. Les cellules ainsi endommagées diffèrent également l'émergence du bourgeon, la duplication du SPB (« Spindle Pole Body ») et sont sensibles plus longtemps à l' $\alpha$ -facteur, ce qui suggère que le passage de Start est reculé (Gerald et al., 2002; Sidorova and Breeden, 1997; Siede et al., 1993). Ce retard dépend des gènes *MEC1*, *RAD53*, *RAD9* et *RAD24* (Sidorova and Breeden, 1997; Siede et al., 1993). Il est moins conséquent que l'arrêt en G2/M : il ne dure pas longtemps et l'on pense que les cellules reprennent le cycle alors que les dommages ne sont pas complètement réparés (Nyberg et al., 2002; Wysocki et al., 2006). La réplication s'avère être en effet plus lente que lors d'un cycle normal par la suite (Sidorova and Breeden, 1997). L'arrêt en G1 ne semble d'ailleurs pas avoir beaucoup d'influence sur la viabilité cellulaire (Wysocki et al., 2006). Le checkpoint en G1 empêche la progression en phase S en inhibant l'activité des complexes Cdc28/Clb : on observe en effet un retard de l'augmentation d'activité Cdc28/Clb suite à un stress génotoxique en G1 (Wysocki et al., 2006). Cette inhibition semble résulter de la stabilisation de Sic1, un inhibiteur des complexes Cdc28/Clb, et de l'inhibition des complexes Cdc28/Cln (Wysocki et al., 2006). Les mécanismes permettant la régulation de cet arrêt sont assez mal connus. Toutefois, il a été montré qu'en cas de dommages de l'ADN en G1, le facteur de transcription Swi4/Swi6 subit une phosphorylation dépendante de *RAD53*. Cette phosphorylation permet de maintenir un faible taux pour les cyclines G1 Cln1 et Cln2, et donc une faible activité Cdc28/Cln (Sidorova and Breeden, 1997) (cf figure n°112, cette figure sera décrite ultérieurement). Le défaut d'activité Cdc28/Cln dans les cellules en G1 concourt également à la stabilisation de Sic1 en empêchant sa phosphorylation et donc sa dégradation (Wysocki et al., 2006).

Le checkpoint en G1 peut être considéré comme un moyen de favoriser la réparation des dommages de l'ADN avant que la réplication n'ait lieu et que des complications éventuelles ne surviennent suite au passage des fourches.

### 3.1.2. La phase S

Le modèle exposé dans le chapitre précédent propose qu'au cours de la phase S les checkpoints puissent être activés soit par un stress génotoxique (checkpoint de l'ADN intra-S), soit par un stress répliatif (checkpoint de la réplication). Le stress répliatif est étudié le plus souvent via le traitement des cellules à l'hydroxyurée (drogue inhibant la RiboNucléotide

<sup>1</sup> Au cours du NHEJ, les deux extrémités de la cassure sont reliées directement de manière plus ou moins fidèle.

<sup>2</sup> Le MMS ou méthyl méthane sulfonate est un agent génotoxique qui alkyle les bases de l'ADN. Ces lésions sont entre autres réparées par excision de base.

Réductase) qui limite le pool de dNTP. On observe alors un ralentissement de la progression des fourches (Sogo et al., 2002). La distinction entre stress génotoxique et stress répliatif est ténue. En effet, les fourches de réplication peuvent aussi être ralenties ou bloquées suite à leur collision avec des dommages de l'ADN, obstacles physiques à leur progression. Ainsi, le MMS est un agent alkylant qui engendre un fort ralentissement de la réplication. Il est donc difficile de découpler les deux checkpoints. D'autant plus que des éléments tendent à montrer que des événements dépendants de la réplication pourraient être requis pour générer le signal reconnu par le checkpoint en phase S. Ainsi, une fourche de réplication doit être établie pour que le checkpoint soit activé suite à un traitement au MMS (Tercero et al., 2003).

Chez le mutant *rad53*, lors d'un traitement à l'hydroxyurée, les fourches s'effondrent rapidement et l'on observe alors une accumulation de « gaps » et de molécules hémirépliquées (Sogo et al., 2002). De l'ADN simple-brin couvert de RPA est aussi présent, bien qu'en quantité plus restreinte, chez la souche sauvage (Sogo et al., 2002). Le mécanisme conduisant à la génération de cet ADN simple-brin n'est pas clairement défini. Il est possible qu'en présence d'hydroxyurée, l'intégralité de la machinerie de réplication ait tendance à progresser alors que la synthèse d'ADN est défectueuse voire inexistante et que ce phénomène soit accentué dans les mutants du checkpoint (Katou et al., 2003). Il a aussi été proposé que l'ADN simple-brin apparaisse suite au découplage entre l'hélicase et la polymérase ou entre la synthèse du brin tardif et celle du brin précoce (Branzei and Foiani, 2005). En tout cas, cet ADN simple-brin pourrait être à l'origine de l'activation du checkpoint qui en retour empêcherait son accumulation (Sogo et al., 2002), ainsi que la dissociation du réplisome voire l'effondrement de la fourche. On pense par ailleurs que le checkpoint engendre une inhibition des enzymes de recombinaison pour éviter la formation d'intermédiaires toxiques de recombinaison (Branzei and Foiani, 2005). Un des rôles majeurs du checkpoint réside dans sa capacité à stabiliser les fourches bloquées afin que celles-ci puissent redémarrer si les conditions cellulaires redeviennent favorables.

Mrc1 semble être nécessaire à ce redémarrage (Tourriere et al., 2005). Elle empêche aussi le découplage entre la synthèse d'ADN et la machinerie de réplication (Katou et al., 2003). Lors d'un traitement à l'hydroxyurée, Rad9 est recrutée au niveau des régions répliquées chez le mutant *mrc1* mais pas chez la souche sauvage. Il se peut donc que les structures d'ADN générées par ce découplage activent le checkpoint en G2/M (Katou et al., 2003). Les fourches semblent s'effondrer chez le mutant *rad53* mais pas chez le mutant *mrc1* (Tourriere et al., 2005). Le mutant *rad53* accumule des structures d'ADN pathologiques lors d'un stress répliatif (Lopes et al., 2001; Sogo et al., 2002).

Si le principal rôle du checkpoint en phase S est de maintenir la stabilité des fourches et de permettre leur redémarrage si le stress disparaît, d'autres événements observés après un stress répliatif dépendent également des protéines Mec1, Rad53 et Mrc1 (Alcasabas et al., 2001; Osborn and Elledge, 2003; Santocanale and Diffley, 1998; Tourriere et al., 2005; Weinert et al., 1994). Ainsi, l'élongation du fuseau est inhibée et les cellules s'arrêtent avec un noyau non divisé. Le checkpoint empêche aussi l'initiation des origines tardives de réplication. Le déclenchement des origines précoces n'est pas inhibé mais la progression de la fourche est ralentie après l'initiation, de façon toutefois indépendante du checkpoint. Comme le signal activant le checkpoint provient de fourches bloquées, il paraît logique que l'initiation des origines précoces ne soit pas affectée (Santocanale and Diffley, 1998). Le blocage des origines tardives de réplication pourrait s'effectuer via une phosphorylation par Rad53 de Dbf4/Cdc7, kinase requise pour l'activation de toutes les origines de réplication (Nyberg et al., 2002).

### 3.1.3. L'arrêt en G2/M

Le point exact d'arrêt en G2/M dépend des organismes. Chez *Saccharomyces cerevisiae*, les cellules ayant subi un stress génotoxique sont arrêtées à la transition métaphase/anaphase alors que pour les cellules de mammifères et pour la levure fissipare, la présence de lésions empêche l'entrée en mitose. Chez *S. cerevisiae*, l'arrêt en G2/M est le premier point de blocage qui a été mis en évidence et c'est certainement celui dont les mécanismes sont les mieux décryptés. Ainsi, des cellules de levure traitées aux rayons X arrêtent leur progression dans le cycle à un stade où elles ont un gros bourgeon, un ADN répliqué, un fuseau non allongé et un noyau situé à l'étranglement entre la cellule-mère et la cellule-fille (Weinert and Hartwell, 1988). Le checkpoint inhibe l'avancée dans le cycle en jouant en même temps sur plusieurs mécanismes contrôlant la progression de la mitose. Deux cibles ont déjà été clairement identifiées à ce jour : il s'agit de la sécurine Pds1 et de la GAP (« GTPase Activating Protein ») Bub2/Bfa1.

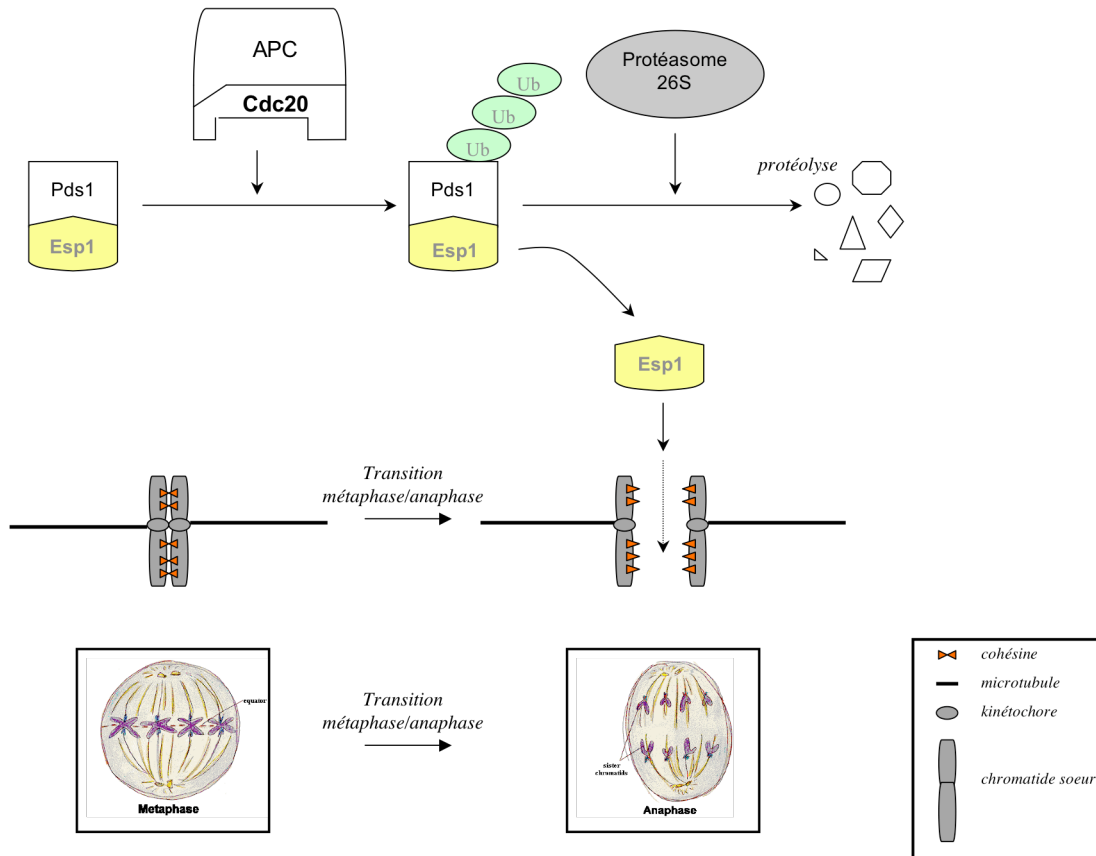
#### 3.1.3.1. Régulations de la transition métaphase/anaphase et de la sortie de mitose

En métaphase, les chromatides sœurs sont maintenues attachées l'une à l'autre grâce à un complexe : la cohésine. Ce complexe, chargé sur l'ADN au cours de la réplication, doit être clivé pour que les chromatides sœurs puissent être tirées vers les pôles chacune de leur côté lors de l'anaphase. C'est la protéase Esp1 qui joue ce rôle et clive la sous-unité Scc1/Mcd1 du complexe cohésine. La séparase Esp1 est maintenue inactive pendant une grande partie du cycle via son association avec la sécurine Pds1. Pds1 est une protéine qui s'accumule au cours du cycle et qui est dégradée juste avant l'anaphase. À la transition métaphase/anaphase, Pds1 est ubiquitinylée par l'ubiquitine ligase APC<sup>1</sup>, ce qui entraîne sa dégradation et libère Esp1. Esp1, devenue ainsi active peut cliver Scc1 et la ségrégation des chromatides sœurs via la traction par le fuseau peut alors avoir lieu (cf figure n°19). Pds1 joue un double rôle vis-à-vis d'Esp1 et peut également être considéré comme un régulateur positif d'Esp1 : en effet, Pds1 s'associe à Esp1 en phase S et cible Esp1 vers le noyau. Or, cette localisation nucléaire d'Esp1 est essentielle à sa fonction.

---

<sup>1</sup> L'APC ou « Anaphase Promoting Complex » est une E3 ubiquitine ligase composée de plusieurs sous-unités.

Figure n°19

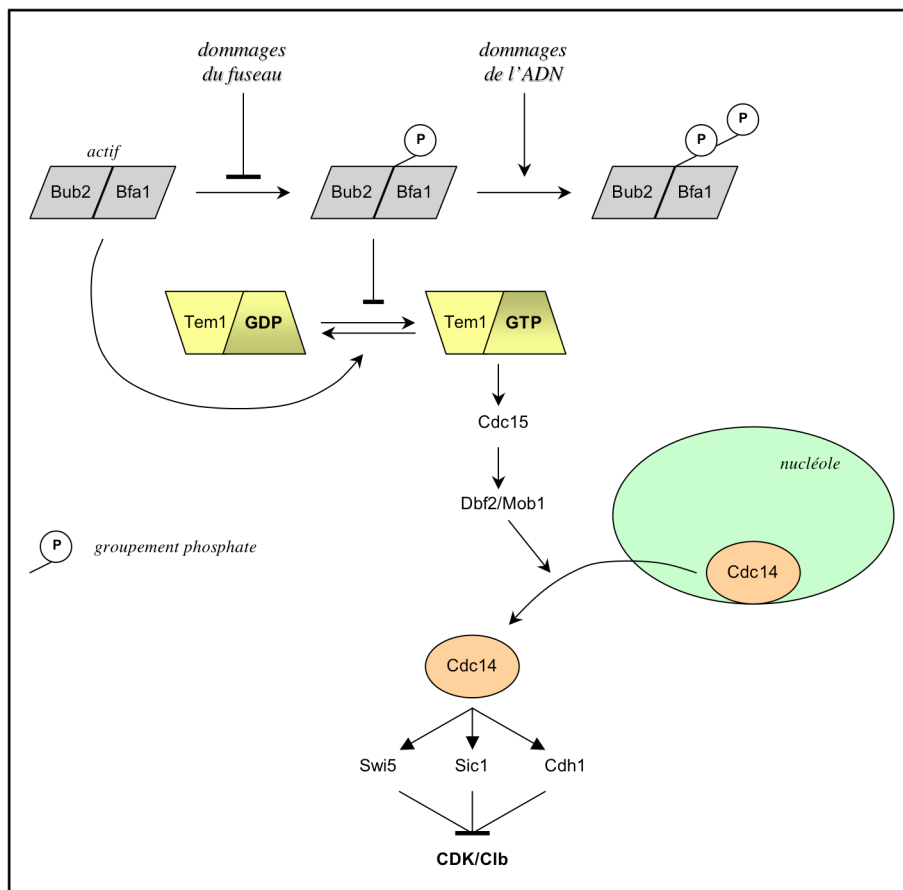


**La dégradation de Pds1 et la transition métaphase/anaphase.**  
 À la transition métaphase/anaphase, la sécrine Pds1 est ubiquitinylée par le complexe APC/Cdc20 et dirigée vers le protéasome. La dégradation de Pds1 active la séparase Esp1 qui était inhibée par son interaction avec Pds1. Esp1 clive la cohésine, qui maintient les chromatides sœurs attachées. Ceci permet la ségrégation des chromatides sœurs vers les pôles du fuseau.

La GAP Bub2/Bfa1 fait partie du réseau MEN (« Mitotic Exit Network ») qui induit la sortie de mitose via l'inactivation des CDKs mitotiques (« Cyclin-Dependent Kinase »). Cette inactivation engendre un désassemblage du fuseau et la cytokinèse. Le MEN comprend entre autres les protéines Cdc15, Lte1, Mob1, Dbf2, Tem1 et Cdc14. Tem1 est une GTPase régulée et maintenue inactive pendant une grande partie du cycle par Bfa1/Bub2. La conversion de Tem1 localisée au SPB (« Spindle Pole Body ») et liée au GDP en une forme liée au GTP permet son activation. Tem1 active par la suite Cdc15 qui phosphoryle Mob1/Dbf2. Ceci contribue en partie au relargage de la phosphatase Cdc14 du nucléole. Cdc14 va alors pouvoir déphosphoryler d'une part Cdh1 et activer ainsi l'ubiquitination de la cycline mitotique Clb2 par APC/Cdh1, et d'autre part Sic1, un inhibiteur des complexes Clb/Cdk et son facteur de transcription Swi5. Ces deux mécanismes concourent ensemble à la chute de l'activité Cdk nécessaire à la sortie de mitose (cf figure n°110). Tem1 est localisée au SPB. Lorsque les cellules passent l'anaphase, le SPB entre dans le bourgeon où est localisée la GEF Lte1 (« Guanine Nucleotide Exchange Factor »). Lte1 convertit alors Tem1GDP en Tem1GTP couplant ainsi la fin de l'anaphase et la sortie de mitose.

L'APC est donc requise pour la dégradation de plusieurs protéines au cours de la mitose. Ce complexe est régulé en partie via les facteurs de spécificité Cdc20 et Cdh1. Ainsi, APC/Cdc20 est responsable de la dégradation de Pds1 et de la première phase de dégradation de Clb2 en début d'anaphase, qui conduit à l'activation du MEN, alors que APC/Cdh1 intervient pour la seconde phase de dégradation de Clb2. En tout cas, la délétion de *PDS1* permet d'outrepasser l'arrêt à la transition métaphase/anaphase des mutants *apc* suggérant que la dégradation de Pds1 constitue la fonction principale de l'APC dans l'initiation de l'anaphase. Cdc20 est activée tôt en mitose et est impliquée dans l'ubiquitination de plusieurs régulateurs du cycle comme Pds1, Clb2 mais aussi Clb5. Quant à Cdh1, elle est inactive au moment où Pds1 est dégradée à cause d'une phosphorylation inhibitrice par Cdc28/Clb. Elle devient active en anaphase, après que Pds1 ait été dégradée et son activité est nécessaire à l'ubiquitination des substrats d'APC en fin de mitose et en G1. De même, Sic1 est inhibée via une phosphorylation dépendante des Cdk et ne peut s'accumuler que lorsqu'elle est déphosphorylée par Cdc14.

Figure n°110



**Le réseau MEN est ciblé en cas de dommages du fuseau ou de dommages de l'ADN.**

La conversion de Tem1 de sa forme liée au GDP en une forme liée au GTP est nécessaire à la sortie de mitose. Cette conversion active le réseau MEN et permet le relargage de Cdc14 du nucléole. Cdc14 peut alors activer les voies conduisant à l'inactivation des complexes Cdk/Clb et donc à la sortie de mitose.



### 3.1.3.2. Le checkpoint de l'ADN et Pds1

L'implication de Pds1 dans l'arrêt du cycle induit par un stress génotoxique a été principalement mise en évidence via l'étude du mutant *cdc13-1*. Cdc13 est une protéine télomérique dont l'inactivation à l'aide de l'allèle thermosensible *cdc13-1* entraîne l'accumulation d'ADN simple-brin au niveau des télomères et l'activation du checkpoint de l'ADN en G2/M. Pds1 est requis pour empêcher la division cellulaire chez le mutant *cdc13-1* à température restrictive et dans une souche sauvage après une irradiation  $\gamma$  (Yamamoto et al., 1996b). Cependant, le double mutant *cdc13-1 pds1* montre tout de même un arrêt résiduel en G2/M. L'arrêt est complètement aboli dans le triple mutant *cdc13-1 rad53 pds1* suggérant que Pds1 est impliquée principalement dans une voie parallèle à celle de Rad53 (Gardner et al., 1999). L'arrêt résiduel en G2/M du mutant *cdc13-1 pds1* est en fait similaire à celui des mutants *cdc13-1 chk1* et *cdc13-1 chk1 pds1* (Sanchez et al., 1999).

Il a par ailleurs été montré que Pds1 était stabilisée chez le mutant *cdc13-1* alors que Pds1 est normalement dégradée au cours d'une mitose non perturbée. Or, la dégradation de Pds1 est nécessaire à la séparation des chromatides sœurs et à l'initiation de l'anaphase (Cohen-Fix et al., 1996; Yamamoto et al., 1996a). La stabilisation de Pds1 est supprimée chez les mutants *cdc13-1 mec1* et *cdc13-1 rad53 chk1* et partiellement supprimée chez le mutant *cdc13-1 chk1* (Sanchez et al., 1999). La stabilisation de Pds1 semble donc nécessiter principalement Chk1 mais aussi Rad53.

L'activation du checkpoint semble engendrer la stabilisation de Pds1 via deux mécanismes :

1. Suite à un stress génotoxique (mutation *cdc13-1*, rayonnements UV ou  $\gamma$ ), Pds1 est phosphorylée de manière dépendante de *MEC1*, *RAD9* et *CHK1* mais de manière indépendante de *RAD53* (Cohen-Fix and Koshland, 1997; Sanchez et al., 1999). C'est probablement la kinase Chk1 qui phosphoryle Pds1 directement (Sanchez et al., 1999; Wang et al., 2001). Cette phosphorylation est importante pour bloquer le cycle chez le mutant *cdc13-1*. Elle semble contribuer à la stabilisation de Pds1 puisque les protéines mutées pour les sites de phosphorylation putatifs sont dégradées en présence de dommages de l'ADN contrairement à la protéine sauvage (Wang et al., 2001). Il a par ailleurs été montré *in vitro* que l'ubiquitination de Pds1 par APC/Cdc20 est réduite si Pds1 est phosphorylée (Agarwal et al., 2003). La mutation des sites de phosphorylation de Pds1 engendre des défauts de checkpoint comparables à ceux induits par la délétion de *CHK1*. Ces défauts peuvent cependant être parfois moindres que ceux obtenus avec la délétion de *PDS1* (Wang et al., 2001).
2. Après une irradiation  $\gamma$ , on observe une perte d'interaction entre Cdc20 et Pds1 dépendante de *MEC1* et *RAD53*, mais indépendante de *CHK1*. Ceci montre que la voie dépendante de Rad53 est également impliquée dans la stabilisation de Pds1 lors d'un stress génotoxique (Agarwal et al., 2003). Ceci expliquerait le fait que la stabilisation de Pds1 soit partiellement supprimée si l'on délète *CHK1* et qu'elle le soit complètement dans le double mutant *rad53 chk1* $\Delta$  (Sanchez et al., 1999). Cela permettrait aussi d'expliquer pourquoi le phénotype du délétant *pds1* $\Delta$  est parfois plus fort que celui des mutants des sites de phosphorylation (Wang et al., 2001)

### 3.1.3.3. Le checkpoint de l'ADN et Bub2/Bfa1

L'arrêt en G2/M suite à un stress génotoxique est également caractérisé par une forte activité Cdk. La délétion de *CHK1* ne semble pas avoir d'influence forte sur cette activité. Par contre, il a été montré que Rad53 était nécessaire à son maintien chez le mutant *cdc13-1* (Sanchez et al., 1999).

Nous rappelons que Bub2/Bfa1 est une GAP qui régule négativement Tem1 et plus généralement la voie MEN. Bub2/Bfa1 inhibe par conséquent l'inactivation des complexes Cdk-Clb, donc la sortie de mitose. Les mutants *cdc13-1 bub2* et *cdc13-1 bfa1* rerépliquent leur ADN et rebourgeonnent à température restrictive contrairement au mutant *cdc13-1*. Pourtant ces trois mutants ne montrent pas d'élongation du fuseau, ce qui est en accord avec le fait que Pds1 s'accumule de manière identique dans ces trois souches (Wang et al., 2000). La mutation de *TEM1* par contre bloque la sortie de mitose du mutant *cdc13-1 bub2 bfa1* montrant que c'est bien une activation inappropriée du MEN qui permet à ces cellules de sortir de mitose (Wang et al., 2000). On peut d'ailleurs faire remarquer que la surexpression de *SIC1* permet au mutant *cdc13-1* de rebourgeonner (Wang et al., 2000). Bub2 et Bfa1 semblent donc être requis pour empêcher la sortie de mitose mais pas pour empêcher la séparation des chromatides sœurs suite à un stress génotoxique (Wang et al., 2000).

Bfa1 est phosphorylée au cours du cycle de manière dépendante de *BUB2* et les formes phosphorylées s'accumulent en mitose (Hu et al., 2001). Mais Bfa1 subit d'autres événements de phosphorylation en cas de dommages de l'ADN (étude chez le mutant *cdc13-1*) et on peut alors distinguer sur gel des formes de Bfa1 hyperphosphorylées, qui sont d'ailleurs dépendantes de Rad53 (Hu et al., 2001) (cf figure n°I10).

### 3.1.3.4. Le modèle

Suite à un stress génotoxique, le checkpoint de l'ADN freine la progression cellulaire en inhibant la transition métaphase/anaphase et la sortie de mitose. On pourrait imaginer que le second point d'arrêt (sortie de mitose) ne soit qu'une simple conséquence de la non-progression depuis le premier (transition métaphase/anaphase) mais cela ne semble pas être le cas puisque la présence de dommages de l'ADN inhibe la destruction de Clb2 dans des cellules arrêtées après la séparation des chromatides sœurs (Tinker-Kulberg and Morgan, 1999). De même, Pds1 n'est pas dégradé chez le double mutant *cdc13-1 bub2* (Wang et al., 2000). Il apparaît donc que des mécanismes moléculaires disjoints inhibent la dégradation de Pds1 et l'inactivation des complexes Cdc28-Clb. Ainsi, l'inactivation de Pds1 ou de Bub2-Bfa1 affaiblissent, sans le supprimer totalement, l'arrêt en G2/M induit par des lésions de l'ADN.

L'inhibition de la séparation des chromatides sœurs en cas de stress génotoxique semble elle aussi être le résultat de deux mécanismes : d'une part, la phosphorylation de Pds1 par Chk1 inhibe la réaction d'ubiquitylation de Pds1 par APC/Cdc20 et d'autre part la voie Rad53 inhibe l'interaction entre Cdc20 et Pds1. Ces deux mécanismes concourent à la stabilisation de Pds1 en cas de dommages de l'ADN même si l'action médiée par Chk1 semble être le mécanisme le plus important pour empêcher le début de l'anaphase.

Seule la voie du checkpoint dépendante de Rad53 semble être impliquée dans le maintien d'une forte activité kinase Cdk, via l'inhibition du MEN. Cependant, il a été montré que Pds1 inhibait dans une certaine mesure la dégradation de la cycline Clb2, peut-être à la fois de façon dépendante et indépendante de son action sur Esp1 (Tinker-Kulberg and Morgan, 1999). Ainsi, le mutant *pds1Δ* irradié avec un rayonnement  $\gamma$  maintient difficilement un fort taux de Clb2 et une

forte activité Cdk/Clb2 contrairement à la souche sauvage. Ce phénotype est supprimé si on inactive Cdc20 (Tinker-Kulberg and Morgan, 1999). La stabilisation de Pds1 pourrait donc conduire à l'inhibition de la séparation des chromatides sœurs et dans une certaine mesure au blocage de la sortie de mitose, suggérant un rôle, même faible, pour Chk1 dans le blocage de la sortie de mitose.

Les mécanismes moléculaires responsables de l'arrêt du cycle en G2/M en présence de lésions de l'ADN sont loin d'être totalement élucidés. Par exemple, il a été montré chez le mutant *cdc13-1* que Cdc20 s'accumulait et qu'elle était phosphorylée de manière dépendante de la kinase PKA. Cette phosphorylation pourrait inhiber l'interaction Cdc20/Clb2 et être en partie responsable du maintien de l'activité Cdk-Clb en cas de stress génotoxique (Searle et al., 2004).

### 3.1.3.5. L'arrêt en G2/M chez les autres organismes

La présence de lésions de l'ADN chez les cellules de mammifères et chez la levure fissipare n'engendre pas un arrêt à la transition métaphase/anaphase mais inhibe l'entrée en mitose. Chez *S. pombe*, le checkpoint retarde la déphosphorylation de la tyrosine 15 de la Cdk Cdc2 qui reste alors inactive et ne peut induire l'entrée en mitose (Foiani et al., 2000). La phosphorylation de ce résidu est régulée par la kinase Wee1 et la phosphatase Cdc25. Le checkpoint empêche l'entrée en mitose à la fois en inhibant la phosphatase et en activant la kinase.

Chez les cellules de mammifères, le mécanisme d'arrêt est très similaire et semble résulter uniquement du maintien d'un complexe Cdk1-cycline B inactif qui empêche l'entrée en mitose. Ce maintien est en partie dû à des phosphorylations inhibitrices sur Cdk1 résultant de l'action de plusieurs voies en parallèle. Entre autres effets, le checkpoint inhibe les phosphatases Cdc25 (Cdc25A, Cdc25B, Cdc25C) en induisant leur phosphorylation. Ces phosphorylations conduisent à la fixation des Cdc25 par la protéine 14-3-3, ce qui les inactive. Les dommages conduisent aussi à la rétention des cyclines B dans le cytoplasme (Nyberg et al., 2002).

## 3.2. Induction transcriptionnelle

L'induction transcriptionnelle de plusieurs gènes est observée lors d'un stress génotoxique ou réplicatif. Par exemple, les gènes codant pour les sous-unités de la ribonucléotide réductase sont induits lors de traitements à l'hydroxyurée ou au MMS. Cette induction dépend des gènes *RAD53* et *DUN1* (Allen et al., 1994; Zhou and Elledge, 1993). Dun1 est une protéine kinase qui est phosphorylée de manière dépendante de *RAD53* et agit dans la voie dépendante de Rad53 en cas de dommages de l'ADN ou de fourches de réplication bloquées (Allen et al., 1994; Gardner et al., 1999; Zhou and Elledge, 1993). Les gènes *DUN1* et *RAD53* sont également induits lors d'un stress génotoxique (Aboussekhra et al., 1996; Allen et al., 1994). Certains gènes codant pour des protéines impliquées dans la réparation font partie de l'ensemble des gènes dont l'expression est induite par la présence de lésions de l'ADN, comme *RAD51* et *RAD54* (HR), *RAD2*, *RAD16* et *RAD23* (NER), *RAD18* (PRR), *PMS1* (MMR)... Cette induction dépend de *RAD9* (Aboussekhra et al., 1996). Ainsi, il a été proposé que le rôle de cette induction transcriptionnelle soit de faciliter la réparation des lésions et la synthèse *de novo* d'ADN et de favoriser ainsi la survie des cellules.

Toutefois, deux études ont montré qu'il n'existait pas de corrélation entre les gènes induits transcriptionnellement après un stress génotoxique donné et les gènes dont la délétion entraîne une hypersensibilité à ce même stress (Birrell et al., 2002; Chang et al., 2002). L'impact

de la réponse transcriptionnelle sur la survie des cellules n'est donc pas immédiat. Par ailleurs, il est difficile de savoir quelle est la part de gènes induits spécifiquement par le checkpoint. Ainsi, même si plusieurs études indiquent que l'expression de *RAD51* augmente suite à un stress génotoxique, il a aussi été montré qu'elle augmente lorsque les cellules sont bloquées en G2/M à l'aide d'un inhibiteur de la polymérisation des microtubules (Aboussekhra et al., 1996). L'induction observée après l'activation du checkpoint de l'ADN en G2/M résulte donc probablement de deux effets, l'un étant réellement contrôlé par le checkpoint, l'autre résultant de l'arrêt en G2/M. On peut donc supposer que certaines inductions décrites ne soient pas spécifiques de la réponse aux dommages de l'ADN. Ainsi, l'expression du gène *UBI4*, codant pour l'ubiquitine, augmente lors d'un traitement au MMS mais ceci de façon indépendante de *RAD53* et *DUN1* (Allen et al., 1994; Zhou and Elledge, 1993). Le gène *UBI4* est en fait induit lors de divers stress cellulaires, notamment lors d'un choc thermique. Des analyses par puce à ADN ont été conduites pour essayer d'éliminer ces biais et de connaître les gènes dont l'expression est spécifiquement modifiée en présence de lésions de l'ADN. Les taux de transcrits d'environ 2000 gènes changent après un traitement au MMS ou des radiations ionisantes (au moins multiplié ou divisé par 2) (Gasch et al., 2001). Mais après recoupement avec d'autres types de stress comme le choc thermique, avec le profil obtenu pour des mutants des protéines du checkpoints, pour des arrêts du cycle induits de manière artificielle mais sans lésion de l'ADN, l'induction transcriptionnelle spécifiquement induite par un stress génotoxique ne semble concerner qu'un tout petit nombre de gènes. L'ensemble suivant a été proposé : *RNR2*, *RNR4*, *DUN1*, *RAD51*, *RAD54*, *DIN7*, *PLM2*, *YER004W*, *ALG14* (Gasch et al., 2001). Ces gènes sont également induits en cas de traitement au 4-NQO<sup>1</sup>, à l'hydroxyurée ou avec un rayonnement ultraviolet et l'augmentation de leur expression ne dépend pas du point d'arrêt (Gasch et al., 2001). Rad51 et Rad54 sont impliquées dans la réparation par recombinaison et Rnr2 et Rnr4 sont des sous-unités de la ribonucléotide réductase (RNR). Il a été montré pour les gènes *RNR* que l'induction résultait de l'inhibition du répresseur transcriptionnel Crt1 (Huang et al., 1998). Le fait que les gènes de la RNR soient induits est en accord avec l'augmentation des quantités de dNTP observée lors d'un stress génotoxique puisque la RNR est l'enzyme qui catalyse l'étape limitante de la synthèse des dNTP. En fait, l'activité de la RNR est étroitement contrôlée par les protéines des checkpoints de l'ADN en présence comme en absence de lésions de l'ADN.

### 3.3. Réparation

Les liens entre checkpoints de l'ADN et voies de réparation sont encore mal appréhendés, mais l'on pense que le checkpoint permet d'augmenter l'efficacité de la réparation. Par ailleurs, les protéines de la réparation semblent parfois être nécessaires à la maturation de certaines lésions comme les cassures double-brin, événement requis pour leur reconnaissance par le checkpoint. Les protéines de la réparation pourraient donc jouer un rôle en amont et en aval des checkpoints de l'ADN.

Les checkpoints de l'ADN favorisent la réparation via différents mécanismes. Tout d'abord, leur activation engendre une augmentation des concentrations en dNTP et des arrêts ou ralentissements du cycle. Ceci permet probablement aux systèmes de réparation d'agir dans des conditions plus favorables. L'activation des checkpoints est également à l'origine de l'induction transcriptionnelle de certains gènes codant pour des protéines de la réparation, comme c'est le cas

<sup>1</sup> Le 4-NQO ou 4-nitroquinoline 1-oxide est un agent génotoxique qui induit des lésions principalement réparées par la voie NER.

de façon systématique pour Rad51 et Rad54 (recombinaison homologue) (cf ci-dessus). Il est probable que les checkpoints régulent aussi l'activité de certaines protéines de la réparation. Il a été montré par exemple que Rad55 était phosphorylée de manière dépendante de Mec1 lors d'un stress génotoxique ou d'un stress répliatif (Bashkirov et al., 2000). Rad55 agit en complexe avec Rad57 et promeut avec l'aide de Rad52 le remplacement sur l'ADN simple-brin de RPA par Rad51, engageant la lésion dans la réparation par recombinaison homologue. Cette phosphorylation n'est pas requise pour le rôle de Rad55 dans la recombinaison mais il a été montré qu'elle était nécessaire pour assurer la réplication en cas de traitement au MMS (Herzberg et al., 2006). Par ailleurs, on observe une induction de la recombinaison homologue en cas de stress génotoxique. Le mutant *mec1* est défectueux pour cette induction même si l'on impose un arrêt artificiel pour ces cellules (Bashkirov et al., 2000). Ainsi, l'ensemble de ces éléments suggèrent que la recombinaison homologue est activée en présence de lésions de l'ADN de manière dépendante des checkpoints, peut-être en partie via la phosphorylation de Rad55. Rad55 jouerait alors le rôle de cible des checkpoints mais ne jouerait pas de rôle dans l'activation des checkpoints puisque le délétant *rad55A* ne montre pas de défaut d'arrêt du cycle ou d'induction transcriptionnelle en cas de stress génotoxique (Bashkirov et al., 2000).

De même, l'hélicase Srs2 est phosphorylée en phase S de manière dépendante de *DUN1* lors d'un traitement au MMS ou à l'hydroxyurée (Liberi et al., 2000). Srs2 est une hélicase qui semble être capable de dissocier Rad51 de l'ADN simple-brin, inhibant ainsi la recombinaison homologue. De plus, il a été montré que l'activation des checkpoints entraînait une réorganisation des complexes auxquels s'associe Srs2 (Chiolo et al., 2005). Srs2 pourrait donc être une autre cible des checkpoints.

D'autres protéines de la réparation sont phosphorylées suite à des dommages de l'ADN de manière dépendante des checkpoints, comme Mre11, Xrs2, Rad51 et RPA. Certaines de ces protéines ont un rôle dans l'activation du checkpoint et l'on ne sait pas si ces modifications post-traductionnelles affectent leurs rôles dans la réparation et/ou dans le checkpoint (résumé dans (Herzberg et al., 2006)). Ces modifications pourraient cependant être révélatrices d'un contrôle des voies de réparation par les checkpoints de l'ADN. On peut ainsi imaginer que le checkpoint favorise le recrutement des protéines intervenant dans les systèmes de réparation.

Les checkpoints semblent donc agir sur les systèmes de réparation. Inversement, il apparaît que les complexes de la réparation soient capables d'influer sur l'activation des checkpoints de l'ADN, par exemple en recrutant des protéines du checkpoint ou en intervenant dans la maturation des lésions, étape nécessaire pour générer le signal. Ainsi, RPA et MRX sont des complexes impliqués dans les voies de réparation mais ils sont aussi nécessaires au recrutement de Mec1 et Tel1 et à la maturation de la cassure (Branzei and Foiani, 2006). De même, les cellules *rad14* déficientes pour le NER ne sont pas capables d'activer le checkpoint après une irradiation UV en G1 et en G2. Rad14 serait ainsi requise pour les étapes initiales conduisant à l'activation du checkpoint. En fait, il semble que la lésion doive être métabolisée par le NER pour que le checkpoint soit activé (Giannattasio et al., 2004; Neecke et al., 1999). Dans une souche déficiente pour le NER, qui subit des dommages induits par une irradiation UV en G1, un checkpoint n'est activé qu'au moment où les cellules entrent en phase S, à savoir le checkpoint de la réplication dépendant de *RAD53* et *MEC1* (Neecke et al., 1999). Par ailleurs, il a été montré que Rad14 interagit avec le complexe PCNA-like et qu'elle est nécessaire au recrutement de Ddc1 et Ddc2 sur l'ADN suite à des radiations UV (Giannattasio et al., 2004). La voie de réparation par excision de nucléotide semble donc être nécessaire à la maturation de la lésion, étape requise pour que celle-ci puisse activer le checkpoint.

Il était difficilement compréhensible que les protéines du checkpoint puissent reconnaître directement toutes les sortes de lésions de l'ADN qui peuvent survenir. Le fait que les protéines de la réparation puissent être nécessaires aux étapes précoces de l'activation des checkpoints, soit la reconnaissance des dommages, permet de résoudre ce problème.

Enfin, il apparaît que certaines protéines du checkpoint sont potentiellement impliquées directement dans la réparation (Nyberg et al., 2002). Une étude indique par exemple qu'en G2/M, suite à des radiations ionisantes, des formes non phosphorylées de Rad9 s'associent à la chromatine, vraisemblablement après que Rad9 ait joué son rôle dans l'activation du checkpoint. De plus, dans ces conditions, il a été montré à l'aide d'expériences d'électrophorèse en champ pulsé, que Rad9 était requise pour une réparation efficace du génome. Il a ainsi été suggéré que Rad9 possède un second rôle distinct de celui mis en jeu dans l'activation des checkpoints et qu'elle est nécessaire au bon déroulement de la recombinaison homologe (Toh et al., 2006). Une implication de Crb2, homologue de Rad9 chez *S. pombe*, dans la réparation par recombinaison a également été proposée (Caspari et al., 2002).

### 3.4. Les foci

En présence de cassures double-brin, un grand nombre de protéines de la réparation et des checkpoints, comme Rad51, Rad52, Rad53, Mre11, RPA, Ddc1, Ddc2, Rad9, Tel1 et Rad24, sont relocalisées et passent d'un signal nucléaire diffus à une localisation subnucléaire en foci distincts. Ces foci colocalisent avec les cassures et les régions d'ADN simple-brin. Plusieurs cassures double-brin semblent pouvoir se concentrer au niveau d'un seul focus, ce qui peut paraître paradoxalement dangereux puisque cela favorise probablement des événements de recombinaison entre les différentes extrémités. Ces foci sont considérés comme des centres de réparation et/ou d'activation des checkpoints. Cependant, leur rôle potentiel dans la réponse aux cassures double-brin n'est pas connu à ce jour. Des foci apparaissent également en absence de dommage et sont probablement constitués suite à l'apparition de lésions spontanées.

En plus d'apporter de nouveaux éléments d'information sur les checkpoints, l'étude des foci permet de confirmer le modèle d'activation qui a déjà été établi. Ainsi, de nombreuses remarques concernant ces foci sont en accord avec l'hypothèse des deux voies constituées d'une part par Mec1/Ddc2/RPA/PCNA-like et d'autre part par Tel1/MRX et sont également en accord avec les différentes dépendances entre protéines des checkpoints déjà mises en évidence au cours d'études génétiques (Lisby et al., 2004) :

- Les foci Mre11 et Tel1 sont formés de façon indépendante des foci RPA.
- Les foci Ddc1, Rad24 et Ddc2 colocalisent toujours avec un focus RPA.
- Les foci Ddc1 ne sont plus visibles chez les mutants *mec3Δ* et *rad24Δ*.
- Les foci Rad24 sont indépendants de *MEC3*.
- Les foci Rad9 et Rad53 ne sont plus visibles chez le double mutant *mec1 tell*, mais sont seulement partiellement affectés chez les simples mutants correspondants.
- Les foci Rad9 sont indépendants de *RAD53*. Par contre, les foci Rad53 dépendent de *RAD9*.
- Les foci Tel1 dépendent des gènes codant pour les sous-unités du complexe MRX.

L'étude de la cinétique d'apparition des foci spontanés ou des foci induits par un rayonnement  $\gamma$  révèle que ce sont les foci Mre11 qui apparaissent en premier, suivis des foci Ddc1 et Ddc2. Puis, apparaissent les foci Rad52 alors que de façon concomitante disparaissent

ceux de Mre11 (Lisby et al., 2004). Les localisations de Mre11 et Rad52 sur les sites des dommages pourraient être mutuellement exclusives. Par contre, les foci Ddc1 et Ddc2 restent visibles après la disparition des foci Mre11, suggérant que le checkpoint reste activé pendant la réparation. Chez des mutants de la résection des extrémités 5' des cassures double-brin ou chez les mutants *rad52Δ*, *rad24Δ* ou *mec1Δ*, les foci Mre11 et Tel1 sont désassemblés plus tardivement, peut-être à cause du défaut de réparation (Lisby et al., 2004). Par ailleurs, les foci Rad52 co-localisent toujours avec les foci Mre11, Ddc1, Ddc2, Rad53, Rad24 et Rad9, l'inverse n'étant pas vrai, ce qui suggère que Rad52 et la recombinaison homologue sont bien activées par le checkpoint (Lisby et al., 2004). L'analyse des foci montre également que l'intégralité de la machinerie de recombinaison est recrutée sur les sites de dommages de façon dépendante de Rad52 via son interaction avec RPA (Lisby et al., 2004). Ceci est en accord avec le rôle central de Rad52 dans la réparation par recombinaison homologue.

Ainsi, le premier complexe recruté au niveau des cassures double-brin serait le complexe MRX qui se lie directement au niveau des extrémités de la cassure. Il recrute Tel1. Une fois l'extrémité 5' de la cassure dégradée, RPA se fixe sur l'ADN simple-brin, ce qui conduit par la suite au recrutement de Mec1/Ddc2 et de RFC-like/PCNA-like. Le checkpoint est alors activé et recrute la machinerie de réparation par recombinaison homologue au niveau des cassures.

## 4. La désactivation des checkpoints de l'ADN

### 4.1. Les phénomènes d'adaptation et de rétablissement

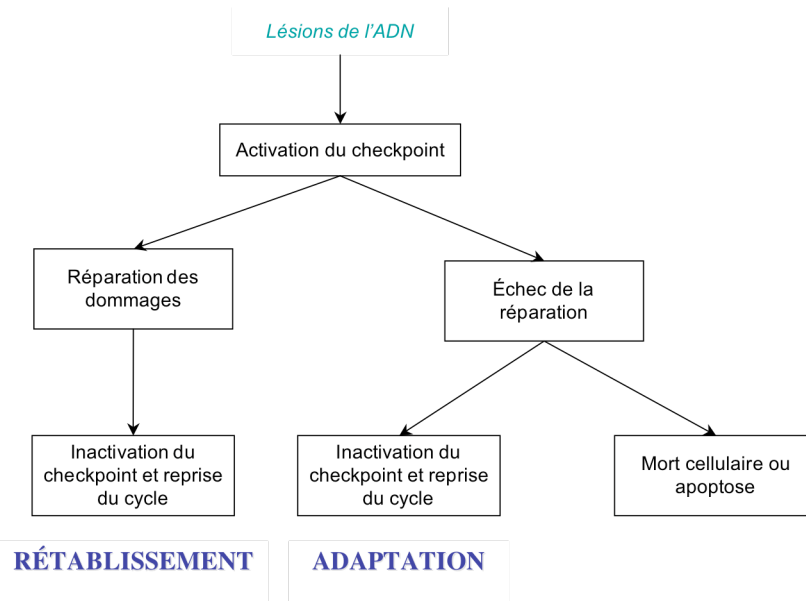
#### 4.1.1. Introduction

Chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*, suite à un stress génotoxique, les checkpoints de l'ADN sont activés, comme on peut le constater en suivant l'état de phosphorylation de la kinase Rad53. La progression cellulaire va alors être stoppée. La sortie de cet arrêt peut avoir lieu dans deux cas distincts (cf figure n°I11) :

- Les lésions ont été réparées. La division cellulaire peut alors reprendre. Ce phénomène est appelé phénomène de « rétablissement ».
- Les dommages n'ont pas été réparés. Dans ce cas-là, il arrive parfois que les cellules reprennent tout de même le cycle de division. Il s'agit du phénomène d'« adaptation ». On parle d'adaptation seulement s'il a été montré que le stress induisait tout d'abord un arrêt du cycle puis que les cellules ont échappé à cet arrêt alors que des dommages sont toujours présents.

Le phénomène d'adaptation n'est pas spécifique de la voie de transduction du signal qui constitue le checkpoint de l'ADN. Il a également été constaté pour d'autres voies cellulaires. En fait, l'adaptation rend ces voies moins sensibles à un signal donné lorsque les cellules y sont exposées de façon continue d'où la terminologie employée : les cellules s'adaptent à un stimulus donné.

Figure n°I11



**Les phénomènes d'adaptation et de rétablissement.**

#### 4.1.2. Identification du phénomène d'adaptation chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*

L'adaptation a principalement été observée et caractérisée chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*. Trois systèmes différents ont été utilisés pour son étude :

1. Le premier système a été mis au point par L.Sandell et V.Zakian et a permis de mettre en évidence l'existence de ce phénomène. Il permet l'induction d'une cassure double-brin unique sur un chromosome surnuméraire non essentiel (Sandell and Zakian, 1993). Cette coupure est générée par l'endonucléase HO dont l'expression a été placée sous le contrôle d'un promoteur inductible par le galactose. Le site HO naturel au locus *MAT* a été éliminé, et un site artificiel pour cette endonucléase a été placé près d'un télomère sur un chromosome VII surnuméraire.

Ainsi, l'ajout de galactose dans le milieu de culture induit la formation de la cassure double-brin et entraîne un arrêt de la progression cellulaire dépendant de *RAD9*, ce qui montre que les checkpoints de l'ADN sont bien activés par ce système (Sandell and Zakian, 1993). Malgré cette lésion, les cellules forment des colonies viables sur galactose, ce qui montre qu'elles ont repris le cycle de division après l'arrêt imposé par le checkpoint. L'étude de ces colonies a permis de constater que 30% des cellules avaient repris le cycle alors que la cassure n'était pas réparée, répliquant et ségrégeant le chromosome endommagé pendant parfois 10 générations avant de le perdre par défaut de ségrégation ou dégradation (Sandell and Zakian, 1993). En ce qui concerne les autres cellules, les auteurs ont constaté que le dommage avait été réparé par ajout d'un nouveau télomère par recombinaison homologue (Sandell and Zakian, 1993). Ainsi, cette lésion sur un chromosome non essentiel qui engendre un arrêt temporaire n'affecte pas la viabilité des cellules : celles-ci forment des colonies viables que le chromosome endommagé soit perdu ou



non. La création de cette cassure double-brin unique n'entraîne donc pas un arrêt irréversible du cycle et n'est pas létale en tant que telle. Les auteurs ont par ailleurs remarqué que les cellules qui reprennent la division cellulaire en présence du chromosome cassé ne montrent pas d'arrêt dans les cycles suivants. Les cellules ne sont donc plus sensibles au stimulus et ne réactivent pas leurs checkpoints de l'ADN. Pour résumé, la création d'une seule cassure double-brin engendre un arrêt en G2/M chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* via l'activation des checkpoints de l'ADN. Les cellules peuvent toutefois échapper à l'arrêt et reprendre le cycle même si elles n'ont pas réparé le dommage (Sandell and Zakian, 1993; Toczyski et al., 1997).

Dans l'expérience précédemment décrite, 70% des cellules parviennent à réparer la lésion : la formation d'une colonie viable dans ce cas-là correspond donc au phénomène de rétablissement. Si l'on veut que la reprise du cycle ne puisse avoir lieu autrement que via le phénomène d'adaptation, il faut empêcher la réparation. C'est pourquoi, le gène *RAD52*, essentiel pour le processus de recombinaison homologue, a été systématiquement délété par les équipes qui ont repris le système pour étudier l'adaptation (Toczyski et al., 1997). Les cellules ainsi modifiées forment toujours majoritairement des colonies viables sur galactose, ce qui confirme qu'elles peuvent reprendre le cycle de division en l'absence de réparation de la coupure (Sandell and Zakian, 1993). Certaines de ces cellules perdent rapidement le chromosome endommagé, mais d'autres le conservent pendant quelques générations (Toczyski et al., 1997).

2. Un second système d'étude de l'adaptation assez proche du premier permet également d'induire une cassure double-brin unique, mais cette fois au niveau du site HO naturel au locus *MAT* situé sur le chromosome III (Lee et al., 1998). Ce site permet à la levure d'effectuer son changement de type sexuel et la cassure est, dans ce cas-là, réparée efficacement par recombinaison homologue à l'aide de deux loci donneurs, les loci *HML* et *HMR*. L'expression de l'endonucléase HO est à nouveau placée sous le contrôle d'un promoteur inductible par la galactose. Pour rendre la lésion irréparable et étudier l'adaptation, on peut déléter *RAD52* ou éliminer les deux loci donneurs. Il a été montré dans ce cas-là que seule une cellule sur 1000 survit, via une réparation de la cassure par le mécanisme de NHEJ qui a altéré le site HO. Les autres cellules doivent adapter pour pouvoir reprendre le cycle cellulaire. Dans la suite de l'étude, les équipes ont utilisé une souche où les deux loci donneurs ont été éliminés (Lee et al., 1998).

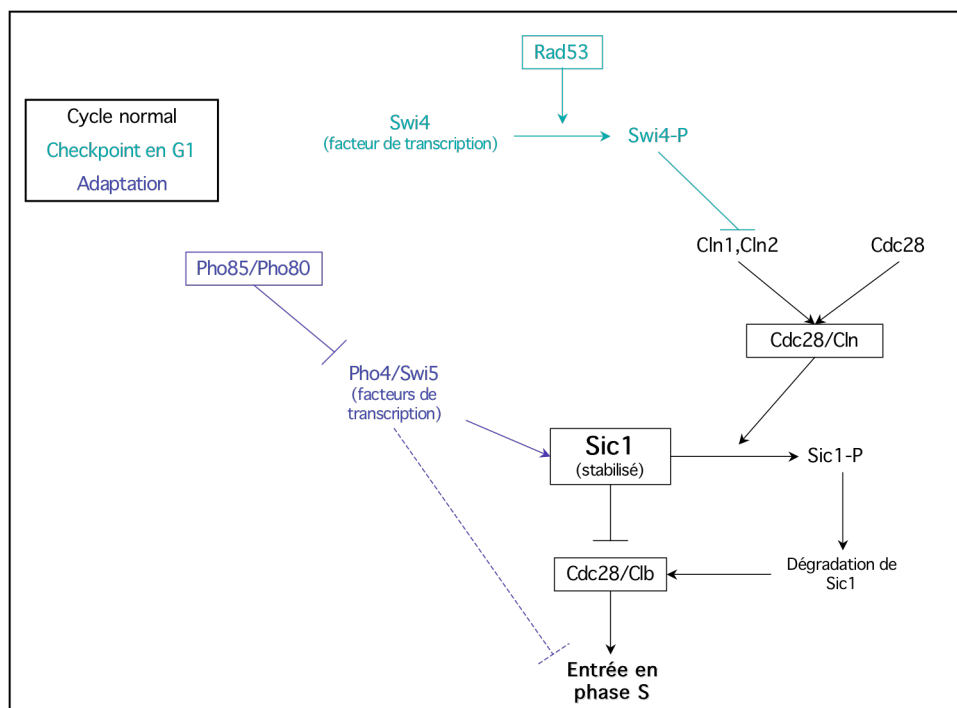
Après ajout de galactose dans le milieu de culture, on observe comme précédemment un arrêt du cycle en G2/M dépendant de *RAD9* et *RAD17* qui dure environ 8 heures. Puis les cellules reprennent le cycle 12 heures environ après l'induction de la coupure. Les cellules effectuent quelques divisions avant que toute croissance ne cesse (à cause de la dégradation de gènes essentiels sur le chromosome cassé) et forment des microcolonies de 3 à plus de 8 cellules (Lee et al., 1998).

3. L'analyse du mutant *cdc13-1* constitue le troisième moyen d'étudier l'adaptation. Cdc13 est une protéine nécessaire au maintien de l'intégrité des télomères. À température restrictive, les extrémités télomériques ne sont plus protégées et sont dégradées. On observe alors une accumulation d'ADN simple-brin au niveau des télomères, qui est détectée par les checkpoints de l'ADN, responsables de l'arrêt en G2/M observé dans ces cellules (Garvik et al., 1995; Weinert and Hartwell, 1993). Les dommages persistent tant que les cellules sont maintenues à température restrictive. On peut alors suivre la réponse cellulaire à ce stimulus permanent. Comme dans le cas de la cassure HO et malgré la présence continue de dommages, les cellules ne restent pas bloquées de façon définitive après l'activation du checkpoint et reprennent leur cycle. En effet, les cellules arrivent à former des microcolonies à température

restrictive (Toczyski et al., 1997). Ce système constitue un moyen différent de la cassure HO pour confirmer d'éventuels résultats concernant le mécanisme général d'adaptation.

La cassure double-brin, comme la mutation *cdc13-1*, engendre un arrêt en G2/M. Mais le phénomène d'adaptation a également été observé pour le checkpoint en G1. Il a été constaté qu'après un arrêt transitoire, les cellules ayant subi un stress génotoxique en G1 entrent en phase S en dépit de dommages de l'ADN toujours présents (Wysocki et al., 2006). La cinétique de sortie de l'arrêt en G1 semble même être indépendante de la réparation (Wysocki et al., 2006).

Figure n°I12



**Pho85/Pho80 promeut l'adaptation en G1.**

Le checkpoint en G1 empêche la progression en phase S en inhibant l'activité des complexes Cdk/Clnb. Pho85/Pho80 promeut l'adaptation en promouvant entre autres la dégradation de Sic1.

Nous avons vu que la protéine Sic1 est stabilisée dans les cellules en G1 dont l'ADN est endommagé (Wysocki et al., 2006). Sic1 est un inhibiteur des complexes Cdc28/Clnb : sa dégradation promeut l'activation de ces complexes et ainsi le démarrage de la réplication. Mais la stabilisation de Sic1 ne perdure pas et Sic1 finit par être dégradée (Wysocki et al., 2006). Le complexe CDK/cycline Pho85/Pho80 serait responsable de cette dégradation et du phénomène d'adaptation qui en résulte (cf figure n°I12). En effet, l'inactivation de Pho85 retarde la dégradation de Sic1 et l'augmentation d'activité Cdc28/Clnb normalement observée. Ces cellules montrent alors un arrêt prolongé en G1 suite à des radiations ionisantes ou à des UV,

contrairement à la souche sauvage qui arrive à reprendre le cycle et à progresser en phase S (Wysocki et al., 2006). Pho85/Pho80 phosphoryle et inhibe les facteurs de transcription Pho4 et Swi5, qui activent l'expression de Sic1. Pho85 promeut ainsi la diminution de la quantité de Sic1 et l'activation des complexes Cdc28/Clb. L'effet de Pho85 sur la progression d'un cycle non perturbé est mineur, la régulation de Sic1 étant principalement contrôlée par Cdc28/Cln qui phosphoryle Sic1 et induit sa dégradation. Toutefois suite à des dommages, l'activité Cdc28/Cln est inhibée (Sidorova and Breeden, 1997), ce qui permet probablement à Pho85 de réguler de façon majeure la stabilité de Sic1 dans ces conditions.

## 4.2. Quelques éléments sur le mécanisme moléculaire

### 4.2.1. La désactivation des protéines du checkpoint de l'ADN

L'état de phosphorylation des kinases Rad53 et Chk1 et de l'adaptateur Rad9, protéines impliquées dans le checkpoint en G2/M, a été suivi après l'induction d'une cassure double-brin unique et irréparable générée par l'endonucléase HO.

Suite à l'activation du checkpoint, Rad53 est phosphorylée et activée. Ceci n'a lieu seulement qu'une à deux heures après induction de la cassure HO (Pellicioli et al., 2001). Cette activation est maximale 6 à 8 heures après ajout de galactose. Mais elle décline par la suite de façon concomitante avec la reprise du cycle, suggérant que Rad53 est inactivée au moment de l'adaptation (Pellicioli et al., 2001). Il est intéressant de noter que la cassure est effectuée dans presque toutes les cellules seulement une demi-heure après ajout de galactose, alors que Rad53 n'est activée qu'environ une heure et demie après. La réparation normale de la cassure par conversion de gènes au locus *MAT* à l'aide des loci *HML* et *HMR* est effective après une heure environ. Dans ce cas-là, Rad53 n'est pas activée (Pellicioli et al., 2001). Le checkpoint ne semble donc pas être activé immédiatement, ce qui suggère que la cassure en elle-même n'est pas suffisante pour l'activer (Pellicioli et al., 2001). Il est probable qu'elle doive subir une maturation avant de pouvoir constituer un signal qui déclenche le checkpoint. Ainsi, la cassure HO s'avère être un dommage assez particulier puisque la phosphorylation de Rad53 après un stress UV est déjà visible 10 minutes après l'irradiation. L'activation de Rad53 et du checkpoint est également très rapide lors par exemple d'un traitement au MMS ou à l'hydroxyurée.

Après induction de la cassure HO, Chk1 est également phosphorylée et sa cinétique de phosphorylation est identique à celle de Rad53 : les formes phosphorylées sont visibles une à deux heures après l'ajout de galactose, leur abondance est maximale après 6 à 8 heures puis elles disparaissent au moment même où les cellules adaptent et reprennent le cycle de division (Pellicioli et al., 2001). Il en est de même pour la cinétique de phosphorylation de Rad9 (Leroy et al., 2003).

### 4.2.2. Les mutants d'adaptation

De nombreux mutants ont été caractérisés comme étant des « mutants d'adaptation », c'est-à-dire qu'ils sont défectueux pour ce phénomène. Suite à des dommages, l'arrêt du cycle dû au checkpoint est mis en place, les kinases du checkpoint sont activées normalement mais ces mutants sont incapables d'inactiver le checkpoint et de reprendre le cycle en présence d'un signal continu contrairement à la souche sauvage (Lee et al., 1998; Lee et al., 2001b; Lee et al., 2003; Leroy et al., 2003; Toczyski et al., 1997; Vaze et al., 2002).

Après cassure HO, ces mutants restent bloqués de façon permanente en G2/M et ne

forment pas de colonies ou microcolonies selon le test (sur galactose ou à température restrictive). Les mutants *cdc5-ad*, *ckb1Δ*, *ckb2Δ*, *ptc2Δ*, *ptc3Δ*, *yku70Δ*, *tid1Δ*, *rad51Δ* et *srs2Δ* sont ainsi défectueux pour l'adaptation. Les protéines affectées chez ces mutants feront l'objet de quelques commentaires dans le chapitre Résultats et Discussion de ce manuscrit, la caractérisation de leur défaut d'adaptation y sera également présentée de façon plus détaillée. Il a été montré qu'au moment où la souche sauvage adapte et où les formes phosphorylées de Rad53 disparaissent, on observe au contraire chez ces mutants une phosphorylation et une activité de Rad53 persistante (Lee et al., 1998; Lee et al., 2001b; Lee et al., 2003; Leroy et al., 2003; Toczyski et al., 1997; Vaze et al., 2002). Il a aussi été montré pour le mutant *cdc5-ad* que la phosphorylation de Chk1 était également maintenue (Pellicioli et al., 2001).

Récemment, un nouveau mutant d'adaptation a été identifié : il s'agit du mutant *ino80* (Papamichos-Chronakis et al., 2006). Chez la levure comme chez les mammifères, en présence de cassures double-brin, on peut observer à proximité de la lésion, une phosphorylation du variant d'histone H2AX. Il a été montré que cette phosphorylation était nécessaire au recrutement de certaines protéines des checkpoints de l'ADN et au recrutement de la cohésine, et qu'elle facilitait la réparation. *INO80* et *SWR1* codent pour les sous-unités catalytiques de complexes de remodelage de la chromatine. Le complexe Ino80 est recruté au niveau de la cassure double-brin et ce recrutement nécessite la phosphorylation de H2AX. Ino80 est nécessaire au maintien de la phosphorylation de H2AX et active l'adaptation en antagonisant la capacité de Swr1 à remplacer l'histone H2AX phosphorylée par Htz1 (Papamichos-Chronakis et al., 2006).

Si on élimine le checkpoint de l'ADN chez ces mutants en délétant *RAD9* ou *RAD17*, les cellules ne s'arrêtent pas en G2/M et donc ne restent jamais bloquées de façon permanente. Elles forment des colonies ou microcolonies selon le système utilisé pour l'étude. Les doubles mutants se comportent alors de façon similaire aux simples mutants *rad9Δ* ou *rad17Δ*, ce qui confirme que les protéines mutées jouent un rôle seulement si le checkpoint a été activé au préalable (Lee et al., 1998; Papamichos-Chronakis et al., 2006; Toczyski et al., 1997).

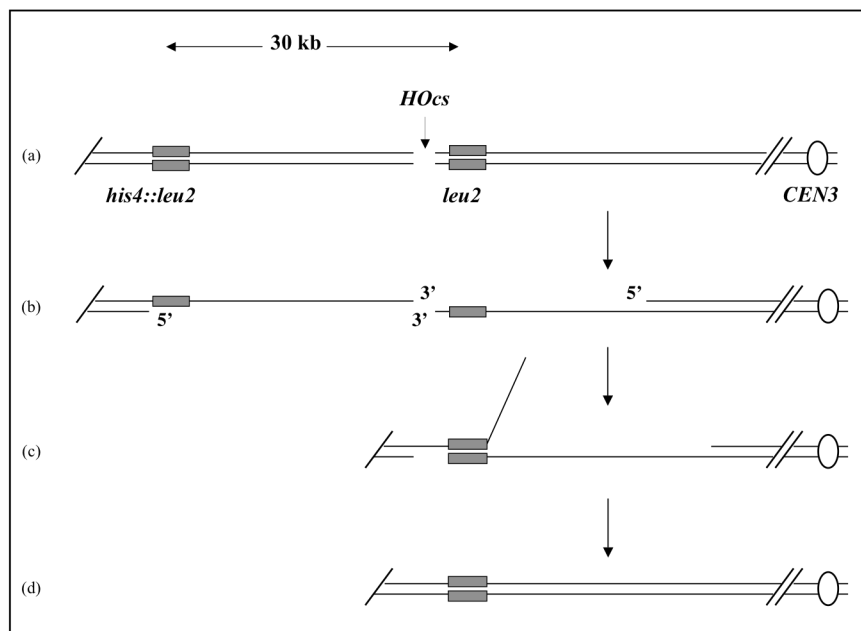
Par ailleurs il a été observé que l'induction de deux cassures double-brin (au lieu d'une seule) bloque également l'adaptation chez la souche sauvage : les cellules n'arrivent pas à reprendre le cycle de division alors qu'elles en sont capables en présence de chacune des deux cassures séparément (Lee et al., 1998). Rad53 reste fortement phosphorylée même 18 heures après induction des coupures (Pellicioli et al., 2001). Ainsi, la déphosphorylation de Rad53 semble toujours coordonnée avec la reprise du cycle. En effet, chez la souche sauvage, ces deux événements ont lieu de façon concomitante. Dans le cas de cellules incapables de reprendre le cycle (mutants d'adaptation ou présence de deux cassures), Rad53 reste hyperphosphorylée même 18 heures après induction de la coupure. Enfin, une mutation supprimant le défaut de reprise du cycle d'un mutant d'adaptation permet de retrouver chez ce dernier une cinétique de phosphorylation de Rad53 semblable à celle de la souche sauvage (Lee et al., 2001b; Lee et al., 2003; Pellicioli et al., 2001).

Certains de ces mutants sont également défectueux pour le mécanisme de rétablissement, c'est-à-dire pour la reprise du cycle après réparation des lésions. Pour étudier ce phénomène et pouvoir suivre la réparation, l'équipe de J.Haber a mis au point une souche dans laquelle on peut induire une cassure double-brin unique et réparable également générée par l'endonucléase HO, dont l'expression a été placée sous le contrôle d'un promoteur inductible par le galactose (Vaze et al., 2002). Les sites HO naturels ont été délétés. Nous avons déjà souligné le fait qu'en cas de réparation rapide (moins d'une heure), le checkpoint n'était pas activé. C'est pourquoi la souche a

été construite de manière à ce que la réparation ne puisse être effective qu'après 6 heures. Un site HO a été inséré au niveau du gène *LEU2* et un fragment contenant l'extrémité 3' de *LEU2* a été inséré à 30 kb du site de restriction. Après l'action de l'endonucléase, les extrémités de la cassure sont dégradées par des exonucléases 5'→3' à la vitesse de 4 kb/h environ. Après 6 heures, les séquences homologues sont exposées l'une à l'autre et peuvent s'hybrider. Cette réparation par SSA (« Single-Strand Annealing ») conduit à la délétion de la région située entre les deux cassettes homologues (cf figure n°I13) (Vaze et al., 2002). Il a été montré que 85% des cellules arrivaient ainsi à réparer la cassure et que la réparation était terminée en moins de 10 heures (Vaze et al., 2002). Les cellules sauvages sont capables d'échapper à l'arrêt en G2/M et parviennent à former des colonies viables. Par contre, le mutant *rad52Δ* qui ne peut pas réparer la lésion, reste bloqué pendant 12 heures puis adapte et forme des microcolonies (Vaze et al., 2002).

Après induction de la coupure, Rad53 est phosphorylée, puis ces formes phosphorylées disparaissent au moment où les cellules se rétablissent et reprennent le cycle. L'arrêt du cycle et la phosphorylation de Rad53 ne sont pas observés chez les mutants *rad9Δ*, *rad17Δ* et *mec1Δ* (Vaze et al., 2002). Les cinétiques de phosphorylation et d'activité de Rad53 sont très similaires à celles qui sont observées lors du phénomène d'adaptation. Chk1 est également phosphorylée après induction de la coupure puis déphosphorylée au moment du rétablissement (Vaze et al., 2002). Par contre, les formes phosphorylées de Rad53 persistent chez les souches qui sont déficientes pour le rétablissement et qui n'arrivent pas à reprendre le cycle malgré le fait que le dommage ait été réparé (Vaze et al., 2002). L'analyse du mutant *cdc13-1* après une incubation de 6 heures à température restrictive puis un retour à température permissive permet également d'étudier le phénomène de rétablissement.

Figure n°I13



**Le mécanisme de réparation par « Single Strand Annealing » (SSA). D'après (Vaze et al., 2002).**

(a) une cassure double-brin est induite au site HOcs («HO endonuclease cleavage site») par l'endonucléase HO. Une cassette homologue à une partie du gène *LEU2* a été introduite à 30 kb du site HOcs, (b) après induction de la coupure, les extrémités sont dégradées de 5' vers 3', (c) appariement des deux cassettes homologues, (d) ligation et synthèse d'ADN permettent l'achèvement de la réparation qui conduit à la perte du fragment d'ADN situé entre les deux cassettes homologues.

Les mutants d'adaptation ne possèdent pas tous les mêmes caractéristiques. Certains sont défectueux seulement pour l'adaptation, comme les mutants *ino80*, *cdc5-ad*, *tid1Δ*, *yku70Δ*, alors que d'autres sont défectueux à la fois pour l'adaptation et le rétablissement, comme les mutants *ptc2Δ*, *ptc3Δ* et *srs2Δ* et certains ont des phénotypes plus forts que d'autres (Lee et al., 1998; Lee et al., 2001b; Leroy et al., 2003; Papamichos-Chronakis et al., 2006; Toczyski et al., 1997; Vaze et al., 2002). Certains, comme le mutant *yku70Δ*, montrent une résection altérée des extrémités de la cassure alors que d'autres, comme les mutants *cdc5-ad*, *tid1Δ* et *rad51Δ*, ne sont pas affectés pour cette étape (Lee et al., 2001b; Lee et al., 2003; Pelliccioli et al., 2001; Toczyski et al., 1997). On ne sait pas vraiment quels sont les mécanismes qui bloquent l'adaptation chez ces mutants, mais ils montrent que l'adaptation est un processus complexe qui n'est certainement pas constitué d'une seule voie linéaire. On peut toutefois constater que beaucoup de mutants correspondent à des protéines impliquées dans la recombinaison homologue ou la maturation des lésions comme Rad51, Ku, Tid1 et Srs2.

Le mutant *pho85Δ* quant à lui peut être considéré comme un mutant d'adaptation pour le checkpoint en G1 (Wysocki et al., 2006).

#### 4.2.3. Rad53, Ptc2, Ptc3 et CK2

Il a été montré au laboratoire que les phosphatases de type 2C Ptc2 et Ptc3 étaient nécessaires à l'inactivation des checkpoints de l'ADN et à la reprise du cycle au cours de l'adaptation mais aussi du rétablissement (Leroy et al., 2003). En effet, en présence d'une cassure double-brin irréparable, les mutants *ptc2Δ* restent bloqués en G2/M et montrent des phosphorylations de Rad53 et de Rad9 persistantes alors que les cellules surexprimant *PTC2* montrent une phosphorylation de Rad53 atténuée et forment des microcolonies avec un nombre de cellules supérieur à celles de la souche sauvage, suggérant que la reprise du cycle y est facilitée (Leroy et al., 2003). Le mutant *ptc3Δ* est également défectueux pour l'adaptation, le défaut du double mutant *ptc2Δ ptc3Δ* s'avère être plus sévère que celui des simples mutants, ce qui suggère que les deux phosphatases ne sont que partiellement redondantes pour cette fonction (Leroy et al., 2003). Par ailleurs, la surexpression de *PTC2* supprime le défaut d'adaptation des mutants *cdc5-ad* et *yku80Δ* (Leroy et al., 2003). En présence d'une cassure double-brin réparable par SSA, la délétion de *PTC2* entraîne une diminution du nombre de colonies viables, et un prolongement de l'arrêt en G2/M ainsi que de la phosphorylation de Rad53. Il a été vérifié que ce phénotype n'était pas dû à un défaut de réparation (Leroy et al., 2003).

Ptc2 interagit avec Rad53. Cette interaction nécessite la phosphorylation préalable de Ptc2, mais est indépendante de l'état de phosphorylation de Rad53 (Leroy et al., 2003). La thréonine T376 de Ptc2 joue un rôle essentiel et doit être phosphorylée pour permettre l'interaction. La mutation de cette thréonine en alanine induit un défaut d'adaptation et de rétablissement en cas de cassure double-brin de l'ADN (Guillemain et al., 2007). La kinase CK2 semble être responsable de la phosphorylation de cette thréonine. En effet, les deux sous-unités régulatrices Ckb1 et Ckb2 de la CK2 sont nécessaires à l'interaction entre Ptc2 et Rad53 *in vivo*. De plus, Ckb1 interagit avec Ptc2 et les mutants *ckb1Δ* et *ckb2Δ* sont défectueux pour l'adaptation et le rétablissement (Guillemain et al., 2007). L'interaction entre Ckb1 et Ptc2 est indépendante de la présence d'une cassure double-brin : la CK2 peut se lier et phosphoryler Ptc2 de façon constitutive (Guillemain et al., 2007). Il est toutefois probable que la CK2 soit capable de phosphoryler Ptc2 sur plusieurs sites (Guillemain et al., 2007).

En tout cas, les résultats suggèrent que le rôle de Ptc2 et Ptc3 dans l'adaptation et le

rétablissement serait d'inactiver Rad53 en la déphosphorylant. La CK2 serait responsable de la phosphorylation de la thréonine T376 de Ptc2, événement requis pour l'interaction Ptc2/Rad53 (Guillemain et al., 2007; Leroy et al., 2003).

### 4.3. L'adaptation chez les autres organismes

#### 4.3.1. La levure fissipare

La protéine Crb2 est l'homologue chez *S. pombe* de l'adaptateur Rad9 de *S. cerevisiae*. Crb2 semble être impliquée dans le rétablissement suite à une irradiation UV. C'est plus précisément la phosphorylation de la thréonine 215 de Crb2 qui est essentielle pour la reprise du cycle (Esashi and Yanagida, 1999). En effet, après une irradiation UV, le délétant *crb2Δ* n'est pas capable d'activer le checkpoint : la progression dans le cycle n'est pas stoppée et Chk1 n'est pas phosphorylée. Au contraire, les cellules sauvages s'arrêtent puis reprennent le cycle et montrent de façon concomitante une phosphorylation puis une déphosphorylation de Chk1. Le mutant *crb2-T215A* montre également un arrêt et une phosphorylation de Chk1. Par contre, l'arrêt est prolongé et les cellules montrent un défaut de reprise du cycle. Par ailleurs, on n'observe pas de déphosphorylation de Chk1 comme c'est le cas dans les cellules sauvages (Esashi and Yanagida, 1999). Pourtant, les dimères de pyrimidine induits par les UV semblent être réparés normalement chez ce mutant (contrairement à ce qui se passe chez la souche *crb2Δ*) (Esashi and Yanagida, 1999). Ainsi, la mutation T215A de Crb2 chez *S. pombe* empêche le rétablissement mais pas l'établissement de l'arrêt suite à des radiations ultraviolettes. Il est possible que Cdc2 soit la kinase responsable de la phosphorylation de Crb2 sur T215 après irradiation UV. Ce site est d'ailleurs phosphorylé lors d'une mitose non perturbée (Esashi and Yanagida, 1999). Cdc2 aurait ainsi à la fois un rôle dans la sortie du checkpoint via la désactivation de Crb2 et un rôle lors de l'arrêt puisque le checkpoint de l'ADN chez la levure fissipare bloque le cycle avant l'entrée en mitose en retardant la déphosphorylation de la tyrosine 15 de Cdc2, maintenant ainsi cette cycline-dépendante kinase sous une forme inactive.

Ces résultats suggèrent que la réparation des lésions n'est pas suffisante pour le rétablissement. La reprise du cycle après un arrêt en G2 induit par des UV est un processus qui semble plus complexe que le simple fait de réparer les lésions qui fixent les protéines senseurs. Toutefois, les résultats exposés précédemment concernant le mutant *crb2-T215A* doivent être considérés avec précaution, entre autres parce qu'une autre étude a permis de proposer un rôle pour Crb2 dans la réparation par recombinaison via l'étude de ce même mutant (Caspari et al., 2002).

#### 4.3.2. Les eucaryotes supérieurs

Chez les eucaryotes supérieurs, on s'est longtemps demandé si le phénomène d'adaptation existait. Il a ainsi seulement été identifié pour la première fois chez le xénope en 2004 (Yoo et al., 2004). Dans cet article, les auteurs étudient la réponse d'extraits d'œufs de xénope à des défauts de la réplication de l'ADN induits, par exemple, par un traitement à l'aphidicoline<sup>1</sup>.

Lors d'un blocage de la réplication, la voie Xatr-Claspine-Xchk1 est activée et le checkpoint empêche l'entrée en mitose en bloquant l'activation du complexe Cdc2-Cycline B. Les extraits montrent alors un arrêt prolongé en interphase. Cependant, après 3 à 4 heures de

---

<sup>1</sup> L'aphidicoline est un inhibiteur des polymérase réplcatives.

traitement à l'aphidicoline, les cellules entrent en mitose malgré la présence continue de blocages de la réplication : on observe en effet un désassemblage de l'enveloppe nucléaire, la condensation de la chromatine, une hyperphosphorylation de Cdc25C et une augmentation d'activité Cdc2-Cycline B, ces quatre événements étant des marqueurs de l'entrée en mitose (Yoo et al., 2004). Le fait que la polymérase  $\alpha$  reste fortement associée à la chromatine suggère que des fourches de réplication bloquées subsistent (Yoo et al., 2004).

La polo-like kinase Plx1 semble nécessaire à l'inactivation de la Claspine au cours de ce phénomène d'adaptation. Plx1 se lie à la Claspine au niveau des fourches bloquées via le résidu T906, préalablement phosphorylé par le checkpoint de façon dépendante de Xatr. Plx1 phosphorylerait alors la Claspine sur le résidu S934, ce qui entraînerait la dissociation de la Claspine de la chromatine, conduisant à l'inactivation de Xchk1 et à la fin de l'arrêt. La mutation de l'un de ces deux résidus engendre en effet un défaut d'adaptation : les extraits ne montrent alors pas de signe d'entrée en mitose, après avoir activé correctement le checkpoint, et montrent une phosphorylation persistante de Chk1. Il en est de même si Plx1 est immunodéplétée (Yoo et al., 2004).

En ce qui concerne les cellules de mammifères, il a été montré récemment que suite à des radiations ionisantes et après un arrêt soutenu en G2, des cellules humaines entraient probablement en mitose malgré la présence de cassures double-brin non réparées. En effet, un marqueur de la présence de cassures double-brin est visible : la forme phosphorylée du variant d'histone H2AX apparaît sous la forme de foci dans ces cellules (Syljuasen et al., 2006). Ceci suggère que le phénomène d'adaptation existe aussi chez les cellules de mammifères. Cette sortie du checkpoint est accélérée si on inhibe Chk1 (par le biais d'inhibiteurs ou de « siRNA ») après que le checkpoint ait été mis en place, et est retardée si l'on surexprime *CHK1* ou l'on déplete en Plk1 (Syljuasen et al., 2006).

#### 4.4. La régulation de l'adaptation

##### 4.4.1. L'histone H2AX, le rétablissement et l'adaptation

On peut se demander quel est le rôle de la phosphorylation de l'histone H2AX lors des processus d'adaptation et de rétablissement, cette phosphorylation étant aujourd'hui considérée comme une des premières marques de la présence de cassures double-brin chez les eucaryotes. Chez la levure, cette phosphorylation est dépendante de Mec1 et Tel1 et a lieu sur 50 kb autour de la cassure. Cette modification est importante pour le recrutement de nombreux facteurs sur le site de la cassure comme des protéines du checkpoint, des remodeleurs de la chromatine et les cohésines.

Nous avons vu que le mutant *ino80* était un mutant d'adaptation. Il a été suggéré que son rôle dans l'adaptation pourrait provenir du fait que Ino80 est nécessaire au maintien de la phosphorylation de H2AX (Papamichos-Chronakis et al., 2006). La présence de foci de H2AX phosphorylée dans des cellules humaines étant entrées en mitose après une irradiation a été considérée comme une preuve de l'existence du phénomène d'adaptation chez les cellules de mammifères (Syljuasen et al., 2006). Par ailleurs, il a également été montré chez *Saccharomyces cerevisiae*, que la phosphatase Pph3 régule l'état de phosphorylation de H2AX et que la déphosphorylation de H2AX est nécessaire à un rétablissement efficace après une cassure HO réparable par SSA, bien qu'elle intervienne après que l'histone H2AX ait été retirée de la chromatine. Le mutant de rétablissement *pph3Δ* ne montre pas de défaut d'adaptation (Keogh et



al., 2006). Ainsi, la déphosphorylation de cette histone pourrait être liée au processus de rétablissement alors que son maintien pourrait engager les cellules vers l'adaptation.

#### 4.4.2. Le checkpoint, l'ADN simple-brin et la résection

Après cassure HO, les extrémités de la coupure sont dégradées : elles subissent une résection 5'->3' conduisant à la création de grande quantité d'ADN simple-brin (cf figure n°12). Sur cet ADN simple-brin, vient se fixer le complexe RPA, étape essentielle pour que Mec1 mais aussi Rad51 puissent s'associer à l'ADN. Il a été montré très tôt que l'ADN simple-brin était un élément clé de l'activation des checkpoints.

Il avait été proposé que l'adaptation dans le cas de la cassure HO dépende de la quantité d'ADN simple-brin. En effet, si l'on induit la création de deux cassures double-brin, les cellules n'arrivent pas à adapter et à reprendre le cycle alors qu'elles en sont capables en présence de chacune des cassures isolément (Lee et al., 1998). Par ailleurs, chez le mutant *yku70Δ*, le taux de résection est deux fois plus rapide que celui de la souche sauvage. Or, ce mutant montre un défaut d'adaptation. D'ailleurs, la mutation *mre11Δ* qui diminue le taux de résection 5'->3' supprime l'arrêt permanent du mutant *yku70Δ* et permet également à une souche subissant deux cassures double-brin d'adapter (Lee et al., 1998). Ces résultats suggèrent que l'adaptation ne pourrait avoir lieu qu'en présence d'une quantité limitée de dommages.

Il a par la suite été proposé que l'activation et le maintien du checkpoint après cassure HO dépendent plus du phénomène dynamique de résection, que de la quantité totale d'ADN simple-brin produite (Ira et al., 2004). Ce phénomène de résection dépend de l'activité Cdc28/Clb (Ira et al., 2004). Si on inhibe l'activité Cdc28/Clb en G2/M ou si l'on se place dans une phase du cycle où cette activité est moindre (en G1), on observe un défaut de résection des extrémités de la cassure et une absence d'activation du checkpoint de l'ADN après cassure HO (Ira et al., 2004). Il a été proposé que l'absence d'ADN simple-brin empêche la fixation de RPA et donc l'activation du checkpoint et la recombinaison homologue. Cette idée est confortée par le fait qu'un mutant du complexe MRX (le mutant *mre11Δ*), complexe impliqué dans la résection, n'est pas non plus capable d'activer le checkpoint de l'ADN en présence d'une cassure HO (Ira et al., 2004). Ces résultats sont toutefois spécifiques de ce dommage, car l'inhibition de Cdc28 n'affecte pas l'activation du checkpoint en cas de traitement au 4-NQO ou à l'hydroxyurée (Ira et al., 2004).

D'autre part, le maintien de l'activité du checkpoint après cassure HO nécessite une activité continue de Cdc28 qui assure une activité continue de résection des extrémités (Ira et al., 2004). En effet, si on inhibe Cdc28 une fois que le checkpoint a été activé, la phosphorylation de Rad53 disparaît de façon concomitante avec la résection (Ira et al., 2004). Ainsi, le signal ne semble pas être seulement la présence d'une grande quantité d'ADN simple-brin mais plutôt la résection continue des extrémités de la cassure. On peut ainsi imaginer qu'au cours de l'adaptation ou du rétablissement, la résection soit inhibée et que cela engendre la désactivation des protéines du checkpoint.

#### 4.4.3. Le mécanisme d'adaptation

L'adaptation et le rétablissement semblent nécessiter l'inactivation des protéines en amont du checkpoint. En effet, chez *Saccharomyces cerevisiae*, les formes phosphorylées de Rad53, Chk1 et Rad9 disparaissent au moment de l'adaptation (Leroy et al., 2003; Pelliccioli et al., 2001). Il a été montré qu'il en était de même pour Rad53 et Chk1 lors du rétablissement (Vaze et al.,

2002). Par ailleurs, les formes phosphorylées et l'activation de Rad53 persistent chez les mutants d'adaptation et de rétablissement (Keogh et al., 2006; Lee et al., 2001b; Lee et al., 2003; Leroy et al., 2003; Papamichos-Chronakis et al., 2006; Pellicioli et al., 2001; Vaze et al., 2002). De plus, la délétion des phosphatases *PTC2* et *PTC3* qui interagissent avec et inhibent Rad53 conduit à un défaut d'adaptation (Leroy et al., 2003). En outre, la dégradation de formes thermosensibles de Mec1 ou Rad53, 10 heures après induction de la cassure HO, est suffisante pour induire une reprise du cycle chez le mutant d'adaptation *cdc5-ad*. Dans ce cas-là, la dégradation de Mec1 est d'ailleurs suivie d'une perte rapide de la phosphorylation de Rad53 (Pellicioli et al., 2001). Enfin, la surexpression de *RAD53* ou de *DDC2* engendre un arrêt irréversible du cycle qui est dépendant de la présence de dommages (Clerici et al., 2004; Pellicioli et al., 2001). La désactivation de Rad53 semble donc être un élément clé pour la reprise du cycle. Elle semble être nécessaire et suffisante pour l'adaptation et probablement pour le rétablissement. Elle pourrait résulter de la conjonction de deux facteurs : l'inactivation de Mec1/Ddc2 et la déphosphorylation constitutive de Rad53 par Ptc2 (Guillemain et al., 2007; Leroy et al., 2003).

Chez *S. pombe*, Cdc2 serait responsable de la phosphorylation de la thréonine 215 de Crb2, événement essentiel pour le rétablissement après une irradiation UV. Ceci pourrait engendrer la désactivation de Crb2 (Esashi and Yanagida, 1999). Ainsi, la réparation des lésions (qui ne permet plus le recrutement des protéines senseurs) n'est pas suffisante pour la reprise du cycle au cours du rétablissement (Esashi and Yanagida, 1999). De plus, la déstabilisation de Chk1 via des mutants thermosensibles après établissement du checkpoint engendre une fin prématurée de l'arrêt en G2 induit par une irradiation (Latif et al., 2004). Chez le xénope, la polo-like kinase est nécessaire à l'inactivation de la Claspine, probablement parce qu'en la phosphorylant elle promeut sa dissociation de la chromatine. Ceci conduirait à l'inactivation de Xchk1 au cours du phénomène d'adaptation (Yoo et al., 2004). Enfin, la sortie du checkpoint en G2 chez les cellules humaines est accélérée si on inhibe Chk1 après que le checkpoint ait été mis en place et est retardée si on surexprime *CHK1* (Syljuasen et al., 2006). Ainsi, chez *Saccharomyces cerevisiae* comme chez les autres organismes, le checkpoint est inactivé au cours de l'adaptation et du rétablissement et cette inactivation semble être indispensable pour la reprise du cycle après des dommages. Par contre, cette inactivation ne semble pas nécessiter en retour une progression dans le cycle puisque la déphosphorylation de Rad53 au cours de l'adaptation est également observée dans une souche bloquée à la transition métaphase/anaphase par la mutation thermosensible *cdc23-1* (Pellicioli et al., 2001).

Le mécanisme qui va déclencher cette inactivation n'est pas connu. Il a été proposé qu'un « timer » biochimique soit mis en route au moment de l'activation du checkpoint et que les voies menant à la reprise du cycle soient activées après un temps fixe. Par exemple, chez le xénope, le « timer » serait enclenché lorsque Xatr phosphoryle la Claspine sur Thr906 et s'arrêterait lorsque l'activité de Plx1, qui a diminué pendant l'interphase, serait à nouveau suffisante pour phosphoryler la Claspine sur Ser934 (Lupardus and Cimprich, 2004). De façon intéressante, il a été montré que certaines cellules de levure adaptaient en présence d'une cassure double-brin alors qu'elles étaient compétentes pour la réparation (Sandell and Zakian, 1993). De plus, la cinétique de sortie de l'arrêt en G1 contrôlé par le checkpoint semble être indépendante de la réparation chez la levure (Wysocki et al., 2006). Toutefois, il est possible que la quantité de dommages ne doive pas excéder un certain seuil pour que le processus d'adaptation soit enclenché. En effet, il a été montré chez *S. cerevisiae* que la présence de deux cassures double-brin bloque l'adaptation (Lee et al., 1998).

## 4.5. Conclusion

Les informations acquises sur l'adaptation et le rétablissement chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* proviennent principalement de l'étude de la réponse à un dommage bien particulier : la cassure HO. Il s'agit cependant du seul système permettant de savoir si la lésion a été réellement réparée ou non. D'autres études sur l'inactivation des checkpoints de l'ADN ont été menées après, par exemple, un traitement à la camptothécine, mais on ne sait alors pas vraiment si les dommages sont toujours présents et en quelle quantité lorsque les cellules échappent à l'arrêt. On ne sait donc pas si la reprise du cycle résulte du phénomène d'adaptation ou de rétablissement.

La signification physiologique de l'adaptation pour la levure n'est pas encore bien appréhendée. Cependant, on pense que ce mécanisme donne l'opportunité à la cellule de réparer les dommages dans la suite du cycle, voire au cours des prochains cycles. D'autres phases du cycle peuvent en effet être plus propices pour la réparation. Ainsi, une souche déficiente pour le NER et irradiée avec une faible dose d'UV en G1 n'active pas le checkpoint en G1 mais le checkpoint de la réplication, probablement parce que les dimères de pyrimidine inhibent la progression des polymérases comme on peut le constater *in vitro* (Neecke et al., 1999). Or, des données suggèrent que ces lésions UV non réparées par le NER sont réparées par recombinaison homologue pendant la réplication (Neecke et al., 1999).

Un arrêt permanent du cycle est mortel pour la cellule (mort reproductive). L'adaptation permet donc d'augmenter les chances de survie. Ainsi, les mutants d'adaptation perdent de la viabilité en restant bloqués en G2/M même si le dommage n'est pas létal en tant que tel (comme le dommage créé chez le mutant *cdc13-1* à température restrictive s'il retourne par la suite à température permissive) (Galgoczy and Toczyski, 2001). Toutefois, il a été montré que l'adaptation conduisait à de l'instabilité génomique (pertes de chromosome, translocations, ... ) (Galgoczy and Toczyski, 2001). Ceci pourrait cependant lui conférer un rôle évolutif.

On pensait que l'adaptation était un phénomène spécifique des organismes unicellulaires. Ce phénomène paraît en effet dangereux pour les organismes pluricellulaires, puisqu'il permettrait la prolifération de cellules dont le matériel génétique est endommagé. L'apoptose, que l'on sait induite dans certains cas par les checkpoints de l'ADN chez les eucaryotes supérieurs, semble être une voie plus sûre. Or, des données chez le xénope et les cellules humaines suggèrent que l'adaptation existe également chez les eucaryotes supérieurs. La signification physiologique de ce mécanisme chez des organismes pluricellulaires pourrait résider dans le fait qu'il puisse conduire plus facilement à l'apoptose, via la génération de lésions qui induisent plus directement l'apoptose ou via l'entrée dans une phase du cycle où l'apoptose peut avoir lieu. Ainsi, l'adaptation pourrait servir de prélude à la mort cellulaire et à l'élimination des cellules défectueuses. Elle pourrait également permettre, comme il l'a été supposé chez la levure, de progresser dans le cycle afin que des mécanismes de réparation alternatifs puissent être mis en place (Lupardus and Cimprich, 2004).

Ainsi, adaptation et rétablissement semblent être des processus *actifs*, puisque l'élimination des lésions ne suffit pas pour induire une reprise du cycle. Celle-ci nécessite en fait la désactivation des protéines du checkpoint. Des éléments tendent par ailleurs à montrer qu'il s'agit de deux voies *distinctes*, comme le fait que certains mutants d'adaptation ne montrent pas de défaut pour le rétablissement.

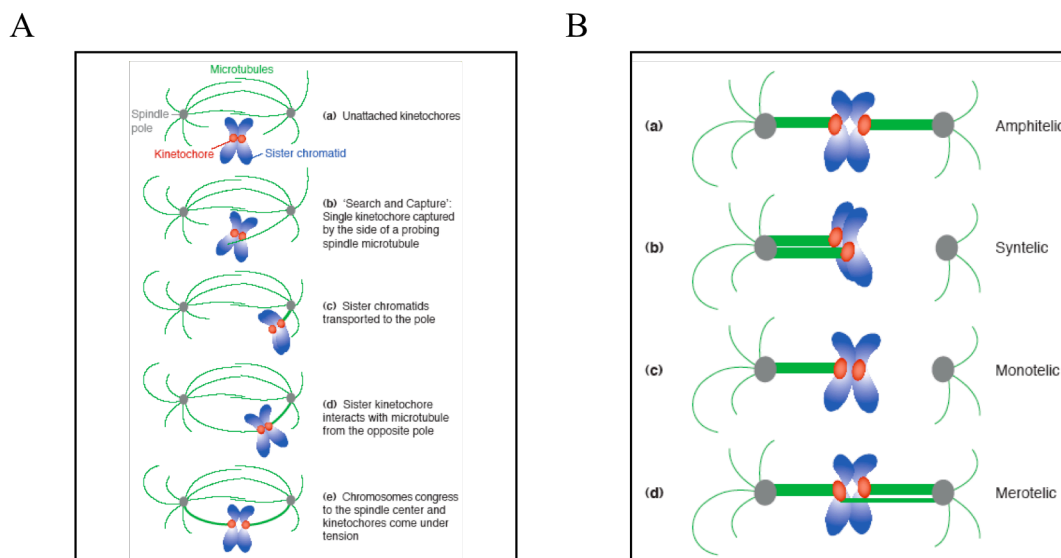
# Introduction sur le checkpoint du fuseau

## 1. Introduction

Le concept de « checkpoint » a été introduit par L.Hartwell et T.Weinert suite à l'étude de la réponse du mutant *rad9* aux rayons X (Weinert and Hartwell, 1988). Les checkpoints avaient alors été définis comme des mécanismes assurant l'ordre des événements du cycle cellulaire dans le sens où ils permettent de retarder l'exécution d'un événement donné tant que l'événement antérieur n'est pas achevé (Hartwell and Weinert, 1989). Lors de la formalisation de ce concept, L.Hartwell et T.Weinert avaient supposé que l'existence d'un checkpoint pouvait ainsi expliquer la dépendance qui avait été observée entre l'anaphase et la métaphase. L'anaphase est en effet retardée lorsqu'un chromosome tarde à rejoindre la plaque équatoriale, et cela jusqu'à ce que ce chromosome soit positionné de façon correcte. Il sera démontré deux ans plus tard que cette dépendance résulte bien de l'existence d'un mécanisme de contrôle, aujourd'hui nommé « checkpoint du fuseau » ou « checkpoint mitotique ».

La vision actuelle du checkpoint du fuseau sied bien au concept de checkpoint défini par L.Hartwell et T.Weinert. Il s'agit plus précisément du mécanisme de surveillance qui retarde la ségrégation des chromatides sœurs tant que tous les chromosomes ne sont pas attachés de façon bipolaire au fuseau (cf figure n°114).

Figure n°114



**L'attachement des chromosomes au fuseau mitotique. Extrait de (Pinsky and Biggins, 2005).**

- A. L'attachement des microtubules aux kinétochores se fait par un processus stochastique. Le chromosome rejoint la plaque équatoriale lorsqu'il est attaché de façon bipolaire. À ce stade, la cohésion des chromatides sœurs est maintenue par la cohésine qui s'oppose à la force de traction exercée par le fuseau. Ces deux forces opposées engendrent une tension au niveau des kinétochores.
- B. Les différents types d'attachement possibles des chromosomes au fuseau. (a) attachement amphitélisque ou bipolaire, les kinétochores sœurs se lient seulement aux microtubules émanant du pôle auquel ils font respectivement face, (b) attachement syntélisque, les kinétochores sœurs s'attachent tous les deux aux microtubules émanant d'un seul pôle, (c) attachement monotélisque, un kinétochore sœur n'est pas attaché, (d) attachement mérotélisque, les kinétochores sœurs font face aux pôles opposés mais une des (ou les deux) kinétochores interagit avec des microtubules émanant des deux pôles.

## 2. Les composants du checkpoint du fuseau

### 2.1. L'identification des principaux composants du checkpoint du fuseau

Le traitement des cellules eucaryotes avec des agents déstabilisant les microtubules engendre un arrêt ou un retard en mitose. La dépendance de la fin de la mitose vis-à-vis de l'assemblage du fuseau ainsi mise en évidence peut être engendrée par un blocage physique de la progression du cycle, une relation produit-substrat ou un système de contrôle au sens défini par L.Hartwell et T.Weinert (Hartwell and Weinert, 1989). L'existence d'un checkpoint est démontrée si l'on trouve des conditions, notamment des mutations, qui permettent à l'événement tardif d'avoir lieu même si l'événement précédent, normalement requis et engendrant un retard du second en cas de non-exécution, n'est pas achevé (Hartwell and Weinert, 1989). Deux études vont ainsi montrer que cette dépendance est contrôlée par un mécanisme de surveillance (Hoyt et al., 1991; Li and Murray, 1991). À l'aide de deux cribles, les auteurs ont en effet identifié des mutants qui parviennent à sortir de mitose alors que l'assemblage du fuseau n'est pas achevé. Il sera montré plus tard que le mécanisme permettant de retarder la sortie de mitose tant que le fuseau n'est pas fonctionnel est un mécanisme qui contrôle plus globalement le fait que les chromosomes soient attachés de façon bipolaire au fuseau et qui retarde l'anaphase si cette condition n'est pas remplie, comme c'est le cas si le fuseau n'est pas assemblé.

Les deux cribles ont été réalisés chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* et ont conduit à l'identification d'une grande partie des composants du checkpoint du fuseau, à savoir les protéines **Mad** (« **M**itotic **A**rrest **D**eficient », Mad1, Mad2 et Mad3) et **Bub** (« **B**udding **U**ninhibited by **B**enzimidazole », Bub1, Bub2, Bub3) (Hoyt et al., 1991; Li and Murray, 1991). Les auteurs ont utilisé le nocodazole et le bénomyle qui, ajoutés dans le milieu extracellulaire, entraînent dans les cellules une dépolymérisation des microtubules et donc le désassemblage du fuseau. Chez la souche sauvage, ces drogues augmentent considérablement la longueur du cycle et entraînent un arrêt ou un retard en mitose. Les cellules arrêtées ont un gros bourgeon, un noyau situé à l'étranglement entre cellule-mère et cellule-fille et des chromosomes répliqués mais non ségrégués (Hoyt et al., 1991; Li and Murray, 1991). Les auteurs ont supposé que l'absence du système de contrôle potentiel abolirait cet arrêt et permettrait aux cellules de progresser dans le cycle, événement engendrant probablement une létalité cellulaire de manière similaire à celle observée pour la plupart des mutants des checkpoints de l'ADN en cas de stress génotoxique. On peut en effet se douter que la ségrégation des chromatides sœurs en absence d'un fuseau fonctionnel puisse être fatale pour la cellule puisqu'elle engendre potentiellement une ségrégation incorrecte des chromosomes.

R.Li et W.Murray ont ainsi cherché des mutants sensibles à une exposition continue à une faible dose de bénomyle (15 µg/ml). À cette concentration, la souche sauvage parvient toujours, même si elle le fait plus lentement, à proliférer, puisque cette dose semble retarder mais ne pas bloquer la formation du fuseau. Ils ont par la suite éliminé les mutants possédant un défaut de croissance intrinsèque en pensant que les checkpoints n'étaient pas requis lors d'un cycle normal, la mécanique du cycle devant être faite de telle manière que le temps d'assemblage du fuseau soit plus court que le temps conduisant à la métaphase (Li and Murray, 1991). A.Hoyt et ses collaborateurs ont quant à eux cherché des mutants défectueux pour le rétablissement consécutif à une exposition de 20 heures à une forte concentration de bénomyle (70 µg/ml) (Hoyt et al., 1991).

Parmi les mutants issus du crible, il a fallu éliminer ceux qui ont un défaut dans la formation du fuseau en tant que telle et qui meurent sur bénomyle parce que leur défaut est exacerbé par la drogue. Pour distinguer ces mutants de ceux qui sont défectueux pour le checkpoint présumé, les deux équipes ont pensé que les premiers, contrairement aux seconds, montreraient comme la souche sauvage une relation de dépendance entre assemblage du fuseau et progression dans le cycle, matérialisée par un arrêt en mitose en présence de la drogue. Ils ont donc suivi la progression dans le cycle des mutants en présence de bénomyle à partir d'une synchronisation à l' $\alpha$ -facteur et retenus ceux qui parviennent à sortir de mitose alors que le fuseau n'est pas correctement assemblé.

Ainsi, après une incubation de 12 heures, les mutants *mad* forment des microcolonies de 5 cellules environ sur des boîtes contenant du bénomyle (15  $\mu$ g/ml) alors que les cellules sauvages ne forment que des microcolonies de 3 cellules et que les mutants des composants du fuseau sont eux bloqués au stade G2/M (par immunofluorescence, les auteurs ont vérifié que le fuseau avait, chez les mutants *mad*, une structure analogue à celle de la souche sauvage en présence de bénomyle) (Li and Murray, 1991). Les mutants *mad1*, *mad2* et *mad3* se divisent donc au départ de façon plus rapide que la souche sauvage, mais si l'incubation perdure, leur croissance s'arrête et ces mutants ne parviennent pas à former des microcolonies de taille supérieure à 50 cellules environ (Li and Murray, 1991). Les auteurs ont supposé que ce défaut de croissance provenait d'une perte massive de chromosomes. En effet, les mutants *mad1* et *mad2* ont un taux de perte 10 à 20 fois supérieur à celui de la souche sauvage en absence de bénomyle, mais les 3 mutants *mad* ont surtout un taux de perte de chromosome environ 10 000 fois supérieur à celui de la souche sauvage après un traitement de 3 heures au bénomyle, puisqu'ils montrent alors une fréquence d'environ 0,03 événements de perte de chromosome par division (Li and Murray, 1991).

De même, sur des boîtes contenant 70  $\mu$ g/ml de bénomyle, les cellules sauvages après 6 heures sont arrêtées en G2/M alors que les mutants *bub1* et *bub2* ont déjà rebourgeonné au moins une fois. Le mutant *bub3* parvient lui aussi à sortir de mitose à cette dose mais de façon plus tardive (après 20 heures environ) (Hoyt et al., 1991). Pour montrer que le défaut des mutants *bub* n'était pas spécifique du bénomyle, les auteurs ont montré que l'arrêt en G2/M du mutant *tub2*<sup>1</sup> à température restrictive était supprimé par les mutations *bub1* ou *bub2* qui lui permettaient ainsi de rebourgeonner (Hoyt et al., 1991). Le gène *BUB3* n'a pas été identifié au cours du crible mais est un suppresseur multi-copie du mutant *bub1-1*. Le mutant *bub3* est lui aussi sensible au bénomyle (Hoyt et al., 1991).

Ainsi, en cas de défaut du système de contrôle, les cellules des mutants *mad* et *bub* parviennent à rebourgeonner malgré l'absence d'un fuseau fonctionnel, mais aussi à rerépliquer leur ADN. Il a plus précisément été observé par FACS que les mutants *bub1* et *bub2* montraient une accumulation de cellules avec un contenu égal à 4C d'ADN lors d'un traitement de 4 heures au nocodazole (15  $\mu$ g/ml) alors que les cellules sauvages sont toujours arrêtées en G2/M dans les mêmes conditions (Hoyt et al., 1991). Cette accumulation pourrait être révélatrice d'un défaut de ségrégation des chromosomes ou alors d'un défaut de cytokinèse. En effet, le défaut de cytokinèse n'est pas exclu puisque l'on observe beaucoup de cellules possédant plusieurs bourgeons et un seul noyau chez les mutants *bub* traités au nocodazole (Hoyt et al., 1991).

Même avec les connaissances actuelles concernant les protéines du checkpoint du fuseau,

---

<sup>1</sup> Le gène *TUB2* code pour la  $\beta$ -tubuline qui, en dimère avec l' $\alpha$ -tubuline, compose les microtubules.

il est difficile de comprendre pourquoi les mutants *mad* et *bub* n'ont pas tous été retrouvés dans les deux cribles. D'autant plus que lors de l'identification des mutants *bub*, il avait été remarqué que ces mutants étaient sensibles à des doses sublétales de bénomyle (10 µg/ml), phénotype à la base du crible d'identification des mutants *mad* (Hoyt et al., 1991). Si l'on compare avec les checkpoints de l'ADN, ce type de cribles n'aurait pas permis l'identification de la protéine Chk1 chez *Saccharomyces cerevisiae*.

Il faut ici souligner qu'en dépit du fait que la protéine Bub2 partage le même phénotype que les autres mutants *mad* et *bub*, elle doit être considérée avec précaution. Nous verrons par la suite que cette protéine doit plutôt être considérée comme une cible que comme un composant du checkpoint du fuseau.

## 2.2. Les protéines

Des homologues pour toutes les protéines Mad et Bub, sauf Mad3, ont été retrouvés chez les eucaryotes supérieurs. Un homologue fonctionnel de Mad3 a tout de même été caractérisé chez ces organismes : il s'agit de la protéine BubR1. La protéine kinase Mps1, présente chez tous les eucaryotes, a été identifiée ultérieurement comme appartenant également au checkpoint du fuseau (Weiss and Winey, 1996). Chez *S. cerevisiae*, Mps1 est une protéine impliquée dans la duplication du SPB, mais joue également un rôle indépendant dans le checkpoint du fuseau. Ainsi, le mutant *mps1-1* est incapable de s'arrêter en G2/M après un traitement au nocodazole ou en présence d'un fuseau monopolaire, aberration qui active le checkpoint du fuseau (Weiss and Winey, 1996). La surexpression de *MPS1* entraîne une accumulation des cellules en G2/M sans que les SPB ne semblent être affectés. Cet arrêt est dépendant de toutes les protéines Mad et Bub. C'est pourquoi la surexpression de *MPS1* est souvent considérée comme un moyen d'activer le checkpoint du fuseau sans créer de dommage cellulaire (Hardwick et al., 1996). Mad3 présente une forte similarité de séquence avec Bub1 au niveau de deux régions. Mad3 et Bub1 interagissent toutes les deux avec Bub3 via une de ces régions similaires (Hardwick et al., 2000). Cette région est conservée chez la protéine BubR1 des eucaryotes supérieurs et lui permet également d'interagir avec Bub3 chez ces organismes (Tang et al., 2001).

Toutes ces protéines sont nécessaires pour l'arrêt induit par des dommages du fuseau chez *S. cerevisiae* comme chez les eucaryotes supérieurs. Plusieurs d'entre elles possèdent une activité kinase. C'est le cas de Bub1 et Mps1 chez *S. cerevisiae* (Roberts et al., 1994; Weiss and Winey, 1996) et de Bub1, BubR1 et Mps1 chez les eucaryotes supérieurs (Lew and Burke, 2003). Bub1 et BubR1 sont des sérine/thréonine kinases alors que Mps1 est une kinase à double spécificité (Musacchio and Hardwick, 2002). Il est intéressant de noter que Mad3, contrairement à BubR1, ne possède pas de domaine kinase. L'activité kinase de Bub1 ne semble pas être requise pour sa fonction au sein du checkpoint chez les eucaryotes supérieurs, comme chez *S. cerevisiae*, bien que des données contradictoires aient été obtenues à ce sujet chez la levure (Lew and Burke, 2003; May and Hardwick, 2006; Musacchio and Hardwick, 2002). Par contre, l'activité kinase de Mps1 est essentielle pour l'activation du checkpoint du fuseau chez tous les organismes (May and Hardwick, 2006). L'activité kinase de BubR1 ne semble posséder qu'un rôle mineur et n'être utile que pour certaines fonctions de BubR1 au sein du checkpoint (Chen, 2002; May and Hardwick, 2006).

Le taux des protéines du checkpoint du fuseau ne varie pas au cours du cycle, sauf celui de la protéine Mps1 dont l'abondance augmente en mitose chez *S. cerevisiae* comme chez l'homme (Palframan et al., 2006). Par contre, la plupart des protéines du checkpoint du fuseau sont phosphorylées au cours d'un cycle normal ou après un traitement au nocodazole. Cela a été

montré notamment pour Mad1, Mad3 et Bub1 chez *Saccharomyces cerevisiae* (Brady and Hardwick, 2000; Hardwick and Murray, 1995; Rancati et al., 2005) et pour Mad2, BubR1, Bub1 et Mps1 chez les eucaryotes supérieurs (Chen, 2002; Fang, 2002; Lew and Burke, 2003; Musacchio and Hardwick, 2002). Chez *S. cerevisiae*, on observe une accumulation de formes phosphorylées de Mad1 lorsque le checkpoint est activé. Cette phosphorylation dépend de *MAD2*, *BUB1* et *BUB3* (Hardwick and Murray, 1995). Il est possible que Mps1 soit responsable de la phosphorylation de Mad1. En effet, cette phosphorylation dépend de *MPS1* et est visible en cas de surexpression de *MPS1* dans la souche sauvage et chez tous les mutants *mad* et *bub*, contrairement à ce que l'on observe en cas de dommages du fuseau (Hardwick and Murray, 1995; Hardwick et al., 1996). Cependant, il a été montré chez l'homme que Bub1 phosphorylait Mad1 *in vitro*, en présence de la protéine Bub3 (Seeley et al., 1999). Or, chez la levure, Mad1 est capable de s'associer au complexe Bub1/Bub3 (Brady and Hardwick, 2000; Roberts et al., 1994). Bub1 pourrait donc être la kinase responsable de la phosphorylation de Mad1 lors de l'activation du checkpoint par des défauts du fuseau, contrairement à ce qui se passe lorsque *MPS1* est surexprimé. La phosphorylation de Mad1 dépend également de sa capacité à interagir avec Mad2, au sein d'un complexe stable constitutif (Chen et al., 1999).

Le rôle des phosphorylations affectant les protéines du checkpoint du fuseau en mitose ou après un traitement au nocodazole n'est pas connu, comme leurs importances au sein du checkpoint. Il a toutefois été remarqué que les formes hyperphosphorylées de Bub1 et BubR1 étaient spécifiquement enrichies dans la fraction chromosomique d'extraits d'œufs de xénope lorsque ceux-ci sont traités au nocodazole (Chen, 2002).

### ***2.3. La localisation des protéines du checkpoint du fuseau et l'origine du signal***

Au cours de l'anaphase, la ségrégation de l'ADN vers les pôles du fuseau a lieu via la traction des chromosomes par les microtubules. Ces microtubules ne s'accrochent pas directement aux chromosomes, mais à un complexe protéique, le kinétochore, qui est fixé sur l'ADN au niveau des centromères. Chez de nombreux organismes, le kinétochore contient plusieurs sites de liaison aux microtubules et interagit ainsi avec plusieurs microtubules issus du même pôle alors que le kinétochore sœur lie plusieurs microtubules issus du pôle opposé. Cependant, chez *Saccharomyces cerevisiae*, un seul microtubule issu d'un pôle donné se lie au kinétochore, ce qui implique que seulement deux microtubules permettent d'obtenir un attachement bipolaire, aussi appelé attachement amphitélétique (cf figure n°114). Nous avons vu que l'identification des protéines Mad et Bub s'est faite via l'utilisation de drogues engendrant une déstabilisation des microtubules (nocodazole ou bénomyle). En présence de ces drogues, les kinétochores ne sont pas rattachés au fuseau. La liaison entre microtubule et kinétochore engendre une tension au niveau du kinétochore. En effet, les chromatides sœurs sont reliées l'une à l'autre via des complexes protéiques nommés cohésines, qui permettent aux chromosomes de résister à la force exercée par le fuseau jusqu'en métaphase. La tension au niveau des kinétochores est visible puisqu'une petite distance sépare les centromères lorsque les chromosomes sont en métaphase alors que les bras des deux chromatides sœurs sont toujours fortement liés ensemble (Lew and Burke, 2003). La cohésine doit être détruite pour initier l'anaphase : le fuseau pourra alors tirer les chromatides sœurs vers les pôles et ainsi séparer l'ensemble de l'ADN en deux.

Le checkpoint du fuseau permet d'assurer une ségrégation correcte des chromosomes en



contrôlant le mauvais attachement des chromatides sœurs au fuseau. Plusieurs défauts peuvent être à l'origine d'un attachement non correct. Ainsi, des mutations de l'ADN centromérique, des mutations dans les protéines du kinétochore (si elles ne déstructurent pas complètement le complexe), des mutations dans les tubulines, des mutations affectant la duplication du SPB, des mutations des protéines moteurs (Hardwick et al., 1999; Pangilinan and Spencer, 1996; Spencer and Hieter, 1992; Weiss and Winey, 1996) entraînent une activation du checkpoint du fuseau. Ce checkpoint est très sensible puisqu'un seul kinétochore non attaché empêche la progression de la mitose (Rieder et al., 1995).

De nombreuses études ont permis de montrer que le signal activant le checkpoint du fuseau provenait du kinétochore. Les premiers indices ont été obtenus en 1995 grâce à la destruction ciblée au laser d'éléments à l'intérieur de la cellule (Rieder et al., 1995). La présence de chromosomes mono-orientés (attachés à un seul pôle) retarde le début de l'anaphase. La destruction du kinétochore de ces chromosomes abolit cette dépendance et la cellule ségrège ses chromosomes alors que les chromosomes mono-orientés sont toujours présents (Rieder et al., 1995). Par ailleurs, des mutations dans les composants du kinétochore qui engendrent une déstructuration complète de ce complexe protéique n'induisent pas d'arrêt en mitose alors que les chromosomes ne peuvent être reliés au fuseau (Lew and Burke, 2003). Ainsi, le kinétochore semble être le lieu d'émanation du signal comme la fourche de réplication l'est pour le checkpoint de la réplication. En leur absence, les checkpoints respectifs ne peuvent être activés.

Il n'est donc pas étonnant que l'ensemble des protéines du checkpoint du fuseau (Mad1, Mad2, BubR1, Bub1, Bub3 et Mps1) soient localisées au niveau des kinétochores en début de mitose. Ceci a été observé chez les vertébrés, où il a d'ailleurs été montré que ces protéines s'associent préférentiellement aux kinétochores des chromosomes qui ne sont pas encore alignés sur la plaque équatoriale et qui ne sont donc pas encore attachés de façon correcte au fuseau (Howell et al., 2004; May and Hardwick, 2006; Musacchio and Hardwick, 2002; Shah et al., 2004). La cinétique de localisation aux kinétochores est différente selon les protéines. Par exemple, Mad1 et Mad2 semblent perdre cette localisation lorsque les chromosomes s'attachent au fuseau alors que les localisations de Bub1 et Bub3 aux kinétochores persistent pendant l'anaphase avec toutefois un signal un peu moins fort qu'en prophase ou prométaphase. Par ailleurs, BubR1 semble rejoindre les kinétochores non attachés de façon plus tardive que Mad1, Mad2, Bub1 et Bub3 (Howell et al., 2004; Shah et al., 2004). Seule Bub2 ne montre pas cette colocalisation avec les kinétochores. Chez *Saccharomyces cerevisiae*, il a été montré qu'elle était présente au niveau des SPB (Fraschini et al., 1999; Li, 1999). Mais comme nous l'avons déjà souligné et comme nous le détaillerons dans la suite, Bub2 ne peut pas être vraiment considérée comme une protéine du checkpoint du fuseau.

La localisation des protéines du checkpoint du fuseau n'est pas restreinte aux kinétochores non attachés. Mad1 et Mad2 sont également présentes au niveau de l'enveloppe nucléaire en interphase et au niveau des pôles du fuseau de la prométaphase à la télophase (Howell et al., 2004; Shah et al., 2004). Bub3, contrairement à Bub1, semble également être présente au niveau des pôles du fuseau (Howell et al., 2004; Shah et al., 2004).

### 3. L'activation du checkpoint du fuseau

#### 3.1. Un checkpoint activé à chaque cycle ?

Le mécanisme de capture d'un kinétochore par un microtubule est un processus stochastique. L'attachement de tous les chromosomes n'est donc pas synchrone et l'on peut observer pendant ce processus la présence de chromosomes mono-orientés qui sont situés près du seul pôle auquel ils sont rattachés. Le temps mis par les chromosomes mono-orientés pour atteindre un état bi-orienté est très variable et peut prendre plusieurs heures chez les cellules de mammifères (Rieder et al., 1995). Les attachements monotéliques ou syntéliques (cf figure n°114), à l'origine de la présence de ces chromosomes mono-orientés, peuvent être responsables d'une mauvaise ségrégation des chromatides sœurs. On pense que le checkpoint du fuseau est activé à chaque cycle chez les vertébrés. Ceci permettrait de surveiller le processus d'attachement et de ne pas initier l'anaphase avant que tous les chromosomes ne soient attachés de façon bipolaire au fuseau. En effet, des souris homozygotes pour des allèles mutants de gènes du checkpoint du fuseau montrent une létalité embryonnaire. De plus, il semble que l'absence de protéines du checkpoint raccourcisse la durée d'une mitose normale chez les cellules de mammifères (Taylor and McKeon, 1997). Par contre, chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*, les protéines Mad et Bub ne sont pas essentielles (Hoyt et al., 1991; Li and Murray, 1991), ce qui laisse supposer que le checkpoint du fuseau n'est pas actif lors d'un cycle non perturbé. Il s'agit là d'une caractéristique commune avec les checkpoints de l'ADN. Ceci correspond à l'idée que se faisaient T.Weinert et L.Hartwell des mécanismes de surveillance qui devaient être des systèmes de contrôle externes vérifiant le bon déroulement des événements du cycle et n'intervenant qu'en cas de dommages importants (Hartwell and Weinert, 1989; Murray, 1992; Weinert and Hartwell, 1988). La différence observée entre *Saccharomyces cerevisiae* et les eucaryotes supérieurs pourrait provenir du fait que les événements du cycle ne soient pas agencés de la même manière dans le temps. Par exemple, chez la levure, le temps nécessaire pour mettre en place les liaisons kinétochores/microtubules pourrait être plus court que le temps nécessaire à d'autres événements requis pour l'initiation de la mitose. En effet, chez cet organisme, les kinétochores semblent s'attacher au fuseau dès la phase G1 (Tanaka et al., 2002). Le checkpoint du fuseau ne serait ainsi pas nécessaire en absence de perturbation.

Cependant, quelques éléments viennent nuancer ces hypothèses. Par exemple, chez *S. pombe*, la surexpression de *mad2*<sup>+</sup> induit un arrêt en métaphase (Kim et al., 1998) et la délétion de *mad2*<sup>+</sup> supprime partiellement le caractère thermosensible du mutant *cut4*. *cut4*<sup>+</sup> code pour une sous-unité de l'APC, un complexe nécessaire à la progression d'une mitose non perturbée (Kim et al., 1998). Comme nous le verrons plus tard, Mad2 assure en partie le blocage du cycle en inhibant l'APC. Or, les données de (Kim et al., 1998) suggèrent que Mad2 pourrait également jouer ce rôle au cours d'un cycle normal. Par ailleurs, chez *S. cerevisiae*, la formation du complexe Mad1/Bub1/Bub3, qui est fortement induite lors d'un traitement au nocodazole, est également visible au cours d'un cycle non perturbé au moment où les chromosomes sont censés s'attacher au fuseau (Brady and Hardwick, 2000). De même, des dommages du fuseau entraînent l'accumulation de formes phosphorylées de Mad1. Or, ces formes sont visibles, bien que moins abondantes, lors d'un cycle normal au moment où la cycline Clb2 commence à s'accumuler (Hardwick and Murray, 1995). De plus, cette phosphorylation de Mad1 n'est pas visible dans des cellules arrêtées à la transition métaphase/anaphase ou en télophase, alors qu'au cours de ces

arrêts, les chromosomes sont déjà correctement attachés au fuseau (Hardwick and Murray, 1995). Ceci suggère que le checkpoint du fuseau pourrait être activé à chaque cycle chez la levure. Par ailleurs, comme nous le verrons plus tard, le comportement de certaines protéines du checkpoint du fuseau chez les cellules de mammifères (notamment au niveau de la formation de complexes) est exacerbée en présence de nocodazole par rapport à ce que l'on peut observer lors d'une mitose normale. Ceci suggère qu'il pourrait exister différents niveaux d'activation du checkpoint chez ces organismes.

### 3.2. Le signal

Si de nombreuses protéines nécessaires au bon fonctionnement du checkpoint du fuseau ont été identifiées, on ne sait toujours pas ce que détecte réellement le checkpoint du fuseau.

Le checkpoint retarde l'initiation de l'anaphase tant que le dernier chromosome mono-orienté n'a pas atteint un état bi-orienté via sa liaison à l'autre pôle du fuseau dans les cellules de mammifère Ptk<sub>1</sub> (Rieder et al., 1995). Ceci suggère que la présence de chromosomes mono-orientés pourrait constituer le signal activant le checkpoint. Cependant, si l'on détruit au laser la moitié du kinétochore d'un chromosome bi-orienté en présence de chromosomes mono-orientés, l'anaphase a lieu dès que le dernier chromosome mono-orienté devient correctement attaché, alors que les deux chromatides sœurs du chromosome dont la moitié du kinétochore a été endommagée au laser restent attachées et sont ségréguées vers un même pôle (Rieder et al., 1995). De même, l'anaphase débute si l'on détruit le kinétochore supposé non attaché du dernier chromosome mono-orienté. Enfin, s'il reste deux chromosomes mono-orientés et si l'on détruit l'un des deux kinétochores non attachés, l'anaphase n'a pas lieu immédiatement mais se déclenche dès que le second kinétochore non attaché est détruit, et cela en présence des deux chromosomes toujours mono-orientés (Rieder et al., 1995). Ces données suggèrent qu'en l'absence de kinétochore non attaché, le checkpoint ne serait pas actif et que ces kinétochores non attachés pourraient plus précisément être à l'origine du signal activant le checkpoint (Rieder et al., 1995).

Cependant, une étude publiée la même année tend à montrer que le checkpoint du fuseau serait plutôt sensible à un manque de tension au niveau du kinétochore. Nous rappelons que cette tension est générée par la force exercée par le fuseau et la résistance opposée par les cohésines. Chez la mante religieuse, les spermatocytes contiennent trois chromosomes sexuels, un Y et deux X, associés sous forme d'un chromosome trivalent. Il arrive parfois qu'un des chromosomes X se détache. Il n'est alors relié qu'à un seul pôle et ne porte pas de kinétochore non attaché. Les spermatocytes s'arrêtent alors à la transition métaphase/anaphase de la première division méiotique, alors que tous les kinétochores sont liés à des microtubules. Il est possible de déclencher l'anaphase chez ces spermatocytes en exerçant une force de traction avec une micro-aiguille sur le chromosome X univalent (Li and Nicklas, 1995). Ceci suggère que le checkpoint est levé lorsqu'une tension suffisante est exercée au niveau du kinétochore.

Ces deux études semblent donner des résultats contradictoires, puisque l'ablation au laser du dernier kinétochore non attaché élimine l'arrêt dépendant du checkpoint alors que le kinétochore sœur restant n'est pas sous tension dans les cellules de mammifère Ptk<sub>1</sub>. D'un autre côté, le checkpoint semble être actif chez les spermatocytes de mante religieuse alors qu'il n'y a pas de kinétochore non attaché. De nombreuses autres études ont tenté de comprendre l'apparente contradiction de ces résultats et de savoir si le défaut détecté par le checkpoint était le défaut d'attachement (présence de sites de liaison kinétochores/microtubules non occupés) ou le défaut

de tension au niveau du kinétochore (Lew and Burke, 2003; May and Hardwick, 2006; Pinsky and Biggins, 2005).

En fait, la question est très compliquée, tout d'abord parce qu'il existe peut-être des régulations spécifiques gérant les systèmes particuliers comme le chromosome trivalent de la mante religieuse ou la méiose, et surtout parce que tension et attachement sont intimement liés. En effet, les kinétochores non attachés ne sont pas sous tension et l'application d'une tension augmente à la fois la stabilité et le nombre des attachements kinétochore/microtubule. En effet, il a été montré que le nombre de microtubules attachés au niveau d'un kinétochore est réduit de moitié si l'on détache son kinétochore sœur, ce qui affaiblit probablement la tension au niveau du complexe (Pinsky and Biggins, 2005). On peut alors se demander si le manque de tension n'active pas le checkpoint parce qu'il engendre la création de sites de liaison kinétochores/microtubules non occupés (Pinsky and Biggins, 2005). Chez *Saccharomyces cerevisiae*, la relation entre tension et attachement est plus simple, puisqu'un seul microtubule est responsable de l'attachement à un pôle donné. Le manque de tension dû au fait que le kinétochore ne soit relié au pôle que par un nombre insuffisant de microtubules n'a donc pas lieu d'être. Ainsi, des données suggèrent que, chez la levure, le manque de tension en tant que tel entraîne l'activation du checkpoint du fuseau. Des cellules déplétées en Cdc6 (facteur d'initiation de la réplication) qui ne répliquent pas leur génome, montrent un blocage de la transition métaphase/anaphase dépendant du checkpoint du fuseau alors que le kinétochore associé à la seule chromatide existante en mitose semble bien être attaché au fuseau. En effet, la chromatide sœur est ségréguée et rejoint un pôle. Cette chromatide sœur étant isolée, le kinétochore attaché n'est donc pas sous tension (Stern and Murray, 2001). Cependant, le fait que le kinétochore ne soit pas complet pourrait affecter la liaison kinétochore/microtubule et il est possible que cet attachement soit plus tardif. Par ailleurs, la déplétion en Cdc6 semble engendrer des défauts de fuseau (Stern and Murray, 2001). Un mutant *scc1* (*SCC1* code pour une sous-unité du complexe cohésine) permet également d'induire un manque de tension sans apparemment affecter l'attachement des kinétochores aux microtubules. En effet, en absence de cohésine, les kinétochores semblent toujours se lier aux microtubules, mais comme les deux chromatides sœurs ne sont pas liées l'une à l'autre, la tension est moindre au niveau de ces attachements. Ce mutant montre également un blocage à la transition métaphase/anaphase dépendant du checkpoint du fuseau (Biggins and Murray, 2001). Toutefois, il semble que le blocage soit moins long que celui induit par un traitement au nocodazole. Chez les vertébrés, le traitement par des drogues qui altèrent la dynamique des microtubules sans apparemment affecter les liaisons kinétochore/microtubule engendre un arrêt du cycle, suggérant que le checkpoint est également sensible au manque de tension chez ces organismes (Lew and Burke, 2003; May and Hardwick, 2006). Cependant, il est très difficile de savoir dans la trentaine de microtubules qui lient un kinétochore, si tous sont vraiment attachés au fuseau *in vivo*.

À ce jour, nous ne savons toujours pas quel est le défaut réellement détecté par le checkpoint du fuseau, à savoir le manque de tension ou le manque d'attachement. Il est d'ailleurs possible que les deux puissent être détectés par des voies distinctes. Il est également possible que le défaut détecté diffère légèrement selon les organismes.

### 3.3. L'arrêt du cycle

#### 3.3.1. Les cibles

Comme le checkpoint de l'ADN en G2/M, le checkpoint du fuseau semble freiner la progression de la mitose en inhibant d'une part la transition métaphase/anaphase et plus précisément la séparation des chromatides sœurs et d'autre part la sortie de mitose en empêchant l'inactivation de Cdc28. Pour cela, le checkpoint du fuseau semble avoir des cibles communes avec le checkpoint de l'ADN. Nous avons vu que la sécurine Pds1 et la GAP Bub2/Bfa1 étaient nécessaires au blocage du cycle en cas de dommages de l'ADN. Il semble qu'elles soient également impliquées dans la réponse aux dommages du fuseau.

##### 3.3.1.1. Pds1

Au cours d'un cycle non perturbé, Pds1 doit être dégradée à la transition métaphase/anaphase pour que la séparine Esp1, qu'elle séquestre, soit libérée. Une fois activée, Esp1 clive la sous-unité Scc1 du complexe cohésine, qui maintient les chromatides sœurs attachés, ce qui engendre la dissociation de Scc1 des chromosomes et induit la ségrégation des chromatides alors tirées par le fuseau. Ainsi, l'expression d'une forme non-dégradable de Pds1 empêche l'initiation de l'anaphase (Cohen-Fix et al., 1996). Pds1 doit également être considérée comme un régulateur positif d'Esp1 dans la mesure où Pds1 est nécessaire à la localisation nucléaire d'Esp1. Un traitement au nocodazole bloque la dissociation de Scc1 des chromatides. Par contre, le nocodazole n'a pas d'effet sur la dissociation de Scc1 chez le mutant *mad2Δ* : chez ce mutant, la dissociation de Scc1 en mitose a lieu avec la même cinétique que celle observée dans la souche sauvage non stressée (Alexandru et al., 1999). Ceci indique que le clivage de Scc1 est bloqué en cas de dommages du fuseau de manière dépendante du checkpoint. C'est cette absence de clivage qui est responsable du blocage de la séparation des chromatides sœurs en cas d'activation du checkpoint du fuseau.

La mise en place de ce blocage par le checkpoint du fuseau semble dépendre de Pds1. Le mutant *pds1-1*, qui se comporte comme le mutant nul, est thermosensible, mais Pds1 n'est pas essentielle pour la croissance à 23°C bien que le mutant *pds1-1* ne soit viable qu'à 70% dans ces conditions (Yamamoto et al., 1996a; Yamamoto et al., 1996b). Son défaut de croissance à 37°C ne semble pas être exclusivement lié à son rôle dans la ségrégation des chromosomes (Yamamoto et al., 1996a). À 23°C, le mutant montre une cinétique de séparation des chromosomes similaire à celle de la souche sauvage (Alexandru et al., 1999). Cependant, lors d'un traitement au nocodazole, le suivi de la séparation des chromatides sœurs grâce au marquage d'un centromère indique qu'une séparation est visible dans 50% des cellules chez le mutant *pds1-1* contre 15% des cellules chez la souche sauvage (Yamamoto et al., 1996b). Par ailleurs, le nocodazole ne bloque pas la dissociation de Scc1 des chromosomes chez le mutant *pds1Δ* (Alexandru et al., 1999). Après une courte exposition au nocodazole, on voit d'ailleurs distinctement que des quantités inégales d'ADN ont été ségréguées aux deux pôles chez près de la moitié des cellules du mutant *pds1-1* (Yamamoto et al., 1996b). Enfin, les mutants *pds1* sont sensibles au nocodazole et au benomyle (cf figure n°M11A et (Yamamoto et al., 1996b)). Ces données suggèrent que Pds1 est impliquée dans la réponse aux dommages du fuseau et plus précisément dans le blocage de la séparation des chromatides sœurs.

La quantité de Pds1 varie au cours du cycle : Pds1 s'accumule en G2 et est ubiquitinylée par APC/Cdc20, puis dégradée à la transition métaphase/anaphase (Yamamoto et al., 1996a).

Dans une souche sauvage, Pds1 est stabilisée lors de l'arrêt induit par un traitement au nocodazole. Cette stabilisation est dépendante de *MAD2*, dont la délétion permet de retrouver une cinétique de dégradation de Pds1 similaire à celle observée dans une souche sauvage non stressée (Alexandru et al., 1999). L'ensemble de ces données suggère que Mad2 bloque la séparation des chromatides sœurs exclusivement en bloquant la dégradation de Pds1 (Alexandru et al., 1999) (cf figure n°115).

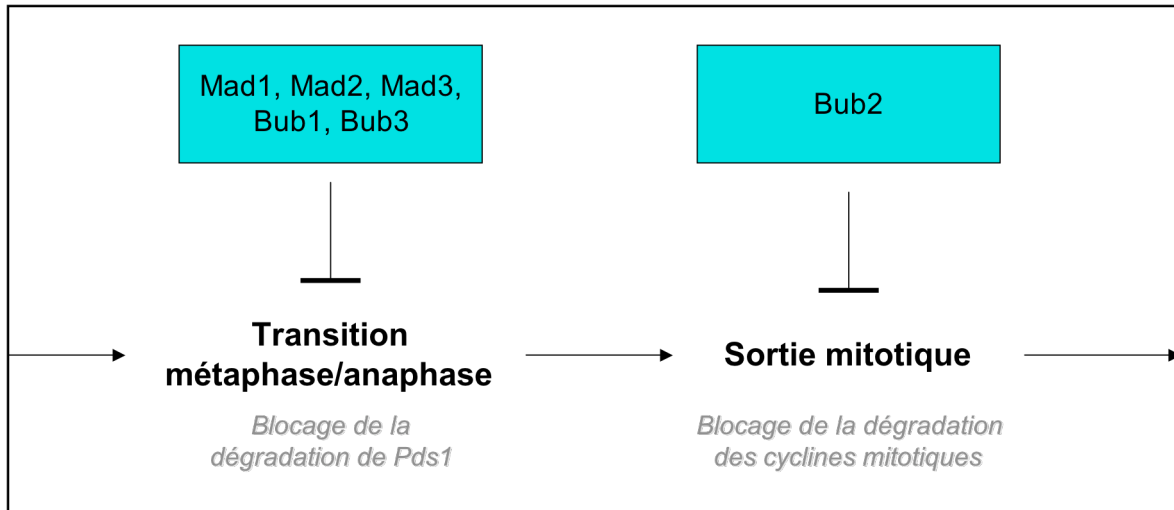
### 3.3.1.2. *Bub2/Bfa1 et le MEN*

On pense que la GAP Bub2/Bfa1 maintient la protéine G Tem1 sous sa forme inactive pendant une grande partie du cycle. Ceci pourrait expliquer par exemple pourquoi la surexpression de *BFA1* engendre un arrêt en télophase (Li, 1999). La GAP semble ainsi être capable d'inhiber le réseau MEN et donc la sortie de mitose. L'activation de Tem1 via sa conversion sous sa forme liée au GTP assurée au moins en partie par la GEF Lte1 lors de l'entrée du SPB dans la cellule-fille, permet l'activation de Cdc15 qui va phosphoryler Mob1/Dbf2 et contribuer au relargage de Cdc14 du nucléole. La phosphatase Cdc14 ainsi relarguée peut déphosphoryler Cdh1 (ce qui permet à ce dernier de se lier à APC) et induire la stabilisation de Sic1 en partie en la déphosphorylant. Ainsi, l'activation du MEN conduit à l'inactivation de Cdc28 nécessaire à la sortie de mitose en induisant la dégradation des cyclines mitotiques, notamment Clb2, qui dépend principalement d'APC/Cdh1, et l'accumulation de Sic1, un inhibiteur des complexes Cdk/cycline B (cf figure n°110).

Au cours d'un cycle non perturbé, la dégradation des cyclines Clb2 est plus tardive que celle de Pds1 et a lieu principalement en fin d'anaphase même si elle est initiée en début d'anaphase. Elle est nécessaire à la sortie de mitose puisque celle-ci est bloquée si des formes non dégradables de Clb2 sont exprimées. Cette dégradation est induite en premier lieu par l'ubiquitinylation de Clb2 par APC/Cdc20 en début d'anaphase, mais elle dépend principalement d'APC/Cdh1, complexe qui est actif seulement en fin de mitose. Après un traitement au nocodazole, cette dégradation est inhibée puisque l'on observe une stabilisation du taux de Clb2 dans ces conditions (Alexandru et al., 1999). Par ailleurs, le pic d'activité kinase de Dbf2, normalement observé au cours d'un cycle non perturbé en anaphase mais aussi dans des cellules arrêtées en métaphase ou pouvant progresser en anaphase, n'est plus visible lorsque ces cellules sont traitées au nocodazole (Fesquet et al., 1999). Enfin, en cas de traitement au nocodazole, Cdc14 est maintenue dans le nucléole, ce qui empêche probablement son activation (Wang et al., 2000). La stabilisation du taux de Clb2 en cas de dommages du fuseau pourrait ainsi résulter d'une inhibition plus globale du MEN.

Cette inhibition semble être induite par le checkpoint du fuseau par l'intermédiaire de la GAP Bub2/Bfa1. Comme nous le verrons dans la suite de l'exposé, Bub2/Bfa1 semble en effet être responsable de la stabilisation de Clb2 et plus globalement du maintien de la forte activité kinase de Cdc28 observée en cas de dommages du fuseau (cf figure n°115). Le fait que son action passe par l'intermédiaire du MEN est suggéré par des études sur Cdc14 et Dbf2. Ainsi, il a été montré que Bfa1 était nécessaire pour maintenir Cdc14 dans le nucléole en cas de dommages du fuseau (Wang et al., 2000) et que Bub2 et Bfa1 étaient nécessaires à l'inhibition de l'activité kinase Dbf2 observée en cas de traitement au nocodazole (Fesquet et al., 1999; Lee et al., 2001a). La GAP contribue à l'arrêt induit par le checkpoint du fuseau, ce qui pourrait expliquer pourquoi les mutants *bub2Δ* et *bfa1Δ* sont sensibles au benomyle et sont capables de rebourgeonner en présence de nocodazole (Hoyt et al., 1991; Li, 1999).

Figure n°I15



**Les blocages induits par le checkpoint du fuseau au cours de la mitose.**

Le checkpoint du fuseau ralentit la progression de la mitose en bloquant d'une part la transition métaphase/anaphase et d'autre part la sortie de mitose.

La quantité de Bub2 ne varie pas au cours du cycle, ni après activation du checkpoint (Fraschini et al., 1999). L'association Bub2/Bfa1 est constitutive et ne semble pas être perturbée par la présence de nocodazole (Lee et al., 2001a). Par contre, Bfa1 est phosphorylée au cours d'un cycle non perturbé, de manière dépendante de *BUB2* et ces formes s'accumulent avant de disparaître lors de la sortie de mitose (Hu et al., 2001; Lee et al., 2001a). L'influence du checkpoint du fuseau sur l'état de phosphorylation de Bfa1 a fait l'objet de deux études qui, au premier abord, semblent donner des résultats opposés. Hu *et al.*, 2001 semblent mettre en évidence une inhibition de la phosphorylation de Bfa1 lors d'un traitement au nocodazole et proposent que la forme déphosphorylée de Bfa1 soit la forme active qui inhibe Tem1, alors que Lee *et al.*, 2001 semblent montrer que la phosphorylation de Bfa1 perdure en cas de traitement au nocodazole et suggèrent que c'est au contraire la forme phosphorylée de Bfa1 qui est active. Plus exactement, dans l'étude de Lee *et al.*, 2001, le nocodazole semble engendrer des modifications supplémentaires du profil de phosphorylation de Bfa1 observé au cours d'un cycle normal. Cependant, ces modifications supplémentaires sont aussi visibles chez le mutant *apc2* qui s'arrête à la transition métaphase/anaphase à température restrictive. Ils proposent le modèle suivant : la phosphorylation de Bfa1 en général est importante pour l'activation de la GAP et donc l'inactivation de Tem1 ; et la déphosphorylation en fin de mitose de Bfa1 active en partie Tem1. Dans l'étude de Hu *et al.*, 2001, la forme phosphorylée que les auteurs détectent en Western-Blot s'accumule également chez un mutant de l'APC, à savoir le mutant *cdc16*. Par contre, l'ajout de nocodazole empêche l'accumulation de cette forme phosphorylée chez le mutant *cdc14-1* (l'expérience est faite dans un mutant *cdc14-1* pour mieux mettre en évidence l'accumulation des formes phosphorylées de Bfa1 dans les contrôles). Les mutations *mad2* et *mpl1* suppriment partiellement ce défaut d'accumulation. Par ailleurs, ils montrent que seule la forme hypophosphorylée de Bfa1 co-immunoprécipite avec Tem1.

En fait, les profils de phosphorylation de Bfa1 observés dans les deux études sont assez différents. Dans l'un de deux articles, Bfa1 migre sous la forme de deux bandes majoritaires (Hu et al., 2001), alors que dans l'autre article, le profil de migration comporte 6 bandes dont les proportions relatives varient légèrement selon les conditions (Lee et al., 2001a). Il est fort probable que les conditions de migration soient différentes d'une étude à l'autre et qu'elles ne révèlent pas les mêmes formes phosphorylées de Bfa1. On peut tout de même conclure de ces deux études que les blocages en mitose en l'absence de dommages du fuseau entraînent l'accumulation de formes phosphorylées de Bfa1 que ce soit à la transition métaphase/anaphase ou en télophase. Les expériences complémentaires de Hu *et al.*, 2001 font penser que le nocodazole est probablement capable d'inhiber l'accumulation de certaines formes phosphorylées, notamment celle détectée en Western-Blot par cette équipe. Cette forme est probablement inactive puisqu'elle a une affinité moindre pour Tem1. On peut donc établir le modèle suivant qui mérite cependant confirmation : au cours d'un cycle normal, Bfa1 est phosphorylée pour permettre l'inactivation de la GAP et la sortie de mitose. Le checkpoint du fuseau inhibe la sortie de mitose en activant la GAP Bub2/Bfa1 via l'inhibition de la phosphorylation de certains sites de Bfa1 (cf figure n°I10).

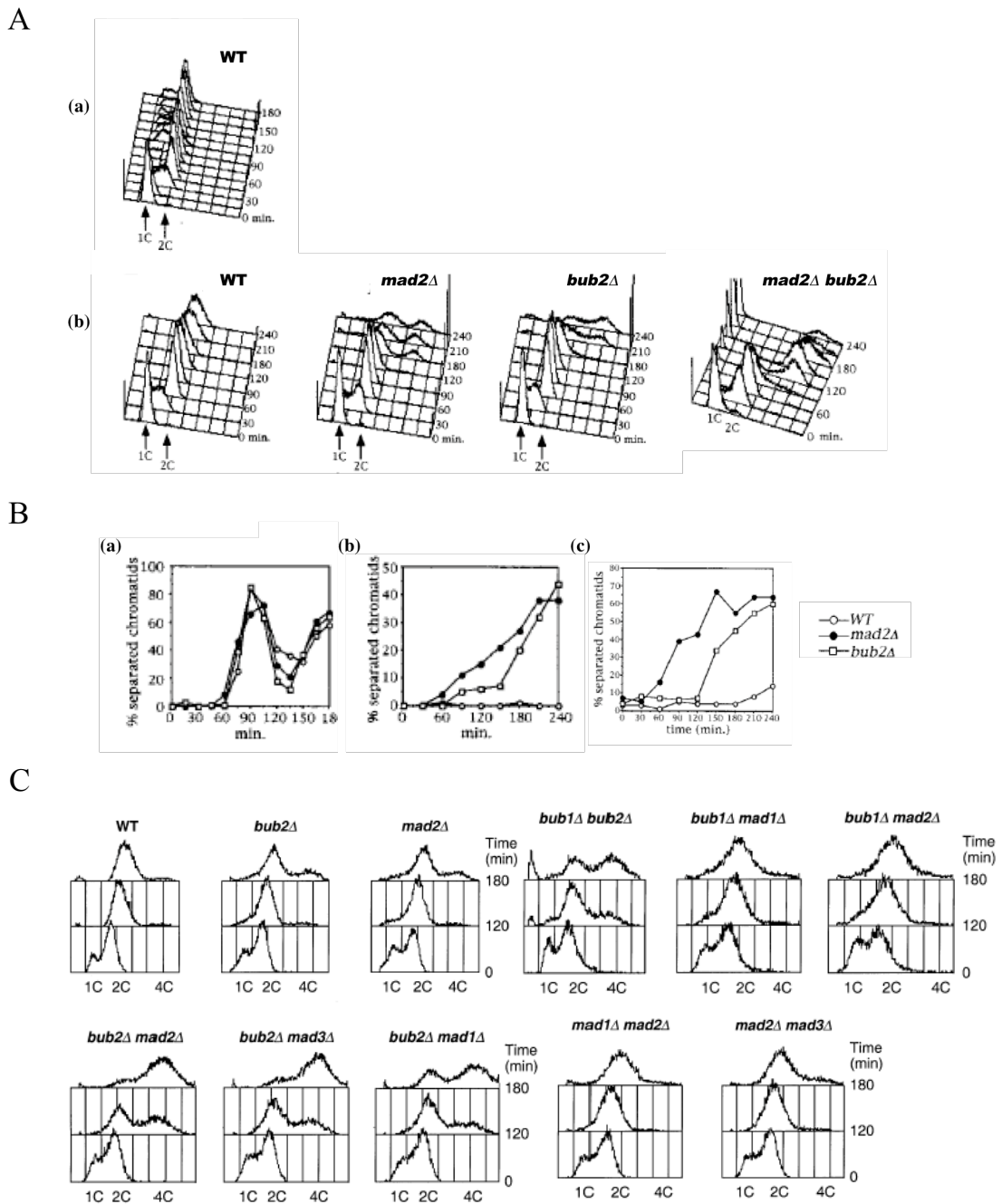
La GEF Lte1 est phosphorylée puis déphosphorylée en mitose lors d'un cycle non perturbé. L'ajout de nocodazole entraîne le maintien de cette phosphorylation (Lee et al., 2001a). Lte1 pourrait également être une cible du checkpoint du fuseau qui l'empêcherait d'activer Tem1 et de promouvoir la sortie de mitose.

### 3.3.2. Les deux voies

Dès l'identification des gènes *BUB* et *MAD* en 1991, les auteurs ont remarqué que les mutants correspondants se divisaient plus rapidement que la souche sauvage en présence de bénomyle mais pas aussi rapidement que la souche sauvage non traitée, suggérant que le checkpoint n'est pas complètement inactivé (Hoyt et al., 1991; Li and Murray, 1991). Des études par FACS confirment le fait que les mutants *mad2Δ* et *bub2Δ* initient une reréplication en cas de dommages du fuseau avec un retard par rapport au cycle de la souche sauvage non traitée. Par contre, le déroulement du cycle en présence de nocodazole est identique à celui de la souche sauvage non traitée chez le double mutant *mad2Δ bub2Δ*, suggérant que le checkpoint du fuseau est complètement inactivé uniquement si l'on délète les deux gènes (Alexandru et al., 1999; Fesquet et al., 1999; Fraschini et al., 1999) (cf figure n°I16A). Les profils FACS des doubles mutants *bub1Δ bub2Δ*, *mad1Δ bub2Δ*, *mad3Δ bub2Δ* sont similaires à celui du double mutant *mad2Δ bub2Δ*, alors que ceux des doubles mutants *bub1Δ mad1Δ*, *bub1Δ mad2Δ*, *mad1Δ mad2Δ* et *mad3Δ mad2Δ* sont similaires à ceux des simples délétants *bub2Δ* et *mad2Δ* (Alexandru et al., 1999; Fraschini et al., 1999) (cf figure n°I16C). Ces données suggèrent que deux voies sont nécessaires pour bloquer le cycle en présence de nocodazole, l'une d'elle impliquant Mad1, Mad2, Mad3 et Bub1, l'autre impliquant seulement Bub2. Une analyse similaire permet de montrer que Bfa1 fait bien partie de la voie Bub2 (Alexandru et al., 1999) et que Bub3 fait partie de la voie Mad2 (Hardwick et al., 2000). Le suivi du rebourgeoisement lors d'un traitement au nocodazole conduit à des conclusions similaires (Li, 1999). De plus, ceci est en accord avec le fait que les doubles mutants *mad1Δ bub2Δ* et *mad2Δ bub2Δ* soient plus sensibles au bénomyle que les simples mutants correspondants (Fraschini et al., 1999).



Figure n°I16



**Mad2, Mad1, Bub1 et Mad3 font partie d'une voie distincte de Bub2 impliquée dans la réponse aux dommages du fuseau.**

A. (a) la souche sauvage (WT) est synchronisée à l' $\alpha$ -facteur puis relarguée dans un milieu sans nocodazole. (b) les souches sauvage (WT), *mad2* $\Delta$ , *bub2* $\Delta$  et *bub2* $\Delta$  *mad2* $\Delta$  sont synchronisées à l' $\alpha$ -facteur puis relarguées dans un milieu contenant du nocodazole. Des aliquots sont prélevés aux temps indiqués après relargage et analysés par FACS. Extrait de (Fraschini et al., 1999).

B. Analyse du nombre de cellules ayant séparé leurs chromatides sœurs après relargage. Les souches indiquées ont été synchronisées à l' $\alpha$ -facteur puis relarguées dans un milieu sans nocodazole (a) ou contenant du nocodazole (b). (c) les souches indiquées ont été synchronisées en phase S avec de l'hydroxyurée puis relarguées en présence de nocodazole. Extrait de (Fraschini et al., 1999).

C. On ajoute du nocodazole dans des cultures en croissance exponentielle des souches indiquées. Des aliquots sont prélevés aux temps indiqués après ajout de nocodazole et analysés par FACS. Extrait de (Alexandru et al., 1999).

Lors d'un traitement au nocodazole, il a été montré que Pds1 était stabilisée de façon dépendante de *MAD2* mais de façon indépendante de *BUB2* (Alexandru et al., 1999; Fraschini et al., 1999). La voie Bub2 ne semble donc pas être responsable de l'inhibition de la séparation des chromatides sœurs lors de l'activation du checkpoint du fuseau. Ceci est en accord avec le fait que le mutant *bub2Δ* sépare ses chromatides sœurs plus tardivement que le mutant *mad2Δ* en présence de nocodazole (cf figure n°I16B) et que la séparation des chromatides sœurs n'est pas modifiée chez le mutant *mad2Δ* si on délète *BUB2* (Fraschini et al., 1999). Le fait que la cycline Clb2 soit ou non dégradée lors d'un traitement au nocodazole chez les mutants *bub2Δ* et *mad2Δ* alors qu'elle est stabilisée chez la souche sauvage n'est pas clair. Ainsi, une étude montre qu'elle est dégradée (Fraschini et al., 1999) et une autre montre le contraire (Alexandru et al., 1999). En fait, les cellules ne cyclent pas aussi rapidement dans les deux études et je pense que la cycline Clb2 finit par être dégradée dans les deux mutants lorsque ceux-ci reprennent finalement le cycle. Cependant, ces mutants montrent après traitement au nocodazole un retard dans la reprise du cycle par rapport à la souche sauvage non traitée et pendant le laps de temps où ces mutants sont bloqués en G2/M, je pense que Clb2 n'est pas dégradée et que les cellules maintiennent une forte activité kinase Cdc28 (Alexandru et al., 1999). Toutefois, la dégradation de Clb2 et l'inactivation de Cdc28 après traitement au nocodazole sont accélérées chez le double mutant *pds1Δ bub2Δ* par rapport aux simples mutants, ce qui suggère qu'après le passage de la transition métaphase/anaphase, le mutant *bub2Δ* n'est pas capable d'empêcher la dégradation de Clb2 (Alexandru et al., 1999). Il a été montré que Pds1 inhibe la dégradation des cyclines mitotiques et la sortie de mitose indépendamment de son rôle dans la séparation des chromatides sœurs (Cohen-Fix and Koshland, 1999; Tinker-Kulberg and Morgan, 1999). En effet, la surexpression d'une forme non-dégradable de Pds1 bloque la destruction de Clb2 et empêche l'accumulation de Sic1, la déphosphorylation de Cdh1 et la baisse d'activité kinase Cdc28 chez la souche sauvage mais aussi chez le mutant *cdc15-2* arrêté en télophase. Par contre, la protéine Pds1 endogène sauvage est dégradée, ce qui suggère que le complexe APC/Cdc20 est actif (Cohen-Fix and Koshland, 1999; Tinker-Kulberg and Morgan, 1999) (cf figure n°I17). Ces données pourraient expliquer en partie pourquoi le défaut du mutant *bub2Δ* concernant le maintien du taux de Clb2 en présence de nocodazole est masqué lorsque Pds1 est présent (Alexandru et al., 1999). Toutefois, le fait que Pds1 possède ces deux rôles ne peut pas expliquer la totalité du blocage du cycle engendré par des dommages du fuseau par la seule inhibition de la dégradation de Pds1 par le checkpoint. En effet, le mutant *pds1Δ* se comporte de manière similaire au mutant *mad2Δ* et est capable dans la même mesure de maintenir une forte activité kinase Cdc28 et d'empêcher la sortie de mitose et la reréplication en présence de nocodazole (Alexandru et al., 1999; Yamamoto et al., 1996b). Le fait que les mutants *bub2Δ* s'arrêtent à la transition métaphase/anaphase en présence de nocodazole au moins pendant un certain temps pourrait également en partie expliquer pourquoi Clb2 est dégradée avec retard chez ce mutant. En effet, des événements plus tardifs en mitose qui sont normalement déclenchés après cette transition et qui sont nécessaires à la sortie de mitose pourraient ne pas être activés simplement à cause de la non-progression dans le cycle. Je pense, par exemple, au réseau FEAR (« cdc Fourteen Early Anaphase Release ») qui est nécessaire à l'initiation du relargage de Cdc14 du nucléole et donc en partie à l'activation de la phosphatase, ce relargage étant amplifié par la suite après l'activation du MEN.

### 3.3.3. Le modèle

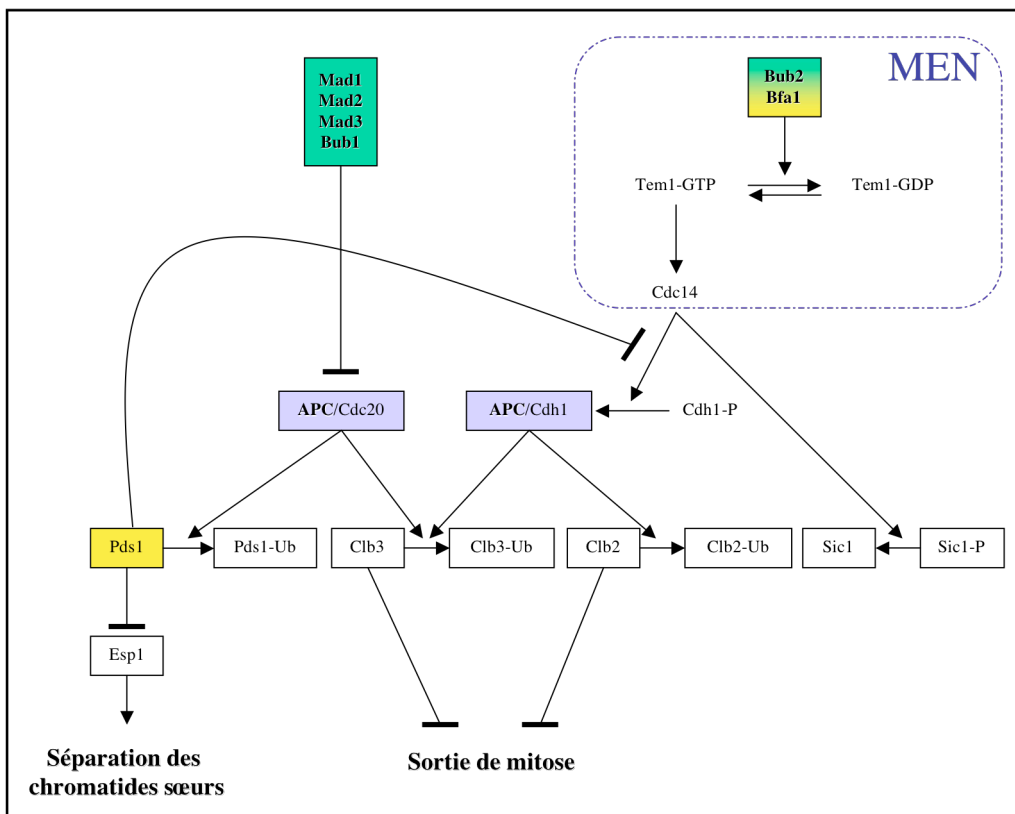
Les données présentées dans le paragraphe précédent permettent de construire un modèle

que nous présentons ci-dessous (cf figure n°I17).

Lors d'un traitement au nocodazole, les cellules sauvages s'arrêtent à la transition métaphase/anaphase puisque la dégradation de Pds1 est inhibée. Ceci avait d'ailleurs été mis en évidence par M.Hoyt et ses collaborateurs puisqu'ils avaient remarqué que l'arrêt induit par des dommages du fuseau ressemble à l'arrêt des mutants *apc* et non pas à celui des mutants *cdc14* ou *cdc15* qui s'arrêtent en télophase (Hoyt et al., 1991). Mais la stabilisation de Pds1 n'est pas seule responsable de l'arrêt. Le checkpoint du fuseau inhibe également de façon indépendante la sortie de mitose. La stabilisation de Pds1 dépend de la voie Mad2, qui comprend la majorité des protéines du checkpoint du fuseau aujourd'hui identifiées. La voie Bub2 quant à elle est responsable de l'inhibition de la sortie de mitose via le maintien d'une forte activité kinase Cdc28. Ainsi, l'inhibition par le nocodazole de l'activité kinase de Dbf2 dans des cellules arrêtées en métaphase dépend de *BUB2* mais pas de *PDS1*, *MAD2* ou *BUB3* (Fesquet et al., 1999).

Bub2 ne peut donc pas être vraiment considérée comme un effecteur du checkpoint du fuseau mais plutôt comme une cible. En effet, elle intervient également dans le blocage du cycle après un stress génotoxique et sa délétion permet au mutant *apc2* de sortir de mitose et de rebourgeonner en l'absence de stress (Hu et al., 2001; Lee et al., 2001b). Comme nous l'avons vu, la GAP Bub2/Bfa1 est ciblée par le checkpoint via l'inhibition de la phosphorylation de Bfa1. En fait c'est plus globalement le réseau MEN qui est ciblé par cet effet, puisque la mutation *cdc14-3* bloque la reréplication du mutant *mad2Δ bub2Δ* et que la surexpression de *TEM1* induit la reréplication chez le mutant *mad2Δ*, ce qui conduit à un phénotype similaire à celui du double mutant *mad2Δ bub2Δ* (Alexandru et al., 1999).

Figure n°I17



**Les deux voies du checkpoint du fuseau et leurs liens avec les blocages de l'anaphase et de la sortie de mitose. D'après (Alexandru et al., 1999).**

Ubiquitine (Ub), groupement phosphate (P), « Mitotic Exit Network » (MEN).

Il est difficile de comprendre pourquoi un seul des deux points de blocage n'est pas suffisant pour maintenir l'arrêt en mitose. Les mutants *mad2Δ* et *bub2Δ* parviennent en effet à rebourgeonner et à initier une reréplication lors d'un traitement prolongé au nocodazole. Il a d'ailleurs été spécifiquement mis en évidence que Clb2 finissait par être dégradée chez les mutants *bub2Δ*, *bfa1Δ* et *mad2Δ* (Fraschini et al., 1999; Li, 1999). Ceci ne semble pas spécifique des problèmes de fuseau puisque la délétion de *BUB2* permet au mutant *apc2* de rebourgeonner en absence de stress. Une altération de la spécificité et/ou de l'activité des complexes APC/Cdc20 et APC/Cdh1 lors d'un arrêt prolongé en mitose pourrait expliquer cette reprise du cycle. En fait, APC/Cdc20 promeut préférentiellement la destruction de Pds1 alors qu'APC/Cdh1 promeut plutôt celle de Clb2. Toutefois, il a été montré que le complexe APC/Cdc20 était responsable d'une première vague de dégradation de Clb2 à la transition métaphase/anaphase, alors que le complexe APC/Cdh1 est responsable de l'étape la plus importante de dégradation de Clb2 en télophase (Yeong et al., 2000). Ainsi, chez le mutant *mad2Δ* où APC/Cdc20 est actif (cf paragraphe suivant), Clb2 pourrait finalement être totalement dégradée via son ubiquitylation par le complexe APC/Cdc20. De même, chez le mutant *bub2Δ*, Pds1 pourrait être à terme ubiquitylée par APC/Cdh1 et dégradée puisqu'il a été montré que Cdc14 était relarguée du nucléole chez le mutant *bfa1Δ* lors d'un traitement au nocodazole, ce qui suggère que la phosphatase Cdc14 est alors active et qu'elle va pouvoir déphosphoryler Cdh1, rendant possible l'interaction APC/Cdh1 et l'activation de ce complexe (Wang et al., 2000). Cependant, l'explication pourrait être plus compliquée puisque la surexpression de *CDC20* induit la dégradation de Clb2 dans des cellules arrêtées au nocodazole, mais cela de façon dépendante de *CDH1* (Tinker-Kulberg and Morgan, 1999).

### 3.4. Le mécanisme d'activation

#### 3.4.1. Inhibition de Cdc20

Les données exposées ci-dessus suggèrent que les mutants *mad2Δ* et *pds1Δ* doivent présenter des phénotypes identiques en cas de dommages du fuseau. Cependant, il a été montré que la cycline Clb3, qui est stabilisée après un traitement au nocodazole, est dégradée chez le mutant *mad2Δ* mais pas chez le mutant *pds1Δ* (Alexandru et al., 1999). En fait, la voie Mad2 n'inhibe pas seulement la dégradation de Pds1. Elle semble plus précisément être responsable d'une inhibition directe du complexe APC/Cdc20, comme nous l'exposons ci-après. Or, ce complexe est responsable de la dégradation de Pds1, mais aussi de celle de Clb3 et Clb5 et sûrement de celle d'autres protéines en mitose. L'impact de la stabilisation des protéines autres que Pds1 ciblées par APC/Cdc20 sur l'arrêt mis en place par le checkpoint du fuseau n'est pas évident et n'a pas été beaucoup étudié.

Des données permettent aujourd'hui de proposer un mécanisme moléculaire expliquant

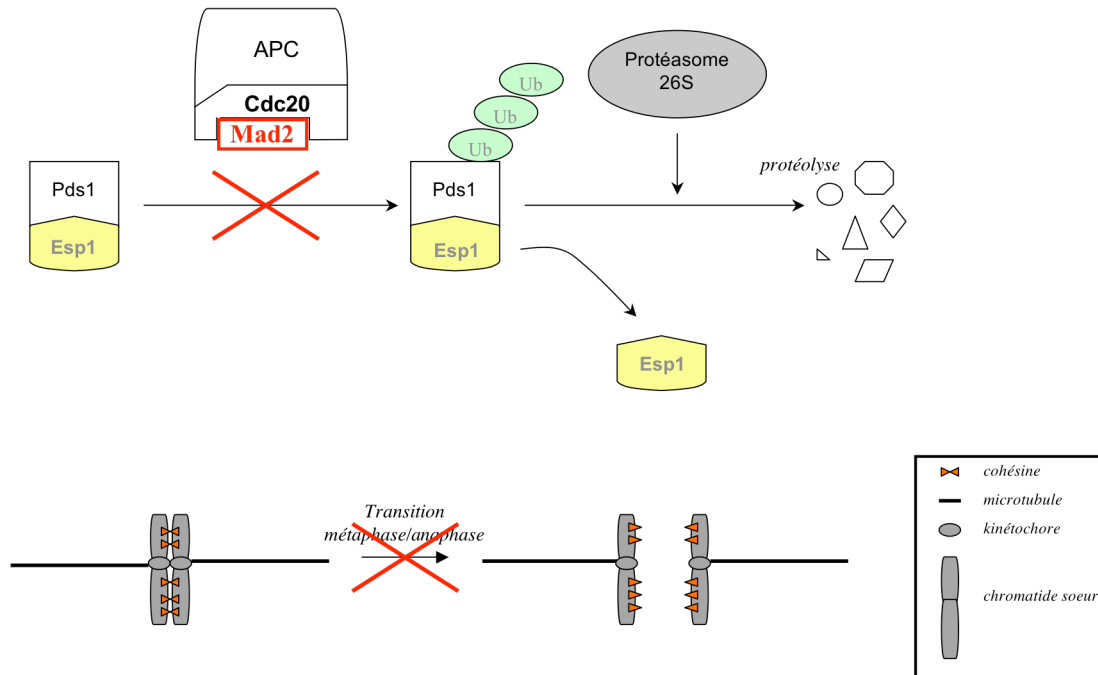
l'inhibition de la transition métaphase/anaphase par le checkpoint du fuseau. Cette inhibition semble nécessiter une interaction directe entre des protéines du checkpoint du fuseau et la protéine Cdc20, interaction qui inactiverait le complexe APC/Cdc20. Par contre, le mécanisme moléculaire permettant au checkpoint du fuseau d'inhiber la sortie de mitose n'est pas élucidé.

#### 3.4.1.1. *Mad2 et Cdc20*

Si l'on relargue des cellules HeLa dans un milieu sans drogue après les avoir traitées au nocodazole, l'activité du complexe APC purifié augmente progressivement comme on peut en juger par l'ubiquitinylation *in vitro* de la cycline B1 de xénope (Fang et al., 1998). Ceci suggère que l'activité de l'APC pourrait être inhibée lorsque le checkpoint du fuseau est activé. Ceci semble être confirmé par le fait que le complexe APC purifié à partir d'extraits d'œufs de xénope montre une activité plus faible *in vitro* envers la cycline B1 si l'on a préalablement ajouté de la protéine hMad2 recombinante à l'extrait (Fang et al., 1998). Cette donnée montre également que la protéine Mad2 pourrait jouer un rôle dans l'inhibition de l'APC. D'ailleurs, l'ajout de hMad2 dans des extraits d'œufs de xénope empêche l'ubiquitinylation des cyclines B et leur protéolyse (Fang et al., 1998; Li et al., 1997). Une interaction entre hMad2, préalablement ajoutée à des extraits d'œufs de xénope arrêtés en mitose, et les sous-unités Cdc16 et Cdc27 de l'APC de xénope a été mise en évidence (Li et al., 1997). De plus, une interaction plus physiologique entre Mad2 et les sous-unités Cdc16 et Cdc27 de l'APC dans des cellules HeLa traitées au nocodazole a été détectée (Li et al., 1997). C'est pourquoi il a été proposé en premier lieu que la protéine Mad2 inhibe directement le complexe APC (Li et al., 1997).

Cependant, des données suggèrent que l'interaction entre Mad2 et l'APC pourrait se faire par l'intermédiaire de Cdc20, une sous-unité régulatrice de l'APC, qui a pu être co-purifiée dans les expériences précédentes (cf figure n°118). En effet, une interaction entre Cdc20 et Mad2 a été mise en évidence chez *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, mais également chez les cellules humaines (Fang et al., 1998; Hwang et al., 1998; Kim et al., 1998). Chez *Saccharomyces cerevisiae*, les auteurs soulignent d'ailleurs qu'ils n'ont pas réussi à observer une interaction directe entre l'APC et Mad2 (Hwang et al., 1998). L'ensemble des résultats obtenus peuvent être concordants puisque l'existence d'un complexe ternaire Mad2-Cdc20-APC *in vivo* a été proposée chez l'homme. Des interactions deux à deux ont en effet été mises en évidence chez des cellules HeLa traitées au nocodazole et il a été observé que Mad2 n'interagissait pas avec l'APC *in vitro* en absence de Cdc20 (Fang et al., 1998). L'hypothèse que Mad2 soit capable d'inhiber l'APC par l'intermédiaire de Cdc20 est confortée par le fait que la préincubation de hCdc20 avec hMad2 inhibe complètement la capacité de hCdc20 à activer l'APC purifié à partir d'œufs de xénope en interphase *in vitro* (Fang et al., 1998).

Figure n°I18



**Mad2 inhibe la dégradation de Pds1 et l'initiation de l'anaphase.**

À la transition métaphase/anaphase, la sécurine Pds1 est ubiquitinylée par le complexe APC/Cdc20 et dirigée vers le protéasome. La dégradation de Pds1 active la séparase Esp1 qui est inhibée par son interaction avec Pds1. Esp1 clive la cohésine, qui maintient les chromatides sœurs attachées. Ceci permet la ségrégation des chromatides sœurs vers les pôles du fuseau.

Des données obtenues chez la levure bourgeonnante et la levure fissipare suggèrent que Cdc20 est bien une cible du checkpoint du fuseau *in vivo* et que l'interaction Cdc20/Mad2 est nécessaire à l'inhibition du complexe APC et au blocage du cycle en cas de dommages du fuseau. En effet, chez *Saccharomyces cerevisiae*, la surexpression de *CDC20* permet aux cellules de rebourgeonner en présence de nocodazole de façon dépendante de l'APC et de dégrader à terme Clb2 (Hwang et al., 1998; Tinker-Kulberg and Morgan, 1999). La surexpression de *CDC20* permet également de supprimer l'arrêt induit par le nocodazole dans les cellules HeLa (Tang et al., 2001). Chez *S. cerevisiae*, des mutants *cdc20* défectueux pour l'interaction avec Mad2 mais qui ne sont pas affectés pour les fonctions essentielles de Cdc20 ont été identifiés. L'expression de ces mutants supprime l'arrêt des cellules surexprimant *MPS1* et leur permet de proliférer. Elle permet également à des cellules traitées au nocodazole de rebourgeonner (Hwang et al., 1998). Par ailleurs, il a été montré par FACS, que l'un de ces mutants montre le même retard dans la cinétique de reréplication que le mutant *mad2Δ* en cas de traitement au nocodazole alors que le double mutant *cdc20 bub2Δ* se comporte comme le mutant *bub2Δ mad2Δ* (Alexandru et al., 1999). La dégradation de Clb2 observée chez le double mutant *pds1Δ bub2Δ* (Alexandru et al., 1999) semble confirmer que ce n'est pas le complexe APC qui est inhibé mais le complexe APC/Cdc20 chez *S. cerevisiae*. Chez *S. pombe*, un mutant *slp1* (*slp1+* est l'homologue chez la levure fissipare de *CDC20*), défectueux pour l'interaction avec Mad2 mais ne présentant pas de défaut lors d'un cycle normal, est sensible au thiabendazole comme le mutant *mad2Δ* (Kim et al.,

1998). De plus, ce mutant supprime l'arrêt en métaphase du mutant *cut7* (mutant défectueux pour l'assemblage du fuseau) et le double mutant *slp1 cut7* présente une accumulation de cellules à 4C d'ADN, de manière identique à ce que l'on observe chez le double mutant *cut7 mad2Δ* (Kim et al., 1998). Par ailleurs, la croissance des mutants *cut4* et *cut9* (*cut4+* et *cut9+* codent pour deux sous-unités de l'APC) est affectée par la surexpression de *mad2+* contrairement à celle des doubles mutants *cut4 slp1* et *cut9 slp1* (Kim et al., 1998).

Des données contradictoires ont été obtenues concernant la régulation de l'interaction Cdc20/Mad2. En effet, chez *Saccharomyces cerevisiae*, l'interaction Mad2/Cdc20 semble être constitutive. Le signal montrant l'interaction est moins fort pour des cellules asynchrones ou en phase G1, mais le taux de Cdc20 est également plus faible dans ces conditions (Hwang et al., 1998). Par contre, dans les cellules HeLa, l'interaction entre Mad2 et Cdc20 semble être plus faible en G1/S que lors d'un blocage en mitose induit par un traitement au nocodazole (Tang et al., 2001). De plus, dans les cellules HeLa, Mad2 semble se dissocier du complexe APC/Cdc20 après le relargage d'un blocage au nocodazole (Fang et al., 1998; Li et al., 1997). Cdc20 se dissocie un peu plus tard du complexe APC et ce dernier se lie alors à Cdh1 (Fang et al., 1998). Le modèle suivant a été proposé : l'association Mad2/Cdc20/APC n'a lieu qu'en mitose et le blocage dû au checkpoint du fuseau dure tant que Mad2 reste associé au complexe APC/Cdc20 ; l'APC est ensuite activé par sa liaison avec Cdc20 lorsque le checkpoint est désactivé ; puis la liaison d'APC avec Cdh1 va permettre une activation plus tardive du complexe et conduire à la dégradation des cyclines B et contribuer à la sortie de mitose (Fang et al., 1998). Les différentes données obtenues concernant la régulation de l'interaction Cdc20/Mad2 pourraient refléter des spécificités de chaque organisme. Cependant, il est possible que l'affinité de Mad2 pour Cdc20 soit aussi moins forte en interphase chez la levure mais que ceci soit difficile à mettre en évidence à cause du plus faible taux de Cdc20 pendant cette phase du cycle.

L'étude de Fang *et al.*, 1998 montre que hMad2 exprimé chez *E. coli* existe sous forme de monomères et tétramères, mais que seule la forme tétramérique est capable d'inhiber le complexe APC. Ceci pourrait refléter le fait que la protéine Mad2 doit subir un changement conformationnel pour pouvoir jouer un rôle inhibiteur. Nous ne savons pas à ce jour pourquoi la liaison de Mad2 avec Cdc20 bloque biochimiquement l'activité du complexe APC.

### 3.4.1.2. *BubR1* et *Cdc20*

Mad2 ne semble pas être la seule protéine du checkpoint du fuseau capable d'inhiber le complexe APC/Cdc20. En effet, il a été montré que BubR1 interagissait physiquement avec Cdc20 en co-immunoprécipitation dans les cellules HeLa (Fang, 2002; Tang et al., 2001). Comme l'interaction Mad2/Cdc20, l'interaction entre BubR1 et Cdc20 dans les cellules HeLa semble être plus forte en mitose qu'en interphase, cela en présence ou en absence de nocodazole, et cette interaction disparaît lors du relargage des cellules après un blocage au nocodazole (Fang, 2002; Tang et al., 2001). Par ailleurs, nous avons vu dans le paragraphe précédent que la présence de hCdc20 augmentait fortement l'activité *in vitro* du complexe APC purifié à partir d'extraits d'œufs de xénope en interphase et que la préincubation de hCdc20 avec hMad2 (sous forme d'oligomères) supprimait cet effet (Fang et al., 1998). Il en est de même si la protéine hMad2 est ajoutée de façon concomitante à hCdc20 (Tang et al., 2001). Il a été montré, dans ces conditions, que hBubR1 inhibait également l'activation de l'APC par hCdc20, contrairement à hBub1 et hBub3. Cet effet est spécifique de Cdc20 puisqu'on ne l'observe pas pour le complexe APC/Cdh1 (Tang et al., 2001). BubR1 paraît d'ailleurs être un inhibiteur plus efficace puisque

l'on observe une même inhibition du complexe APC/Cdc20 à des concentrations de BubR1 inférieures à celles de hMad2 *in vitro* (Fang, 2002; Tang et al., 2001). Il a ainsi été supposé, connaissant les concentrations physiologiques de Mad2 et BubR1, que BubR1 pourrait inhiber seul APC/Cdc20 *in vivo* alors qu'il est peu probable que Mad2 se lie directement à Cdc20 dans la cellule sans l'intervention d'autres protéines (Tang et al., 2001).

BubR1 et Mad2 montrent des effets synergiques concernant l'inhibition d'APC/Cdc20 *in vitro* (Fang, 2002; Tang et al., 2001). En effet, l'addition concomitante de BubR1 et de Mad2 à des concentrations où ces protéines n'inhibent pas l'activation de l'APC par Cdc20 lorsqu'elles sont présentes seules, permet de retrouver une inhibition maximale d'APC/Cdc20 (Fang, 2002). Par ailleurs, Mad2 semble promouvoir l'interaction entre BubR1 et Cdc20 et inversement (Fang, 2002). La protéine BubR1 semble être importante pour comprendre le mécanisme d'action du checkpoint du fuseau puisqu'elle est un meilleur inhibiteur *in vitro* d'APC/Cdc20 que Mad2. Le fait que la surexpression de *BUBR1* permette de restaurer l'arrêt des cellules HeLa traitées au nocodazole et surexprimant *CDC20*, suggère que BubR1 est également un inhibiteur *in vivo* de Cdc20 (Tang et al., 2001).

Le complexe APC semble devoir être modifié pour pouvoir subir l'influence du checkpoint du fuseau. En effet, BubR1 est capable d'inhiber le complexe APC/Cdc20 si le complexe APC a été purifié à partir de cellules HeLa en phase S, G2 ou en début de mitose, mais pas si la purification a été faite à partir de cellules en fin de mitose ou en phase G1 (Tang et al., 2001). De même, BubR1 bloque efficacement l'activité du complexe APC/Cdc20, si l'APC a été purifié à partir d'extraits d'œufs de xénope en interphase et pas en mitose (Tang et al., 2001).

Chez la levure, Mad3 pourrait également être un inhibiteur de l'APC/Cdc20. En effet, Mad3 interagit avec Cdc20 via une des deux régions de similarité qu'elle possède avec Bub1 (Hardwick et al., 2000; Hwang et al., 1998). Par ailleurs, un mutant *mad3* défectueux pour cette interaction est aussi sensible au bénomyle que le délétant *mad3Δ*, ce qui suggère que cette liaison est critique pour le bon fonctionnement du checkpoint (Hardwick et al., 2000).

### 3.4.2. L'activation de Mad2 par Mad1

C'est pour les protéines Mad1 et Mad2 que les mécanismes moléculaires régulant les interactions entre protéines du checkpoint du fuseau sont les mieux compris. Mad1 forme un complexe avec Mad2, dont la concentration est constante tout au long du cycle (Yu, 2006). Ce complexe est un tétramère composé de deux sous-unités Mad2 et deux sous-unités Mad1. Mad1 est nécessaire au recrutement de Mad2 au niveau des kinétochores non attachés en prométaphase. Un même site de Mad2 est responsable de son interaction avec Mad1 et avec Cdc20 et ces protéines montrent une affinité similaire pour Mad2, suggérant que Mad1 et Cdc20 sont en compétition pour la liaison avec Mad2 (May and Hardwick, 2006; Yu, 2006). Cependant, il a été montré que Mad1 était nécessaire à l'interaction entre Mad2 et Cdc20 *in vivo* (Hwang et al., 1998). C'est pourquoi il a été supposé dans un premier temps que le recrutement au kinétochore de Mad2 par Mad1 stimulait l'échange d'une forme inactive de Mad2 liée à Mad1 en une forme active de Mad2 liée à Cdc20 (Luo et al., 2004). Cependant, le mécanisme d'activation du checkpoint semble être un peu plus compliqué.

En fait, Mad2 semble pouvoir adopter deux conformations différentes : une conformation dite ouverte (« O-Mad2 ») et une conformation dite fermée (« C-Mad2 »). La différence entre les deux conformations se situe principalement au niveau des 50 derniers acides aminés de la protéine. Lorsque Mad2 est liée à Mad1 ou Cdc20, elle est dans la conformation fermée. De



façon imagée, Mad2 semble dans cette conformation emprisonner son ligand à la manière d'une ceinture de sécurité (Yu, 2006). *In vitro*, la protéine Mad2 exprimée chez *E. coli* se présente principalement sous deux formes : une monomérique et une dimérique. La forme monomérique adopte la conformation ouverte. Cette forme ouverte monomérique est capable de se dimériser, voire de s'oligomériser, *in vitro*. Elle est également capable, lorsqu'elle est incubée plusieurs heures à 30°C, de se transformer en forme fermée (Luo et al., 2004). La forme dimérique *in vitro* comporte des conformations fermées de Mad2 bien qu'*in vitro*, la dimérisation ne soit pas absolument indispensable au changement de conformation (Luo et al., 2004). L'ensemble de ces données montre que la forme fermée est plus stable que la forme ouverte, au moins *in vitro*. La forme fermée semble par ailleurs être plus stable sous forme de dimère que sous forme de monomère. Par ailleurs, il a été montré que des hétérodimères O-Mad2/C-Mad2 peuvent se former *in vitro*. Ces hétérodimères sont instables et sont rapidement convertis en homodimères C-Mad2/C-Mad2 (Luo et al., 2004), ce qui suggère que la dimérisation facilite le changement de conformation. Des données plus anciennes indiquent que le dimère, voire le tétramère, inhibe beaucoup plus efficacement l'APC *in vitro* (Fang et al., 1998). De plus, un monomère sous forme fermée inhibe bien mieux la dégradation des cyclines B dans des extraits d'œufs de xénope que la forme ouverte bien que l'inhibition soit un peu plus faible qu'avec le dimère sous conformation fermée (Luo et al., 2004), ce qui suggère que la dimérisation et le changement de conformation de Mad2 pourraient être requis pour le blocage du cycle en cas de dommages du fuseau. *In vivo*, il a été montré que, dans les cellules HeLa, une partie du pool de Mad2 était monomérique alors que l'autre comprenait des protéines Mad2 associées à des complexes comprenant Mad1 ou Cdc20, et que la forme libre monomérique avait une conformation ouverte *in vivo* (Luo et al., 2004; Sudakin et al., 2001). Le maintien dans la cellule du pool ouvert monomérique, alors que cette forme est la moins stable *in vitro*, n'est pas compris.

L'influence de Mad1 sur la dimérisation et le changement de conformation de Mad2 a également été étudiée. La présence d'un petit peptide de Mad1 capable de se lier à Mad2 permet d'accélérer la conversion d'un monomère de la forme ouverte à la forme fermée *in vitro* (Luo et al., 2004). Cependant, l'ajout de Cdc20 n'entraîne pas le relargage de Mad2 du complexe Mad1/Mad2 *in vitro*, ce qui est en contradiction avec un modèle où le recrutement au kinétochore de Mad2 par sa liaison avec Mad1 stimulerait sa liaison avec Cdc20 via la catalyse du changement de conformation de Mad2 par Mad1 (« Mad2 exchange model », (Luo et al., 2004)) (De Antoni et al., 2005). En fait, suite à l'ajout de protéines Mad2 au complexe Mad1/Mad2 *in vitro*, une partie de pool de Mad2 se complexe avec Mad1/Mad2. L'addition de Cdc20 entraîne la dissociation de Mad2 du complexe Mad1/Mad2 (De Antoni et al., 2005). C'est d'ailleurs les protéines Mad2 qui s'étaient d'abord greffées à ce complexe qui se dissocient et ces protéines, qui montrent une conformation fermée, sont alors liées à Cdc20 (De Antoni et al., 2005). L'ajout d'une protéine Mad2 $\Delta$ C, déficiente pour la liaison à Cdc20 ou Mad1, entraîne sa liaison à Mad1/Mad2, suggérant que la protéine Mad2 $\Delta$ C rajoutée se lie à Mad2 et non pas à Mad1 et qu'elle a une conformation ouverte. L'ajout ultérieur de Cdc20 n'engendre pas la dissociation de Mad2 $\Delta$ C du complexe Mad1/Mad2. De plus, le mutant Mad2-R133A-Q134A, incapable de se dimériser mais capable de se lier à Mad1 et Cdc20, ne se lie pas à Mad1/Mad2 lors de ce test (De Antoni et al., 2005). Ainsi, O-Mad2 semble se lier à C-Mad2 du complexe Mad1/Mad2 *in vitro* et cette protéine semble changer de conformation et se lier ensuite à Cdc20. Ceci est en accord avec les données obtenues *in vitro* qui suggéraient que la dimérisation facilite le changement de conformation ouvert/fermé (Luo et al., 2004). L'injection de protéines Mad2 marquées dans les cellules PtK1 indique que la protéine Mad2 $\Delta$ C est, comme la protéine Mad2 sauvage, capable de

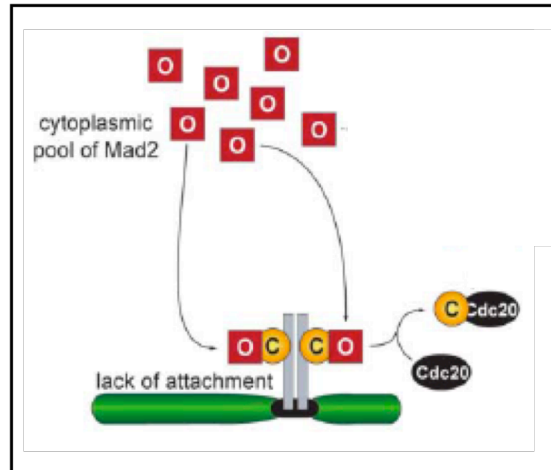
se lier aux kinétochores non attachés, ce qui n'est pas le cas pour les protéines Mad2-R133A-Q134A et Mad2 $\Delta$ C-R133A-Q134A (De Antoni et al., 2005). L'ensemble de ces données suggère que le complexe Mad1/Mad2, plutôt que la protéine Mad1 seule permet le recrutement du pool libre de Mad2 sous sa forme ouverte aux kinétochores non attachés, via sa dimérisation avec la protéine Mad2 liée à Mad1. Ce recrutement favorise le changement de conformation et la liaison à Cdc20 (De Antoni et al., 2005). Ce modèle permet d'expliquer les résultats suivants obtenus *in vivo*. La surexpression de Mad2 $\Delta$ C dans des cellules HeLa, contrairement à celle de la protéine Mad2 sauvage, n'engendre pas d'arrêt en métaphase. De même, les cellules exprimant Mad2 $\Delta$ C ne montrent pas d'arrêt en mitose lors d'un traitement au nocodazole. Cdc20 ne permet probablement pas le relargage de Mad2 $\Delta$ C du kinétochore, bloquant ainsi l'activation du checkpoint du fuseau. La surexpression de Mad2 $\Delta$ C-R133A n'engendre pas d'arrêt en mitose, contrairement à la surexpression de Mad2-R133A<sup>1</sup>, et son expression ne supprime pas l'arrêt du cycle causé par le nocodazole. Mad2 $\Delta$ C-R133A ne gêne probablement pas l'activation du checkpoint du fuseau par les protéines endogènes puisqu'elle n'est pas recrutée au niveau des kinétochores non attachés. Par contre, la protéine Mad2-R133A lorsqu'elle est surexprimée se lie probablement à Cdc20 et inhibe ainsi la transition métaphase/anaphase. Ceci semble montrer que la dimérisation de Mad2 en tant que telle n'est pas nécessaire pour bloquer le cycle mais semble plutôt faciliter l'activation de Mad2 (De Antoni et al., 2005; Luo et al., 2004).

Le modèle suivant a donc été établi : Mad2 est présente majoritairement dans le cytosol. Elle possède alors une conformation monomérique ouverte. Mad1 promeut la liaison aux kinétochores non attachés du complexe Mad1/Mad2. Le pool libre de Mad2 est recruté au niveau des kinétochores sous sa forme ouverte par le complexe Mad1/Mad2 via sa dimérisation avec le C-Mad2 du complexe. Il n'y a pas d'échange entre O-Mad2 et C-Mad2. Par contre, cette liaison facilite la liaison entre Mad2 et Cdc20. Le complexe final Cdc20/C-Mad2 représente une copie structurelle de Mad1/C-Mad2 d'où le nom du modèle : « Mad2 template model » (De Antoni et al., 2005) (cf figure n°119). La dimérisation au niveau du kinétochore pourrait faciliter le changement de conformation de Mad2, ce qui conduirait à la transformation de l'hétérodimère O-Mad2/C-Mad2 en l'homodimère C-Mad2/C-Mad2. Il est possible que C-Mad2 ait une affinité plus importante pour Cdc20 que O-Mad2 puisque la forme fermée a une plus grande capacité d'inhibition du complexe APC présent dans des extraits d'œufs de xénope (Luo et al., 2004). Le changement de conformation pourrait ainsi promouvoir la liaison à Cdc20.

---

<sup>1</sup> Mad2-R133A semble posséder les mêmes caractéristiques que Mad2-R133A-Q134A. Ces deux protéines sont incapables de se dimériser, mais elles sont capables de se lier à Mad1 et Cdc20.

Figure n°I19



**Activation de Mad2 aux kinétochores des chromatides non attachées. Extrait de (De Antoni et al., 2005).**

Mad2 est recruté au niveau des kinétochores non attachés au fuseau sous sa forme ouverte (O-Mad2) via sa liaison avec le complexe Mad1/C-Mad2 (Mad1 est représentée par un rectangle gris sur la figure, O-Mad2 par un carré rouge et C-Mad2 par un disque jaune-orangé). O-Mad2 se transforme alors en C-Mad2 et se lie à Cdc20. La chromatide sœur est représentée en vert, le kinétochore en noir.

Plusieurs hypothèses ont été émises quant à la formation du complexe C-Mad2/Cdc20. Nous savons déjà que le complexe Mad1/Mad2 reste intact : le fait que la protéine mutante Mad2-R133A-Q134A, qui est capable de se lier à Mad1 mais pas de se dimériser, ne soit pas visible au niveau des kinétochores suggère fortement qu'il n'y a pas de protéine Mad1 non complexée à Mad2 aux kinétochores et que le complexe Mad1/Mad2 est stable pendant l'activation du checkpoint (De Antoni et al., 2005). Par ailleurs, l'étude de la dynamique des protéines par FRAP au niveau des kinétochores non attachés a montré que la protéine Mad1 était stablement attachée aux kinétochores (70 à 75% du pool de Mad1 est statique), alors qu'au contraire, la protéine Mad2 cyclait rapidement (Howell et al., 2004; Shah et al., 2004). La quantité de Mad2 qui cycle au niveau du kinétochore varie selon les études, sûrement à cause de taux de surexpression de Mad2 différents. Cependant, il se pourrait que seule la moitié du pool de Mad2 cycle (Shah et al., 2004). Il se pourrait d'ailleurs que cette partie cycle avec Cdc20 qui montre une dynamique similaire (Howell et al., 2004). Ceci remettrait également en cause le fait que le complexe Mad1/Mad2 soit dissocié, ce qui impliquerait que la totalité des protéines Mad2 cycle au niveau du kinétochore.

Cdc20 pourrait se lier à C-Mad2 au niveau du kinétochore. En effet, Mad2 et Cdc20 semblent colocaliser au niveau des kinétochores non attachés (Fang et al., 1998). Le complexe C-Mad2/Cdc20 serait alors relargué, pour qu'une autre molécule Mad2 puisse être activée de la même manière. Le complexe C-Mad2/Cdc20 ainsi relargué pourrait, comme le complexe C-Mad2/Mad1, se lier à une molécule O-Mad2 du pool cytoplasmique et l'activer de manière similaire, permettant ainsi l'amplification du signal loin du kinétochore (De Antoni et al., 2005). Comme nous l'avons souligné, le complexe Mad1/Mad2 est un tétramère. Il est donc également possible que les deux C-Mad2 nouvellement formés se dimérisent et qu'ils quittent ensemble le

kinétochore et se lie à Cdc20 (Yu, 2006).

Il est possible que d'autres protéines du checkpoint du fuseau interviennent pour compléter et/ou favoriser l'action inhibitrice de Mad2 vis-à-vis du complexe APC/Cdc20.

### 3.4.3. Les complexes

De nombreuses interactions entre les différentes protéines du checkpoint du fuseau ont été identifiées et de nombreux complexes ont été décrits. Cependant, la composition exacte de ces complexes et surtout leur rôle au sein du checkpoint du fuseau ne sont pas clairs. Nous détaillons ci-dessous quelques données concernant les complexes les mieux caractérisés à ce jour.

Une partie de ces complexes est présente tout au long d'un cycle non perturbé avec un taux constant. Il s'agit des complexes Mad1/Mad2, Bub1/Bub3 et Mad3-BubR1/Bub3 (Brady and Hardwick, 2000; Chen et al., 1999; Fraschini et al., 2001b; Hardwick et al., 2000; Malmanche et al., 2006; Musacchio and Hardwick, 2002; Roberts et al., 1994). Leur formation est indépendante de la présence des autres protéines du checkpoint (Brady and Hardwick, 2000; Chen et al., 1999; Hardwick et al., 2000). Le complexe Mad1/Mad2 est un complexe très stable dont la formation est indépendante de l'état de phosphorylation de Mad1 et qui permet probablement le recrutement de Mad2 aux kinétochores et son activation, comme nous l'avons vu précédemment (Chen et al., 1999; Yu, 2006). La majorité du pool de Mad1 serait présente dans ce complexe (Shah et al., 2004). Bub3 est quant à elle nécessaire à la localisation de Bub1 et BubR1 aux kinétochores. La formation de ces complexes semble être nécessaire au bon fonctionnement du checkpoint du fuseau. Par exemple, un mutant *mad3* défectueux pour l'interaction avec Bub3 est presque aussi sensible au bénomyle que le délétant *mad3Δ* (Hardwick et al., 2000). Ces complexes constitutifs pourraient s'agrèger ou subir des réorganisations pour former des complexes de taille supérieure responsables de l'inhibition de APC/Cdc20 ou d'autres rôles au sein du checkpoint.

Ainsi, chez *Saccharomyces cerevisiae*, Mad1 semble s'associer au complexe Bub1/Bub3 au cours du cycle, probablement au moment où les chromosomes s'attachent au fuseau (Brady and Hardwick, 2000). L'interaction est renforcée lors d'un traitement au nocodazole. La formation de ce complexe dépend de *MAD2* (Brady and Hardwick, 2000). Un mutant *mad1* défectueux pour l'interaction avec Bub1/Bub3 mais pas pour l'interaction avec Mad2 est sensible au bénomyle de manière similaire au mutant *mad1Δ*, ce qui suggère que l'interaction de Mad1 avec le complexe Bub1/Bub3 est nécessaire pour la réponse aux dommages du fuseau (Brady and Hardwick, 2000).

Par chromatographie, plusieurs équipes ont essayé de déterminer le ou les complexes présents en cas d'activation du checkpoint et plus particulièrement ceux qui seraient responsables de l'inhibition d'APC/Cdc20. Pour cette fonction particulière, un complexe émerge. Il s'agit du « Mitotic Checkpoint Complex » ou MCC qui comprend les protéines BubR1/Mad3, Bub3, Mad2 et Cdc20. Il a tout d'abord été identifié comme le complexe qui, isolé à partir du lysat de cellules HeLa traitées au nocodazole, inhibe le plus fortement le complexe APC *in vitro* (Sudakin et al., 2001). Les auteurs ont d'ailleurs ajouté que les autres complexes, issus de la colonne de gel filtration, et notamment d'autres fractions contenant Mad2, ne montraient pas d'activité inhibitrice (Sudakin et al., 2001). Le MCC inhibe le complexe APC *in vitro* avec une meilleure efficacité que le tétramère Mad2 recombinant (Sudakin et al., 2001). Ce complexe a également été identifié chez *S. cerevisiae* sous la forme Mad3/Bub3/Mad2/Cdc20 (Fraschini et al., 2001b; Hardwick et al., 2000). Par contre, il n'y a pas de consensus quant à la stœchiométrie de chaque

composant. Bub3 pourrait faire partie du complexe MCC via sa liaison constitutive avec BubR1/Mad3 (Tang et al., 2001).

Comme nous l'avons déjà souligné, plusieurs études ont permis de conduire à l'hypothèse d'un rôle inhibiteur des protéines Mad2 et BubR1 vis-à-vis du complexe APC/Cdc20, rôle qui ne serait pas partagé par les protéines Bub1 et Bub3 (Tang et al., 2001). Brièvement, Mad2 et BubR1 interagissent avec Cdc20 *in vivo* et sont capables d'inhiber le complexe APC/Cdc20 *in vitro* (Fang, 2002; Fang et al., 1998; Hwang et al., 1998; Kim et al., 1998; Tang et al., 2001). Par ailleurs, il a été spécifiquement montré que la perte de l'interaction entre Mad2 et Cdc20 engendrait des défauts de la réponse aux dommages du fuseau (Hwang et al., 1998; Kim et al., 1998). Ceci semble être en accord avec le fait que les protéines Mad2 et BubR1 fassent partie du complexe MCC. De plus, les effets synergiques observés *in vitro* entre Mad2 et BubR1 (Fang, 2002; Tang et al., 2001) pourraient ainsi s'expliquer par la présence d'un complexe plus stable associé à Cdc20 lorsque les deux protéines sont présentes. D'ailleurs, il avait été remarqué que Mad2 promouvait l'interaction de BubR1 avec Cdc20 *in vitro* seulement si Mad2 était capable d'interagir avec Cdc20 (Fang, 2002). Cependant, le fractionnement d'extraits de cellules HeLa arrêtées au nocodazole par une colonne de chromatographie suivi d'expériences de co-immunoprécipitation semble indiquer que Mad2 se complexe à Cdc20 sans que BubR1 ne soit présent et inversement (Fang, 2002; Tang et al., 2001). Ceci avait conduit les auteurs à supposer que BubR1 et Mad2 formaient des complexes séparés avec Cdc20 et qu'il n'existait pas de complexe ternaire stable (Fang, 2002). La nature du complexe inhibiteur de l'APC n'est donc pas claire. Il est même possible que plusieurs complexes jouent ce rôle *in vivo*. Toutefois, Mad2 et BubR1 jouent sans doute des rôles clés dans ces complexes. Des investigations complémentaires sur le complexe MCC sont certainement à ne pas négliger.

Nous avons déjà souligné le fait que des hypothèses contradictoires avaient été émises concernant la régulation de l'interaction Cdc20/Mad2. Il a en effet été proposé que l'interaction soit constitutive chez *S. cerevisiae*, alors qu'il a été proposé que l'association Cdc20/Mad2 n'ait lieu qu'en mitose chez les cellules HeLa (Fang et al., 1998; Hwang et al., 1998). Des données non concordantes ont également été obtenues concernant le fait que le complexe MCC soit présent tout au long du cycle ou non. Il semble être présent en G1/S chez les cellules HeLa (Sudakin et al., 2001), mais semble se former seulement de façon transitoire dans le cycle chez *S. cerevisiae* (Fraschini et al., 2001b). Toutefois, plusieurs données semblent indiquer que les interactions Mad2/Cdc20 et Mad2/BubR1 sont renforcées en mitose, voire que le complexe MCC s'accumule en cas d'activation du checkpoint du fuseau chez la levure comme chez les cellules de mammifères (Fraschini et al., 2001b; Hardwick et al., 2000; Lew and Burke, 2003; May and Hardwick, 2006). Chez les mammifères, un pool préformé de complexes MCC pourrait permettre une inhibition rapide du complexe APC lorsque les cellules entrent en mitose. De toute façon, il a été montré que seul le complexe APC présent en mitose est sensible à l'inhibition par Mad2, BubR1 et MCC, probablement parce que l'APC doit être phosphorylé pour subir l'influence du checkpoint du fuseau (Sudakin et al., 2001; Tang et al., 2001).

Il a été montré *in vivo* que l'interaction entre Cdc20 et Mad2 est essentielle pour la réponse aux dommages du fuseau (Hwang et al., 1998; Kim et al., 1998). Par contre, on ne comprend pas vraiment comment cette liaison peut entraîner une inhibition du complexe APC. On peut imaginer que Mad2, ou plus généralement les complexes inhibiteurs de l'APC, agissent en séquestrant Cdc20 et en empêchant ainsi sa liaison à l'APC. En accord avec cette idée, il

semble que l'addition de BubR1 ou de Mad2 (sous forme d'oligomères) inhibe l'interaction entre Cdc20 et APC *in vitro* (Tang et al., 2001). De plus, Mad2 et BubR1 montrent des capacités inhibitrices *in vitro* seulement si l'APC n'a pas déjà été activé par Cdc20 (Fang, 2002). Cependant, des interactions entre des protéines du checkpoint du fuseau et l'APC ont été détectées, ce qui semble remettre en cause cette hypothèse et suggérer plutôt l'existence d'un complexe ternaire inhibiteur/Cdc20/APC. Ainsi, dans une colonne de chromatographie, le complexe MCC co-migre avec l'APC (Sudakin et al., 2001). De plus, le complexe APC, comme BubR1, Bub3 et Mad2 co-immunoprécipite avec Cdc20 dans des cellules HeLa en mitose ou arrêtées au nocodazole (Fang, 2002). Cette équipe a enfin plus particulièrement mis en évidence une interaction entre BubR1 et l'APC présente lors d'un blocage au nocodazole mais absente en G1/S (Fang, 2002).

#### 4. La désactivation du checkpoint du fuseau

Peu de choses sont connues quant au processus de désactivation du checkpoint du fuseau. Nous présentons ici deux mécanismes qui pourraient y contribuer.

Le premier concerne la présence des protéines du checkpoint du fuseau au niveau des kinétochores non attachés. Ces kinétochores sont souvent considérés comme des plates-formes qui catalysent l'activation de Mad2 et peut-être d'autres protéines du checkpoint, voire catalysent la formation des complexes inhibiteurs de l'APC/Cdc20. Il a été montré chez les mammifères que le complexe RZZ était nécessaire à la localisation de Mad1 et Mad2 au niveau des kinétochores non attachés. Ceci pourrait expliquer pourquoi en l'absence des composants du complexe RZZ, les cellules ne montrent pas d'arrêt en mitose suite à des dommages du fuseau (Karess, 2005). Mais RZZ pourrait également intervenir dans la désactivation du checkpoint.

Le complexe RZZ semble être présent uniquement chez les eucaryotes supérieurs, puisque aucun homologue clair n'a été identifié chez la levure. Il est composé de trois sous-unités : Rod, Zw10 et Zwilch. En fin de prophase, ses composants s'accumulent sur les kinétochores, comme les protéines Mad et Bub. Le recrutement au kinétochore de RZZ semble être nécessaire à ses fonctions au sein du checkpoint. Lorsque les microtubules s'accrochent, l'accumulation de RZZ au kinétochore disparaît. Ses composants sont en fait redistribués le long des microtubules en direction des pôles (Karess, 2005). Cette « redistribution » est dépendante de la dynéine et de la dynactine et fait partie d'un processus général qui permet d'enlever plusieurs protéines du kinétochore externe en les transportant le long des microtubules en direction des pôles où elles se dispersent éventuellement. En début d'anaphase, les protéines du complexe RZZ se dissocient des microtubules alors qu'une certaine quantité subsiste au niveau des kinétochores. En fait, le complexe RZZ est nécessaire au recrutement de la dynéine et de la dynactine au niveau du kinétochore. En étant recruté au kinétochore, le complexe RZZ participe donc à sa propre élimination des kinétochores. De façon intéressante, Mad2 semble quitter le kinétochore, une fois que celui-ci est attaché à des microtubules, également par le processus dépendant de la dynéine et de la dynactine. En effet, une inhibition de la dynéine ou de la dynactine empêche Mad2 d'être enlevée du kinétochore des chromosomes bi-orientés et les cellules montrent un retard pour le passage métaphase/anaphase. RZZ et la dynéine/dynactine pourraient donc participer à l'extinction du checkpoint en enlevant des protéines clés comme Mad2 des kinétochores mais aussi Mad1, voire BubR1 (Karess, 2005). Le complexe RZZ en amenant deux protéines cruciales aux kinétochores, Mad2 et la dynéine/dynactine, contribue à la fois à l'activation et à

l'inactivation du checkpoint (Karess, 2005).

Chez *Saccharomyces cerevisiae*, la dégradation de la kinase Mps1 pourrait également être impliquée dans l'inactivation du checkpoint. En fin de mitose, le checkpoint ne semble plus être actif puisque Pds1 n'est pas stable dans des cellules arrêtées via la mutation thermosensible *cdc15-2* en présence de nocodazole (Palframan et al., 2006). Il semble que Pds1 soit continuellement dégradée par APC/Cdc20 après l'initiation de l'anaphase. Si l'on active artificiellement le checkpoint en fin de mitose en surexprimant Mps1, Pds1 devient stable de façon dépendante de *MAD2*. La stabilité de la protéine Mps1 dépend alors elle aussi de *MAD2*. Au cours d'un cycle normal, le taux de Mps1 augmente en début de mitose et commence à diminuer au moment de l'anaphase. La diminution du taux de Mps1 est dépendante d'APC/Cdc20 et APC/Cdh1, comme c'est le cas pour Clb2 (Palframan et al., 2006). L'inhibition de Mps1 par l'APC, qui était préalablement inhibé par le checkpoint, pourrait permettre d'inactiver le checkpoint de façon irréversible en anaphase, à un moment où les kinétochores ne sont plus sous tension (Palframan et al., 2006).

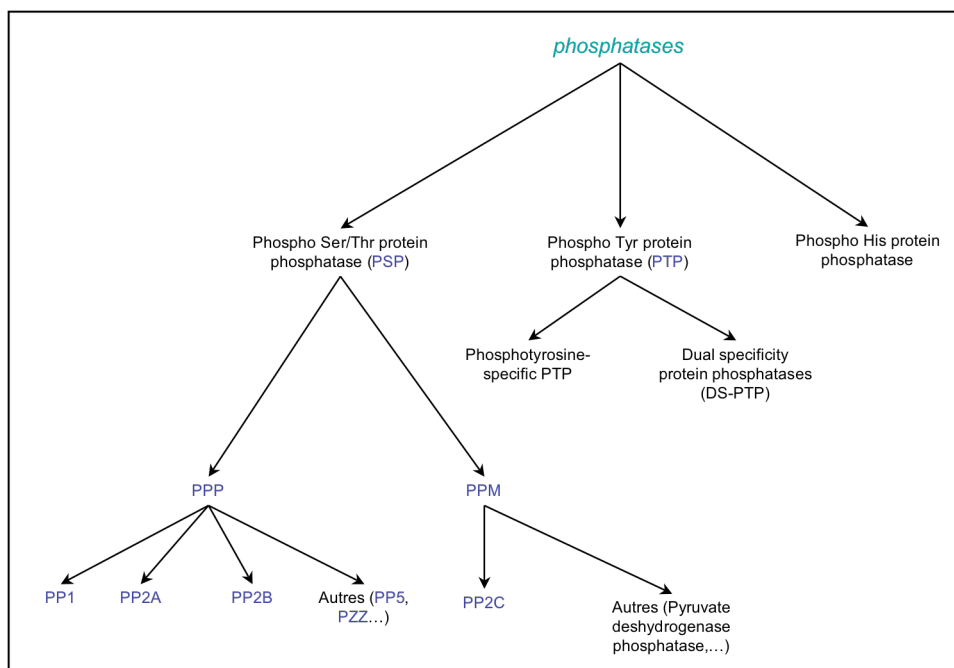
# Introduction sur Glc7

## 1. Introduction sur les phosphatases

Les événements de phosphorylation et déphosphorylation des protéines, processus dynamiques mettant en jeu kinases et phosphatases, constituent un important système de régulation des fonctions intracellulaires chez les eucaryotes. Un des avantages de ce système réside dans sa simple réversibilité : l'état de phosphorylation d'une protéine dépend des activités relatives d'un certain nombre de kinases et phosphatases.

La classification des phosphatases a été établie en premier lieu à partir de critères biochimiques. Les phosphatases ont été séparées en plusieurs groupes selon leur spécificité de substrats : PSP (phosphosérine/thréonine phosphatases) et PTP (phosphotyrosine phosphatases) constituent les deux plus grandes familles (cf figure n°120). Certaines phosphatases sont toutefois capables de déphosphoryler plusieurs substrats, comme les « dual-specificity » protéines phosphatases qui déphosphorylent des phosphosérines et phosphothréonines mais aussi des phosphotyrosines (pour revue, voir (Arino, 2002; Stark, 1996)). Nous n'avons étudié que des PSP que je présente donc plus en détail. D'autres critères biochimiques ont été utilisés pour diviser les PSP ont deux sous-familles : les PP1 (protéine phosphatase de type 1) et les PP2 (protéine phosphatase de type 2). Initialement, les PP1 ont été caractérisées par le fait qu'elles sont inhibées par deux inhibiteurs thermorésistants nommés I-1 et I-2 (« Inhibitor-1 » et « Inhibitor-2 ») et qu'elles déphosphorylent préférentiellement la sous-unité  $\beta$  de la phosphorylase kinase, tandis que les PP2 sont insensibles aux inhibiteurs thermorésistants et qu'elles déphosphorylent principalement la sous-unité  $\alpha$  de la phosphorylase kinase (Wera and Hemmings, 1995).

Figure n°120





Classification des phosphatases chez les eucaryotes.

Les PP1 sont des holoenzymes composées d'une sous-unité catalytique et d'une ou plusieurs sous-unités régulatrices. La PP1c (notation pour la sous-unité catalytique de la PP1) peut aussi se lier à des protéines qui inhibent son activité. Chez *S. cerevisiae*, seul le gène *GLC7* code pour la sous-unité catalytique de la PP1. La PP1 est une des protéines eucaryotes les plus conservées (Ceulemans and Bollen, 2004).

Les PP2 peuvent être sous-divisées en plusieurs classes :

- les PP2A qui sont des holoenzymes trimériques constituées d'un cœur comportant une sous-unité catalytique complexée à une sous-unité régulatrice (ou sous-unité A) et une sous-unité régulatrice variable (sous-unité B) (Dickman and Yarden, 1999; Stark, 1996; Wera and Hemmings, 1995). Chez *S. cerevisiae*, la sous-unité catalytique est codée par deux gènes : *PPH21* et *PPH22*. La sous-unité A est codée par *TPD3* et la sous-unité B par *CDC55* et *RTS1*.
- les PP2B ou calcineurines qui sont des hétérodimères dépendants de  $Ca^{2+}$ , composés d'une sous-unité catalytique (ou calcineurine A) se liant à la calmoduline et d'une sous-unité régulatrice (ou calcineurine B) qui lie le cation  $Ca^{2+}$ . Chez *S. cerevisiae*, la calcineurine A est codée par *CNA1* et *CNA2* et la calcineurine B est codée par *CNB1* (Wera and Hemmings, 1995).
- les PP2C qui sont des enzymes monomériques dépendantes de  $Mg^{2+}$ . Chez *Saccharomyces cerevisiae*, les gènes *PTC1*, *PTC2*, *PTC3*, *PTC4*, *PTC5*, *PTC6* et *PTC7* codent pour les protéines phosphatases de type 2C.

Chez *S. cerevisiae*, 113 gènes correspondraient à des sous-unités catalytiques de kinases, soit environ 2% de la totalité des gènes. Seule une trentaine correspondraient à des sous-unités catalytiques de phosphatases (Stark, 1996). La différence entre le nombre de kinases et de phosphatases est importante et se retrouve chez les eucaryotes supérieurs. Elle concerne principalement les PSP et pourrait suggérer que les kinases ont une plus grande spécificité de substrat et qu'une phosphatase doit ainsi contre-balancer les effets de plusieurs kinases. Le mécanisme d'action des phosphatases semble être modulé au moyen de sous-unités régulatrices et d'inhibiteurs spécifiques. Le rôle de ces sous-unités régulatrices n'est pas toujours très bien établi. Elles influencent probablement la spécificité de substrat, la localisation subcellulaire et/ou l'activité de la sous-unité catalytique (Dickman and Yarden, 1999; Wera and Hemmings, 1995).

Cette première classification ne rend pas compte des relations phylogénétiques entre les différentes classes. C'est pourquoi, après analyse des gènes codant les PSP, les PP1, PP2A et PP2B ont été regroupées dans la famille des PPP (« phosphoprotein phosphatase P family »), alors que les PP2C plus éloignées phylogénétiquement appartiennent à la famille PPM (« phosphoprotein phosphatase M family ») (Cohen, 1997; Dickman and Yarden, 1999; Wera and Hemmings, 1995). De nouvelles phosphatases structurellement proches des PPP mais clairement distinctes des PP1, PP2A et PP2B ont été identifiées (PP4, PP5, PP6, PPZ, ...) (cf figure n°I20). Quelques-unes ont été répertoriées par J.Arino pour la levure *S. cerevisiae* (Arino, 2002). En particulier, les PP5 sont des sérine/thréonine phosphatases qui se distinguent des autres PPP entre

autres parce qu'elles fonctionnent sans sous-unité régulatrice. Leur domaine catalytique présente une forte similarité avec le domaine catalytique des autres PPP, mais ces phosphatases possèdent en N-terminal un motif TPR (« tetratricopeptides repeats ») caractéristique de la classe PP5. Les PPZ, quant à elles, ont une région C-terminale structurellement très proche de celle des PP1. Par contre, leur région N-terminale est atypique et les distinguent des autres sérine/thréonine phosphatases.

## 2. Les protéines phosphatases de type 1

Les protéines phosphatases de type 1 constituent un groupe d'enzymes présentes chez tous les eucaryotes. Leur structure primaire est très bien conservée. Les différences observées pour les PP1 entre les espèces ou au sein d'une même espèce se situent principalement dans les domaines N-terminal et C-terminal. Dans les cellules, la sous-unité catalytique de la PP1 est associée à des sous-unités « régulatrices » qui déterminent l'activité (par exemple, en servant éventuellement de pseudosubstrats ou en induisant des changements conformationnels), la spécificité de substrat et/ou la localisation subcellulaire de la phosphatase. Sans cette interaction avec une autre sous-unité, la PP1c ne montre pas de spécificité de séquence évidente et déphosphoryle plusieurs substrats *in vivo* et *in vitro* (Aggen et al., 2000; Ceulemans and Bollen, 2004). D'autre part, de nombreux inhibiteurs physiologiques de la PP1c ont été identifiés principalement chez les eucaryotes supérieurs, comme les inhibiteurs I-1 et I-2.

Lors de la purification de la PP1c, on ne trouve souvent qu'une seule sous-unité liée à la sous-unité catalytique, ce qui laisse supposer que la liaison à la PP1c est mutuellement exclusive pour les différentes sous-unités régulatrices et que le ou les sites de liaison de ces sous-unités régulatrices sont identiques ou se chevauchent. Les différentes sous-unités régulatrices seraient ainsi en compétition pour la liaison avec la PP1c (Aggen et al., 2000; Egloff et al., 1997). Toutefois, des holoenzymes multimériques ont été décrites (Ceulemans and Bollen, 2004).

Une petite séquence consensus est présente dans la plupart de ces sous-unités régulatrices. Elle est communément appelée « motif RVXF ». Ce motif serait responsable de l'interaction avec la PP1c, se liant à une région hydrophobe très conservée située dans la partie C-terminale. Cette région est distincte du site catalytique (Egloff et al., 1997). Il semble que ce motif serve de point d'ancrage pour la liaison initiale entre les deux sous-unités et promeut ainsi la liaison avec des sites secondaires (Ceulemans and Bollen, 2004). La séquence exacte de ce motif ne se retrouve pas dans toutes les sous-unités. Il a ainsi été suggéré que la séquence supposée d'interaction entre la PP1c et ses sous-unités régulatrices pourrait correspondre en fait à deux acides aminés basiques suivis de deux résidus hydrophobes séparés par un acide aminé variable (Aggen et al., 2000). D'autres ont proposé une définition différente de la séquence consensus (par exemple, (R/K)(V/I)XF (Egloff et al., 1997)). En tout cas, des mutations de ce motif, lorsqu'il est présent, entraînent la perte d'interaction entre la PP1c et la sous-unité régulatrice chez la levure comme chez les eucaryotes supérieurs (par exemple (Egloff et al., 1997)). Ce motif est également présent chez la plupart des inhibiteurs de la PP1c.

Les différents processus cellulaires contrôlés par la PP1 semblent être régulés par des holoenzymes PP1 distinctes dans lesquelles la même sous-unité catalytique est complexée à différentes sous-unités régulatrices selon le processus. Les caractéristiques des protéines régulatrices et des inhibiteurs de la PP1c sont elles-mêmes modulables et modulées (Ludlow and Nelson, 1995).

### 3. La phosphatase Glc7

*GLC7* (**GLyCogène 7**) est le seul gène codant pour la sous-unité catalytique de la protéine phosphatase de type 1 chez *Saccharomyces cerevisiae* (Feng et al., 1991). Il a tout d'abord été isolé via la recherche d'un homologue chez *S. cerevisiae* des gènes *dis2*<sup>+</sup> et *sds21*<sup>+</sup> de *Schizosaccharomyces pombe* et nommé *DIS2S1* (criblage d'une banque d'ADN génomique de *S. cerevisiae* à l'aide de sondes issues de la digestion des gènes *dis2*<sup>+</sup> et *sds21*<sup>+</sup> codant pour les deux sous-unités catalytiques de la PP1 chez *S. pombe*) (Ohkura et al., 1989). En parallèle, il a été également isolé via la complémentation de la mutation *glc7-1*, puis il a été montré que les gènes *GLC7* et *DIS2S1* étaient identiques (Cannon et al., 1994; Feng et al., 1991). *Glc7* a tout d'abord été identifiée comme étant nécessaire à la synthèse de glycogène : le mutant *glc7-1* était présent dans une collection de mutants présentant un taux anormalement faible de glycogène, mis en évidence par une coloration sur boîte (Peng et al., 1990). L'étude de la glycogène synthase, enzyme limitante pour la synthèse du glycogène, chez ce mutant a montré qu'il possédait davantage de formes phosphorylées inactives et moins de formes déphosphorylées actives de la glycogène synthase que les cellules sauvages (Peng et al., 1990). Une analyse de séquence ayant montré une forte identité avec le gène *dis2*<sup>+</sup> de *S. pombe* et la PP1 $\alpha$  des cellules de mammifères (Feng et al., 1991; Peng et al., 1990), il a alors naturellement été proposé que *Glc7* soit une phosphatase et qu'elle active la glycogène synthase lorsque les cellules atteignent la phase stationnaire en régulant son état de phosphorylation (Peng et al., 1990). Sa caractérisation en tant que protéine phosphatase de type 1 a rapidement suivi (Feng et al., 1991).

*Glc7* a par la suite été impliquée dans de très nombreux processus cellulaires. Comme nous l'avons déjà souligné, les phosphatases semblent avoir des rôles moins spécifiques que les kinases et *Glc7* en est un bon exemple. Elle intervient entre autres dans les voies permettant le maintien de l'intégrité cellulaire, la morphogenèse, les voies de répression par le glucose, la régulation de la liaison kinétochores/microtubules, la méiose, la sporulation, l'endocytose, la traduction... (Garcia-Gimeno et al., 2003; Stark, 1996).

*GLC7* est un gène essentiel (Cannon et al., 1994; Feng et al., 1991). La caractérisation de la protéine a été faite via la génération de très nombreux mutants. Étant donné l'état actuel des connaissances sur cette phosphatase, il est à ce jour difficile de dire si l'on est arrivé à générer des mutants affectés pour une fonction unique de la PP1. Il a d'ailleurs été spécifiquement montré que certains cumulaient plusieurs défauts. Par exemple, le mutant conditionnel cryosensible *glc7*<sup>Y-170</sup> présente un défaut du cycle cellulaire (les cellules s'accumulent en G2/M à température restrictive) et un défaut d'accumulation du glycogène (Hisamoto et al., 1994).

La transformation d'une souche sauvage avec un plasmide multi-copie portant le gène *GLC7* montre une efficacité réduite, ce qui suggère que la surexpression de *GLC7* est délétère (Francisco et al., 1994). Ceci a été confirmé par l'étude de constructions « promoteur *GALI-GLC7* ». La toxicité de la surexpression dépend alors de la présence de l'allèle *GLC7* endogène et du fond génétique utilisé (Black et al., 1995; Hisamoto et al., 1994). La croissance est inhibée, la viabilité décroît avec le temps, les cellules ont un volume supérieur à la normale et nombreuses sont celles qui présentent une morphologie de bourgeon aberrante (Black et al., 1995). Une surexpression plus modérée de *GLC7* à l'aide du promoteur *MET3* ne semble par contre pas gêner la croissance (Black et al., 1995). La surexpression de *GLC7* pourrait engendrer une hyperdéphosphorylation des substrats physiologiques de la phosphatase mais également altérer sa spécificité.

Glc7 semble être régulée principalement par des sous-unités régulatrices (cf figure n°I21). La quantité de Glc7 et son activité sont stables au cours du cycle. Sa demi-vie est de 180 minutes (Nigavekar et al., 2002). Chez les mammifères, l'activité PP1 varie au cours du cycle et les sous-unités catalytiques possèdent des sites dans leur domaine C-terminal dont la phosphorylation inhibe l'activité de la phosphatase. Ces sites ne sont pas présents chez Glc7.

**Figure n°I21**

Sous-unités régulatrices de Glc7	Séquence « RVXF » de liaison putative	Position de la séquence (résidus concernés)
Gac1	KNVRF	69-73
Gip1	RCVNF	445-449
Gip2	KSVHF	220-224
Shp1	LDVQF DTVKF	276-280 369-373
Reg1	RHIHF	464-468
Reg2	RHIKF	167-171
Sds22	ETIYL	299-303
Scd5	KKVRF	273-278

Séquences de liaison putatives à Glc7 de quelques sous-unités régulatrices (Aggen et al., 2000; Egloff et al., 1997).

La localisation de Glc7 a été étudiée à l'aide d'une construction *GFP-GLC7* (Bloecher and Tatchell, 2000). Tout au long du cycle, Glc7 est présente de façon prédominante dans le noyau, principalement au niveau du nucléole. Elle s'accumule aussi en G1 à l'endroit du futur site de bourgeonnement, à l'étranglement entre la cellule-mère et le bourgeon et au niveau du cortex du bourgeon de la phase S jusqu'à la télophase. Dans les cellules traitées à l' $\alpha$ -facteur, elle est localisée au niveau du « shmoo » (Bloecher and Tatchell, 2000; Knaus et al., 2005). Il a été supposé qu'elle était également présente aux SPB en anaphase, en partie parce qu'elle co-localise avec Nuf2 que l'on pensait être une protéine du SPB mais qui s'avère finalement être une protéine du kinétochore (Bloecher and Tatchell, 2000). La sous-unité régulatrice Bni4 semble être responsable de sa localisation au col entre cellule-mère et cellule-fille (Kozubowski et al., 2003), et la sous-unité Bud14 de sa localisation aux sites de croissance polarisée (« shmoo », cortex du bourgeon) (Cullen and Sprague, 2002; Knaus et al., 2005).

### 3.1. Quelques voies cellulaires dans lesquelles Glc7 est impliquée

#### 3.1.1. Glc7 et le métabolisme du glycogène

La synthèse du glycogène débute lorsque le glucose devient limitant, c'est-à-dire lors de

la transition diauxique. Comme nous l'avons déjà souligné, Glc7 a été tout d'abord caractérisée via la mutation *glc7-1* qui induit une accumulation de la forme inactive de la glycogène synthase correspondant à la forme phosphorylée de la protéine (Peng et al., 1990). Le fait que la mutation des sites de phosphorylation de la glycogène synthase supprime le phénotype du mutant *glc7-1* suggère que la PP1 déphosphoryle directement et active la glycogène synthase pour promouvoir la synthèse de glycogène, alors que celle-ci est inactivée par phosphorylation (Stark, 1996). L'activation de Glc7 à l'approche de la phase stationnaire pourrait s'expliquer en partie par l'induction transcriptionnelle de *GLC7* observée à ce stade et par le fait que le glucose lui-même semble réprimer l'activité de Glc7 (Feng et al., 1991; Nigavekar et al., 2002). Le rôle de la PP1 dans la synthèse de glycogène est conservé chez les mammifères, où les sous-unités G dirigent la PP1c vers la glycogène synthase et d'autres enzymes du métabolisme du glycogène. Ces sous-unités possèdent toutes le motif RVXF nécessaire à l'interaction avec la PP1c, ainsi que des modules se liant au glycogène et à la glycogène synthase (Aggen et al., 2000; Ceulemans et al., 2002; Feng et al., 1991; Stark, 1996).

Gac1 pourrait être un des homologues fonctionnels chez la levure des sous-unités G. En effet, la surexpression de *GAC1* amplifie la synthèse de glycogène chez la souche sauvage et chez le mutant *glc7-1* alors que la délétion de *GAC1* cause une déficience en glycogène via une accumulation de la forme inactive de la glycogène synthase. Il a par ailleurs été montré que Gac1 et Glc7 interagissent (Stuart et al., 1994), et que *glc7-1* a une affinité réduite pour Gac1 (Tu et al., 1996). Toutefois le phénotype du mutant *glc7-1* est plus fort que celui du délétant *gac1Δ* (Stuart et al., 1994). D'autres voies de régulation du métabolisme du glycogène pourraient être affectées chez le mutant *glc7-1* ou d'autres sous-unités régulatrices pourraient intervenir pour moduler la synthèse du glycogène.

Glc8 apparaît également comme une sous-unité capable de réguler l'action de Glc7 dans la synthèse de glycogène. Glc8 est l'orthologue chez la levure de l'inhibiteur I-2 des cellules de mammifères (Tung et al., 1995). Glc8 est, comme Gac1, nécessaire à l'accumulation normale de glycogène (Cannon et al., 1994). Plus précisément, il a été montré que *GLC8* était nécessaire à l'augmentation d'activité de Glc7 observée à l'approche de la phase stationnaire (Nigavekar et al., 2002).

### 3.1.2. *Glc7 et la répression par le glucose*

La levure *S. cerevisiae* utilise le glucose comme source de carbone privilégiée. En présence de glucose, l'expression d'un grand nombre de gènes impliqués dans l'utilisation de sources de carbone alternatives est réprimée. La Ser/Thr kinase Snf1 est nécessaire à la levée de la répression en cas de diminution du taux de glucose. Elle induit entre autres la phosphorylation du répresseur transcriptionnel Mig1 qui devient alors cytoplasmique et inactif (Gancedo, 1998).

Des évidences génétiques semblent montrer que Snf1 et Glc7 jouent des rôles antagonistes dans cette voie, mais les cibles et le mécanisme n'ont pas été identifiés. Chez le mutant *glc7-T152K*, on observe une levée de la répression par le glucose. Cet effet nécessite la présence de la kinase Snf1. Reg1 pourrait être la sous-unité spécifique de la PP1c permettant la régulation de la répression par le glucose. En effet, les mutants *reg1* et *glc7-T152K* ont des phénotypes similaires, phénotypes supprimés par la mutation *snf1*. Glc7 et Reg1 interagissent et cette interaction est abolie chez le mutant *glc7-T152K*. Enfin, la surexpression de *REG1* restaure la répression par le glucose chez le mutant *glc7-T152K* (Stark, 1996; Tu and Carlson, 1995).

### 3.1.3. *Glc7, l'intégrité cellulaire et la morphogenèse*

L'implication de Glc7 dans l'intégrité cellulaire et la morphogenèse a été mise en évidence à l'aide de l'allèle thermosensible *glc7-10*. Ce mutant montre une désorganisation du cytosquelette d'actine et une morphologie du bourgeon aberrante dans 50% des cellules à température restrictive (Andrews and Stark, 2000). La létalité de cette mutation à température restrictive est supprimée par croissance sur un milieu à forte osmolarité. À cette température, l'allèle *glc7-10* induit un phénotype de lyse cellulaire lors d'un stress hypoosmotique (Andrews and Stark, 2000). Les défauts de morphologie et la mortalité cellulaire pourraient être liés puisque la croissance sur un milieu à forte osmolarité restaure aussi une morphologie cellulaire normale (Andrews and Stark, 2000).

Les défauts de morphologie pourraient être dus à une croissance polarisée non atténuée (Andrews and Stark, 2000; Cullen and Sprague, 2002). L'identification et l'étude du phénotype hyperallongé des cellules du mutant *bud14Δ* et de leur défaut dans la formation et la morphologie du « shmoo » ont conduit à penser que Bud14 pourrait être une des sous-unités régulatrices responsables de l'implication de Glc7 dans ce processus (Cullen and Sprague, 2002). En effet, le défaut de croissance polarisée du mutant *bud14Δ* est exacerbé par la mutation *glc7-132* et cette mutation supprime partiellement les défauts de croissance et de morphologie induits par la surexpression de *BUD14* (Cullen and Sprague, 2002). Bud14 montre par ailleurs une localisation au niveau des sites de croissance polarisée et est nécessaire à la localisation de Glc7 sur ces mêmes sites (« shmoo », cortex du bourgeon, ...) (Bloecher and Tatchell, 2000; Cullen and Sprague, 2002; Knaus et al., 2005).

### 3.1.4. *Glc7 et les checkpoints du pachytène*

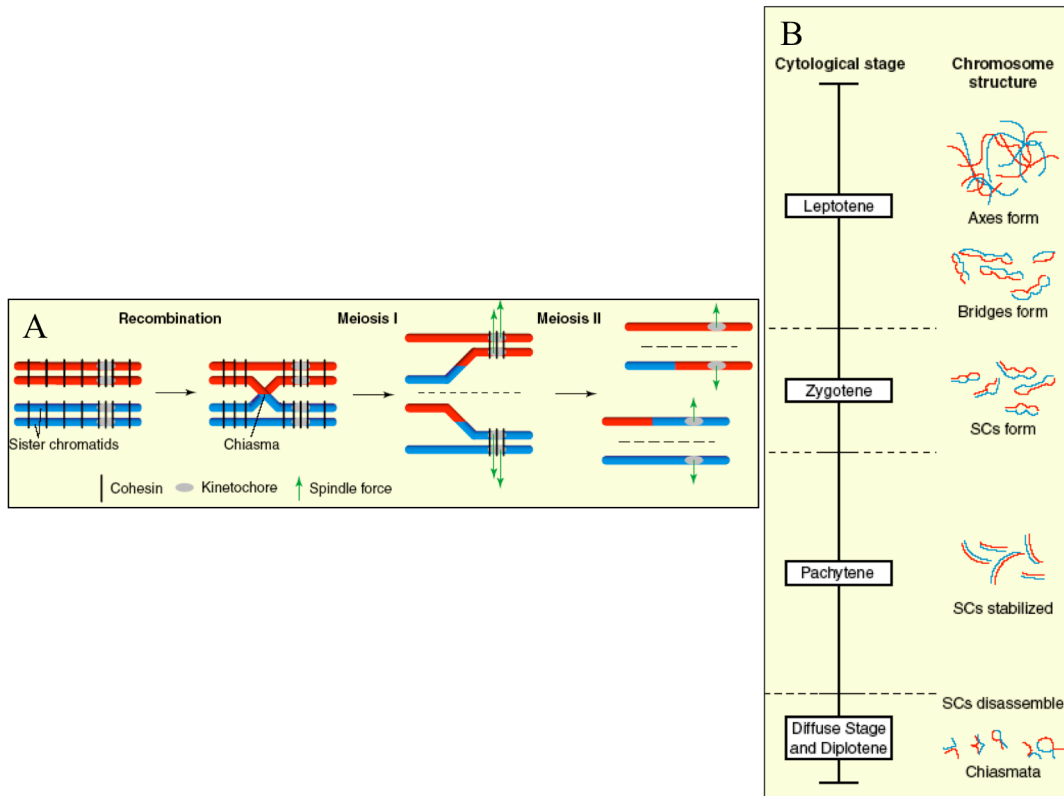
Au cours de la mitose ou de la seconde division méiotique, les chromatides sœurs sont maintenues attachées avant la ségrégation par des complexes protéiques appelés cohésines. Par contre, au cours de la première division de méiose, la plupart des eucaryotes ont recours à un système d'induction contrôlée de cassures double-brin qui sont réparées par recombinaison avec le chromosome homologue, pour assurer l'appariement des deux chromosomes (cf figure n°I22). Ce phénomène de recombinaison méiotique est initié à un stade postérieur à la réplication que l'on pourrait nommer « G2/prophase » puisqu'il correspond à un moment où les chromosomes sont condensés mais où l'activité Cdk est faible. Chez les eucaryotes supérieurs, ce phénomène est un prérequis crucial pour la formation des gamètes.

Si ces cassures sont nécessaires, elles représentent tout de même un danger pour l'intégrité du génome. Des checkpoints, nommés « checkpoints du pachytène », permettent à la cellule de contrôler la formation et la réparation de ces cassures et d'empêcher la progression en méiose I si des intermédiaires de recombinaison persistent. Les cellules sont dans ce cas bloquées en G2/prophase et peuvent être à terme orientées vers l'apoptose (Hochwagen and Amon, 2006). En fait, plusieurs mécanismes de surveillance se chevauchant permettent de faire face à différents types de défauts au stade pachytène (cassures hyperrésectées ou non résectées, instabilité de l'invasion de brin pendant le processus de recombinaison, ...) (Hochwagen and Amon, 2006). Chez la levure, la protéine Spo11 est nécessaire à la formation de ces cassures.

Il est intéressant de noter que le checkpoint de l'ADN semble également être actif en méiose et engendre en cas de dommages un arrêt en G2/prophase dépendant de Rad9, Rad24, Ddc1, Mec3 et Mec1. Il agit de manière distincte des checkpoints du pachytène puisqu'il ne requiert pas les protéines Red1 et Mek1, caractéristiques de ces derniers. Il ne nécessite pas non

plus la présence de Spo11. Sa signification physiologique à ce stade de la progression cellulaire réside probablement dans le fait qu'il puisse détecter des dommages autres que des cassures double-brin de l'ADN. Ainsi, l'inactivation de Cdc13 avant les divisions méiotiques conduit à un arrêt en G2/prophase qui dépend de Rad9 (Hochwagen and Amon, 2006).

Figure n°I22



**La méiose et le stade pachytène. Extrait de (Hochwagen and Amon, 2006).**  
 A. Déroulement de la méiose.  
 B. Changements dans la structure des chromosomes intervenant au cours de la recombinaison méiotique. SCs, complexes synaptonémaux (structure protéique qui s'assemble entre les chromosomes homologues et qui stabilise les intermédiaires de recombinaison).

Les checkpoints du pachytène, contrairement au checkpoint de l'ADN, ne font pas intervenir Rad9, mais nécessitent les protéines Mec1, Rad24, Mec3, Ddc1, mais aussi Spo11, ce qui signifie que l'initiation du mécanisme de recombinaison méiotique est nécessaire à leur activation. Les protéines Red1 et Mek1 sont également requises (Hochwagen and Amon, 2006). Ainsi, la délétion de *RED1* ou *MEK1* permet à des mutants de la recombinaison subissant normalement un arrêt en G2/prophase de sporuler efficacement : le checkpoint a donc été outrepassé (Bailis and Roeder, 2000). Mek1 est une kinase homologue à Rad53. Mek1 et Red1 subissent toutes deux une phosphorylation dépendante de Mec1 après initiation de la recombinaison méiotique (Bailis and Roeder, 2000). Le fait que Mek1 se lie à Red1 phosphorylée via son domaine FHA et que Red1 soit nécessaire à la phosphorylation de Mek1, amène à

considérer Red1 comme un adaptateur pour Mek1 assurant sa phosphorylation par Mec1 et son activation, comme Rad9 pour Rad53 dans le checkpoint de l'ADN (Hochwagen and Amon, 2006). Il avait été montré que Red1 subissait des événements de phosphorylation dépendants de Mek1 mais le fait que Red1 soit un substrat de Mek1 est aujourd'hui remis en question (Hochwagen and Amon, 2006).

Contrairement à ce que l'on a vu pour les cellules mitotiques, les cellules méiotiques sont capables de progresser en méiose en présence d'une cassure double-brin non réparée. De plus, en dépit du grand nombre de cassures introduites avant la première division de méiose, les mutants de la recombinaison présentent seulement un arrêt passager du cycle (Hochwagen and Amon, 2006). Ainsi, l'adaptation semble plus aisée dans les cellules méiotiques que dans les cellules mitotiques.

Il a été montré que Glc7 était impliquée dans ce phénomène d'adaptation et favorisait la sortie des checkpoints du pachytène (Bailis and Roeder, 2000; Hochwagen et al., 2005). La surexpression de *GLC7* améliore la sporulation de mutants de la recombinaison normalement arrêtés en G2/prophase de façon dépendante des checkpoints du pachytène, ce qui suggère que l'activité de Glc7 peut en partie inactiver ce mécanisme de surveillance (Bailis and Roeder, 2000). La surexpression de *GLC7* semble par contre ne pas avoir d'effet sur la sortie du pachytène dans une souche sauvage (Hochwagen et al., 2005). Glc7 pourrait antagoniser l'activité kinase de Mek1. Le maintien de l'arrêt semble en effet dépendre de cette activité puisqu'une souche portant l'allèle constitutivement actif *MEK1-C* montre un arrêt en fin de pachytène et un défaut de sporulation (Bailis and Roeder, 2000). Le mutant *glc7-T152K* présente exactement le même phénotype (Bailis and Roeder, 2000). De plus, la surexpression de *GLC7* améliore la sporulation du mutant *MEK1-C*, suggérant que Glc7 permet d'outrepasser l'arrêt chez ce mutant (Bailis and Roeder, 2000).

Glc7 pourrait contrebalancer l'activité kinase de Mek1 via plusieurs mécanismes :

- Glc7 pourrait par exemple antagoniser des événements de phosphorylation induits par Mek1 en aval du checkpoint,
- Glc7 pourrait également déphosphoryler Red1 et ainsi inactiver Mek1. En fait, il a été montré que Glc7 interagissait avec Red1 et qu'elle déphosphorylait Red1 *in vitro*. En outre, l'interaction Glc7/Red1 et la capacité de déphosphorylation *in vitro* sont perdues chez le mutant *glc7-T152K* (Bailis and Roeder, 2000).

Les protéines Gip1 et Fpr3 pourraient jouer le rôle de sous-unité régulatrice permettant l'implication de Glc7 dans la reprise du cycle après un arrêt dépendant de ces checkpoints et dans la sortie du pachytène.

- Le mutant *gip1Δ* s'arrête au même stade que le mutant *glc7-T152K* et est comme ce dernier défectueux pour la sporulation. De plus, la surexpression de *GLC7* améliore la sporulation du mutant *gip1Δ* (Bailis and Roeder, 2000).
- La délétion de *FPR3*, comme la surexpression de *GLC7*, raccourcissent l'arrêt dépendant des checkpoints de mutants de la recombinaison et améliorent leur sporulation, cela sans montrer d'effet additif. La surexpression de *FPR3* exacerbe l'arrêt de ces mutants et empêche la surexpression de *GLC7* d'atténuer cet arrêt. Enfin, Glc7 interagit avec Fpr3 en mitose comme en méiose. Fpr3 pourrait ainsi jouer un rôle d'inhibiteur de Glc7, permettrait le maintien du checkpoint et empêcherait une adaptation prématurée (Hochwagen et al., 2005).



### 3.2. Glc7 et la mitose

Glc7 semble jouer un ou plusieurs rôles pendant la mitose. En effet, de nombreuses mutations de *GLC7* entraînent des arrêts du cycle ou des accumulations en G2/M (arrêt caractérisé par un gros bourgeon, le noyau situé à l'étranglement, un ADN répliqué et un petit fuseau mitotique). C'est le cas pour les allèles *glc7<sup>Y-170</sup>* (Hisamoto et al., 1994), *glc7-12* (MacKelvie et al., 1995), *glc7-129* (Bloecher and Tatchell, 1999), *glc7-131* (Baker et al., 1997) et *glc7-10* (Andrews and Stark, 2000) en conditions restrictives.

L'implication des protéines phosphatases de type 1 dans le déroulement de la mitose est conservée chez les eucaryotes. En effet, des mutations perte-de-fonction de la PP1 entraînent des arrêts en mitose chez *S. pombe*, *A. nidulans* et *D. melanogaster* (Stark, 1996). De plus, chez les mammifères, l'injection d'anticorps neutralisant les PP1 en fin de G2 ou en début de mitose conduit à un arrêt en métaphase. La même injection dans des cellules en anaphase quant à elle empêche la progression vers la télophase. Enfin, l'injection de PP1c accélère l'anaphase et la télophase. Ceci suggère que la PP1 chez les mammifères possède au moins deux rôles essentiels lors de la division mitotique (Fernandez et al., 1992).

Ces arrêts en mitose pourraient être dus à un effet direct sur la progression du cycle ou à l'activation de mécanismes de surveillance.

#### 3.2.1. Glc7 et Ipl1

Des éléments de réponse quant aux rôles que pourrait jouer la protéine phosphatase de type 1 au cours de la mitose chez *Saccharomyces cerevisiae* ont été apportés ces dernières années. Il a principalement été mis en évidence que Glc7 antagonise la protéine kinase Aurora pour plusieurs de ses fonctions pendant la mitose.

##### 3.2.1.1. Ipl1, les interactions kinétochores/microtubules et le checkpoint du fuseau

La transmission correcte du patrimoine génétique au cours du cycle cellulaire repose en partie sur la précision de la ségrégation des chromosomes au cours de la mitose. Au cours de la réplication, des liens physiques sont établis entre les chromatides sœurs. Cette cohésion est assurée notamment par le complexe cohésine composé des sous-unités Scc1 (ou Mcd1), Smc1 et Smc3 et doit être maintenue jusqu'à ce que les chromosomes soient alignés en métaphase. Les chromosomes sont aussi attachés au fuseau via l'interaction entre microtubules et kinétochores (les kinétochores sont des structures protéiques spécialisées qui s'assemblent autour de l'ADN centromérique). À la transition métaphase/anaphase, le clivage de Scc1 par la séparase Esp1 entraîne sa dissociation des chromatides sœurs (Ciosk et al., 1998; Uhlmann et al., 1999). Cette perte de cohésion permet aux chromatides sœurs de ségréger rapidement vers les pôles opposés via la traction par le fuseau. Pour que l'ADN dupliqué soit séparé de façon équitable entre les deux cellules filles, chaque paire de chromatides sœurs doit être correctement attachée au fuseau mais aussi attachée de façon bipolaire. En effet, si les deux kinétochores sont liés au même pôle (attachement monopolaire), les deux chromatides sœurs sont ségrégués dans la même cellule fille, engendrant des contenus d'ADN aberrants dans ces cellules (perte ou gain de chromosome). L'absence d'attachement et/ou de tension entraîne l'activation du checkpoint du fuseau, comme décrit précédemment.

*IPL1* est un gène essentiel qui code pour le seul membre de la famille des kinases Aurora

chez *Saccharomyces cerevisiae*. Il a été proposé qu'Ipl1 soit nécessaire à la déstabilisation des interactions kinétochores/microtubules notamment au niveau des kinétochores qui ne sont pas sous tension (Biggins and Murray, 2001). Nous résumons ci-après quelques données bibliographiques ayant permis d'aboutir à cette hypothèse. Le mutant *ipl1-2* thermosensible souffre de défauts sévères dans la ségrégation des chromosomes et montre des contenus d'ADN aberrants (inférieurs à 1C d'ADN) à température restrictive (Chan and Botstein, 1993). Le suivi du centromère du chromosome IV par un marquage GFP montre que les deux chromatides sœurs de ce chromosome rejoignent le même pôle du fuseau dans 85% des cas à température restrictive chez le mutant thermosensible *ipl1-321* (Biggins et al., 1999). Or, le complexe cohésine s'associe et se dissocie des chromosomes de manière identique dans la souche sauvage et dans le mutant *ipl1-321*, ce qui suggère que le phénotype observé ne résulte pas d'un défaut de dissociation des cohésines (Biggins et al., 1999). L'équipe de A.Hyman a mis au point un système pour tester l'interaction kinétochore/microtubule *in vitro*. Des billes saturées avec de l'ADN centromérique sont préalablement incubées avec des extraits protéiques (pour qu'un kinétochore puisse se former) puis testées pour leur efficacité de liaison avec des microtubules stabilisés avec du taxol. L'activité de liaison aux microtubules mesurée lors de cet essai est sensible à l'ajout d'ATP. Cette inhibition par l'ATP n'est plus observée lorsque l'essai est conduit avec un extrait du mutant *ipl1-321* (Biggins et al., 1999). Ces résultats suggèrent que l'activité kinase d'Ipl1 permet de décrocher les microtubules des kinétochores, et que les défauts de ségrégation observés chez les mutants *ipl1* proviennent de problèmes dans l'interaction kinétochore/microtubule.

Dans des cellules déficientes pour la réplication (déplétées en Cdc6), l'ADN non répliqué finit par être séparé en deux pools d'ADN de taille équivalente. L'inactivation d'Ipl1 dans ces cellules entraîne une ségrégation préférentielle de l'ADN vers le bourgeon : 50% des cellules montrent l'intégralité du pool d'ADN dans le bourgeon (Tanaka et al., 2002). De même, un minichromosome non répliqué a autant de chance d'être ségrégué dans la cellule-mère que dans le bourgeon chez la souche sauvage, alors qu'il ségrège de façon préférentielle dans le bourgeon chez le mutant *ipl1-321* (Tanaka et al., 2002). La capacité d'Ipl1 à déstabiliser les interactions kinétochores/microtubules pourrait expliquer cette ségrégation préférentielle dans le bourgeon. En effet, la duplication et la maturation du SPB ont lieu pendant la phase S. Le nouveau SPB reste dans 98% des cas dans la cellule-mère. Or, les kinétochores semblent être connectés au SPB via des microtubules dès la phase G1 et la réplication des centromères a lieu en début de phase S. De plus, il semble qu'une réplication du centromère plus tardive permette au chromosome correspondant d'être ségrégué plus souvent dans la cellule-mère (Tanaka et al., 2002). Ces données permettent de construire le modèle suivant (Tanaka et al., 2002) :

- la réplication des centromères a lieu avant que le nouveau SPB soit devenu opérationnel,
- les centromères sont dans un premier temps préférentiellement connectés à l'ancien SPB puisque c'est le seul qui soit fonctionnel en début de phase S ; celui-ci migre dans le bourgeon,
- Ipl1 promeut les connexions au nouveau SPB en déstabilisant les interactions kinétochores/microtubules.

Lorsque l'activité d'Ipl1 est compromise, les connexions ancien SPB/kinétochores persistent tout au long du cycle, les chromosomes étant incapables de se lier au nouveau SPB (Tanaka et al., 2002). Ipl1 semble donc promouvoir une ségrégation correcte des chromatides sœurs au cours de la mitose en déstabilisant les interactions kinétochores/microtubules.

Le mutant *ipl1-321*, malgré ses importants défauts de ségrégation des chromosomes et notamment la présence très probable d'attachements non corrects, n'active pas le checkpoint du fuseau : les cellules dégradent Pds1 avec une cinétique similaire à celle de la souche sauvage et ne s'arrêtent pas en mitose (Biggins and Murray, 2001). Ceci est surprenant dans le sens où le checkpoint du fuseau pourrait être activé non pas par des défauts d'attachement kinétochores/microtubules (puisque ces interactions sont particulièrement stables chez ce mutant) mais par la détection de manque de tension au niveau des kinétochores, de nombreux attachements monopolaires étant certainement présents chez ce mutant. Ceci pourrait s'expliquer par le fait qu'Ipl1 semble être nécessaire à l'activation du checkpoint du fuseau en cas de défaut de tension au niveau du kinétochore mais qu'elle ne paraît pas requise pour la réponse à un défaut d'attachement aux microtubules. En effet, la stabilisation de Pds1 observée dans la souche sauvage en absence de réplication (déplétion en Cdc6) ou dans un mutant du complexe cohésine (mutant *mcd1-1*) dépend d'Ipl1 (Biggins and Murray, 2001). Par contre, les chromatides sœurs restent attachées lors d'un traitement au nocodazole chez ce mutant comme dans la souche sauvage (Biggins et al., 1999), Pds1 est stabilisée et les cellules s'accumulent en G2/M (Biggins and Murray, 2001). Ainsi, Ipl1 semble nécessaire à l'activation du checkpoint en cas de manque de tension mais pas en cas de manque d'attachement.

L'ensemble de ces données suggèrent que les mutants *ipl1* possèdent deux défauts : un défaut dans l'interaction kinétochores/microtubules et un défaut dans l'activation du checkpoint du fuseau en cas de manque de tension au niveau du kinétochore. Le rôle d'Ipl1 dans le checkpoint du fuseau pourrait être indirect et résulter du fait qu'elle favorise l'apparition de kinétochores non attachés. Toutefois, on ne peut exclure une implication plus directe dans une voie permettant la mise en place du checkpoint du fuseau dans le cas particulier d'un manque de tension au niveau des kinétochores.

Les deux fonctions d'Ipl1 dans le checkpoint du fuseau et dans la régulation des interactions kinétochores/microtubules ont pu être séparées temporellement lors d'une étude menée par l'équipe d'A.Murray : les cellules du mutant *ipl1-321* ont été arrêtées en G2/M via la surexpression de *MPS1* puis Ipl1 a été inactivée par passage à température restrictive. La souche portant la mutation *ipl1-321* dégrade Pds1 et sépare ses chromatides sœurs avant la souche sauvage (Biggins and Murray, 2001). Ces données montrent à la fois qu'Ipl1 semble être requise pour le maintien de l'arrêt induit par la surexpression de *MPS1*, mais aussi qu'Ipl1 n'est plus nécessaire au bon fonctionnement des kinétochores lorsque l'attachement bipolaire a été établi (Biggins and Murray, 2001).

### 3.2.1.2. *Glc7, Ipl1, les interactions kinétochores/microtubules et le checkpoint du fuseau*

Les études suggérant l'implication de Glc7 dans la régulation des interactions kinétochores/microtubules sont moins affinées que celles menées sur Ipl1. Pourtant, de nombreuses expériences conduisent à penser que cette régulation se ferait via des événements de phosphorylation induits par Ipl1 notamment au niveau du kinétochore et que Glc7 serait la phosphatase antagoniste d'Ipl1 pour ces événements.

L'antagonisme entre Glc7 et Ipl1 est en partie mis en évidence par l'existence d'effets compensatoires ou synthétiques entre des mutants de la PP1c et des mutants de la kinase Aurora. La mutation *glc7-1* supprime le défaut de viabilité du mutant *ipl1-1* à 35°C (Francisco et al., 1994). Les deux mutants *glc7-10* et *ipl1-321* meurent à 35°C alors que le double mutant ne montre plus ce caractère thermosensible (Pinsky et al., 2006). Inversement, une forte

surexpression de *GLC7* (via un plasmide multi-copie) est létale chez le mutant *ipl1-2* mais pas chez la souche sauvage (Francisco et al., 1994). Il est d'ailleurs à noter que la surexpression de *GLC7*, tout comme une perte de fonction partielle d'Ipl1, augmente la fréquence de gain de chromosomes (Chan and Botstein, 1993; Francisco et al., 1994). Le test d'interaction kinétochores/microtubules *in vitro* mis au point par l'équipe de A.Hyman montre que le mutant *glc7-10* thermosensible a une activité de liaison kinétochores/microtubules réduite (Sassoon et al., 1999). Ce test est sensible à l'ajout d'ATP. Une déplétion de l'ATP préalablement ajouté permet de restaurer l'activité de liaison dans une souche sauvage. Cet effet n'est pas observé si le test est mené avec des extraits du mutant *glc7-10* à température restrictive (Sassoon et al., 1999). Ces données, ainsi que celles obtenues pour Ipl1, suggèrent qu'un événement de phosphorylation/déphosphorylation régule l'activité de liaison kinétochores/microtubules et que cette régulation pourrait s'effectuer via un équilibre entre Glc7 et Ipl1 : Glc7 favoriserait l'attachement kinétochores/microtubules tandis qu'Ipl1 déstabiliserait ces interactions.

Des effets synthétiques ou compensatoires entre des mutants de la PP1c et des mutants des protéines du checkpoint du fuseau ont été observés : après 24 heures passées à température restrictive, les doubles mutants *glc7-129 bub3* et *glc7-129 mad1* montrent une viabilité égale à 20% alors que le mutant *glc7-129* est viable à 85% dans ces conditions (Bloecher and Tatchell, 1999). En outre, l'arrêt en G2/M du mutant *glc7-129* est supprimé dans les doubles mutants *glc7-129 bub3* et *glc7-129 mad1* (Bloecher and Tatchell, 1999). De même, la délétion de *MAD2* supprime l'arrêt en G2/M du mutant *glc7-10* (Sassoon et al., 1999). L'arrêt en G2/M de certains mutants *glc7* semble donc dépendre du checkpoint du fuseau. Son activation pourrait résulter de la présence de kinétochores non attachés due aux détachements des liaisons kinétochores/microtubules promus par Ipl1.

### 3.2.1.3. *Glc7 et Ipl1 régulent-elles l'état de phosphorylation d'un ensemble commun de protéines au cours de la mitose ?*

Plusieurs cibles potentielles de la kinase Ipl1 ont été identifiées. Une action antagoniste de Glc7 sur l'état de phosphorylation de ces cibles a pu être mise en évidence (cf figure n°I23). Les résultats obtenus concernant la protéine du kinétochore Ndc10, le complexe DASH et l'histone H3 sont brièvement présentés ci-dessous.

#### 3.2.1.3.1. *Ndc10*

Chez *Saccharomyces cerevisiae*, le centromère est composé de 3 éléments : CDEI, CDEII et CDEIII. CDEIII se lie au complexe CBF3, complexe situé au coeur du kinétochore qui comprend 4 protéines : Skp1, Ctf13, Cep3 et Ndc10.

Les données du test *in vitro* d'interaction kinétochores/microtubules d'A.Hyman suggèrent que des événements de phosphorylation/déphosphorylation régulent la liaison entre le fuseau et les chromosomes. La protéine du kinétochore Ndc10 pourrait être une des cibles de ces événements. En effet, nous avons vu que le mutant *glc7-10* montrait un défaut d'activité de liaison kinétochores/microtubules dans ce test. L'ajout de protéines Ndc10 recombinantes supprime ce défaut, contrairement à l'ajout d'autres protéines du complexe CBF3 (Sassoon et al., 1999). La phosphorylation de Ndc10 pourrait réduire l'activité de liaison kinétochores/microtubules dans cet essai. Par ailleurs, Ipl1 phosphoryle Ndc10 *in vitro* (Biggins et al., 1999) et Ndc10 est hyperphosphorylée chez le mutant *glc7-10* (Sassoon et al., 1999). Des

effets synthétiques entre des mutants de la kinase Aurora et des mutants de Ndc10 ont été mis en évidence et les mutants *ndc10* sont hypersensibles à la surexpression d'*IPL1* (Biggins et al., 1999). Le couple Ipl1/Glc7 pourrait donc réguler la liaison kinétochores/microtubules en jouant sur l'état de phosphorylation de Ndc10.

Les mutants *ndc10-1* possèdent un défaut d'assemblage du kinétochore et sont incapables de ségréger leurs chromosomes correctement à température restrictive : les cellules de ce mutant acquièrent un contenu égal à 4C d'ADN après la première mitose à température restrictive. Les chromatides sœurs ne parviennent pas à rejoindre les pôles du fuseau même si elles sont séparées de façon artificielle (déplétion en Scc1) (Tanaka et al., 2002). Pourtant, ces mutants ne s'arrêtent pas en G2/M. Leurs chromatides sœurs se séparent mais sans ségréger aux pôles, et leur ADN est répliqué à nouveau sans que le checkpoint du fuseau ne soit activé (Fraschini et al., 2001a). Ndc10 pourrait donc être impliquée dans l'activation du checkpoint du fuseau. Il a d'ailleurs été montré que Ndc10 était nécessaire à la réponse au nocodazole et des arguments génétiques suggèrent qu'elle est impliquée dans la même voie que Mad2 (Fraschini et al., 2001a). Nous avons également vu que l'arrêt en G2/M à température restrictive du mutant *glc7-10* était dépendant du checkpoint du fuseau (Sassoon et al., 1999). Or, la mutation *ndc10-1* supprime cet arrêt et les cellules se comportent alors comme le simple mutant *ndc10-1* (Sassoon et al., 1999). Ndc10 est donc nécessaire à la reconnaissance du défaut entraînant l'arrêt du mutant *glc7-10*. Par contre, la mutation *ndc10-1* ne semble pas avoir d'effet sur l'arrêt induit par la surexpression de *MPS1* (Fraschini et al., 2001a). Il a été proposé que les kinétochores soient tellement défectueux à température restrictive chez le mutant *ndc10-1* qu'ils ne peuvent plus ni se lier aux microtubules, ni signaler un manque éventuel d'attachement aux microtubules et ainsi activer le checkpoint du fuseau (Sassoon et al., 1999).

#### 3.2.1.3.2. Dam1

Des éléments montrent qu'Ipl1 pourrait promouvoir une ségrégation correcte des chromosomes également en phosphorylant la protéine Dam1 et d'autres protéines du complexe DASH. Ce complexe est chargé sur les kinétochores avant la mitose et est capable de se lier aux microtubules (Li et al., 2002).

L'analyse par spectrométrie de masse du complexe DASH purifié par immunoprécipitation montre que ce complexe comporte de nombreux sites phosphorylés *in vivo* (Cheeseman et al., 2002). La même analyse de ce complexe, préalablement traité à la phosphatase  $\lambda$  puis incubé en présence de la protéine GST-Ipl1 purifiée et d'ATP, montre qu'Ipl1 est capable de phosphoryler *in vitro* un certain nombre de ces sites, notamment des sites présents au niveau de la protéine Dam1 mais aussi des sites d'autres protéines du complexe DASH comme Ask1 ou Spc34 (Cheeseman et al., 2002). Par ailleurs, une analyse par Western-Blot indique que la phosphorylation de Dam1 est dépendante d'*IPL1 in vivo* puisque l'état de phosphorylation de Dam1 est altérée chez les mutants *ipl1-2* et *ipl1-321* (Cheeseman et al., 2002; Pinsky et al., 2006). L'état de phosphorylation de Dam1 n'affecte pas son activité de liaison aux microtubules. La mutation concomitante en alanine (empêchant donc la phosphorylation) de deux sites de Dam1 phosphorylés par Ipl1 *in vitro* est létale. La mutation concomitante en alanine de sites phosphorylés par Ipl1 *in vitro* et de sites phosphorylés de manière dépendante d'*IPL1 in vivo* engendre des effets synthétiques avec l'allèle *ipl1-2*. Certains de ces mutants montrent par ailleurs un fort défaut de ségrégation des chromosomes à 37°C, avec souvent une migration des deux chromatides sœurs vers le même pôle, ce qui rappelle le phénotype des mutants *ipl1-2* et

*ipl1-321* (Cheeseman et al., 2002). Ces données suggèrent que Dam1 est phosphorylée par Ipl1 *in vivo* et que cette phosphorylation est essentielle probablement parce qu'elle permet d'assurer une bonne ségrégation des chromosomes.

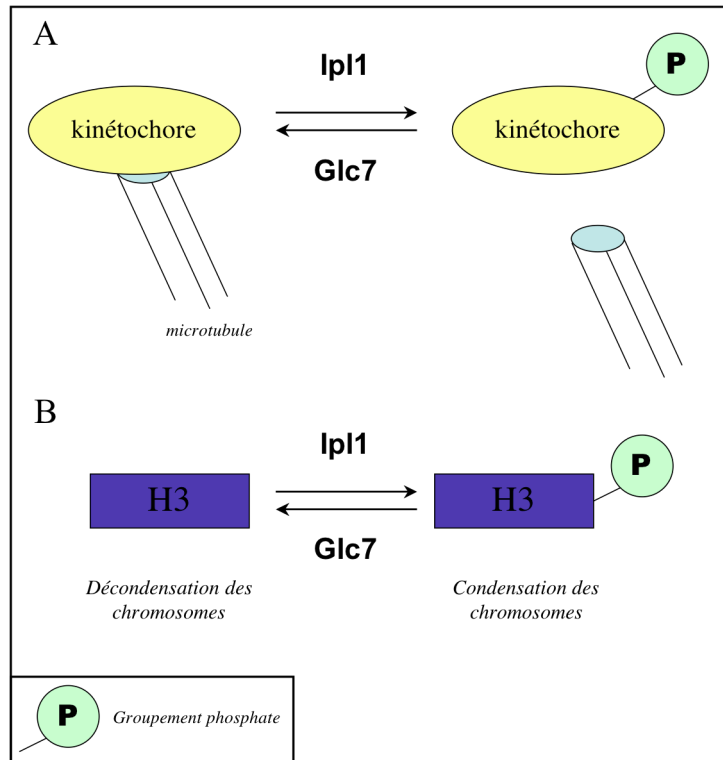
La mutation concomitante de certains sites de phosphorylation de Dam1 en aspartate (mimant donc une phosphorylation permanente) engendre quant à elle un fort défaut de croissance, ce qui suggère que des phosphorylations constitutives sont aussi délétères. Certaines de ces mutations sont capables de supprimer la létalité de l'allèle *ipl1-2* à 34°C et sont synthétiques létales avec la mutation *glc7-10*. Dans certains de ces mutants, on peut observer des chromosomes restant au milieu du fuseau alors que ce dernier s'allonge et que l'ADN devrait former deux ensembles distincts. Ceci pourrait résulter d'une incapacité à générer des attachements kinétochores/microtubules (Cheeseman et al., 2002). Certains de ces mutants suppriment le défaut de liaison à l'ADN centromérique du complexe DASH observé chez le mutant *ipl1-2*. Il est intéressant de noter que cette liaison est dépendante de Ndc10. Inversement, la mutation concomitante en alanine de plusieurs des sites de phosphorylation de Ipl1 sur Dam1 entraîne la perte de la liaison entre l'ADN centromérique et le complexe DASH (Cheeseman et al., 2002). L'antagonisme de Glc7 vis-à-vis d'Ipl1 pour ce mécanisme est révélé par le fait que les mutations *glc7-10* et *glc7-12* suppriment le défaut de phosphorylation de Dam1 du mutant *ipl1-321* et par le fait que Dam1 est hyperphosphorylée chez le mutant *glc7-12* (Pinsky et al., 2006).

Ainsi, le couple Glc7/Ipl1 pourrait être responsable de la dynamique de phosphorylation/déphosphorylation de Dam1 nécessaire à la bonne ségrégation des chromosomes. La phosphorylation de Dam1, probablement générée par Ipl1 et éliminée par Glc7, semble favoriser la déstabilisation des interactions kinétochores/microtubules et la liaison du complexe DASH à l'ADN centromérique. Des cycles de phosphorylation/déphosphorylation pourraient être requis jusqu'à la mise en place d'un attachement bipolaire. Les cibles d'Ipl1 impliquées dans la ségrégation des chromosomes sont multiples. De nombreuses phosphorylations engendrées par Ipl1 au niveau du kinétochore ont été identifiées (Cheeseman et al., 2002). La régulation de la phosphorylation du complexe DASH semble toutefois être primordiale pour ce processus.

### 3.2.1.3.3. H3

Une autre protéine pourrait être un substrat de l'équilibre kinase/phosphatase entre Ipl1 et Glc7 au cours de la mitose. Il s'agit de l'histone H3. La phosphorylation de la sérine 10 de l'histone H3 semble être corrélée avec le cycle de condensation/décondensation des chromosomes au cours de la mitose chez *Tetrahymena thermophila*. Cependant, la relation entre la phosphorylation de H3 et la dynamique des chromosomes est moins évidente chez *Saccharomyces cerevisiae*. D'un côté, on observe une forte phosphorylation de H3 dans plusieurs mutants *glc7*, comme le mutant *glc7-129*, et Glc7 est capable de déphosphoryler H3 *in vitro*. D'un autre côté, Ipl1 phosphoryle H3 *in vitro* sur Ser10 et la phosphorylation de H3 est réduite dans le mutant *ipl1-2* par rapport au sauvage (Hsu et al., 2000). Ipl1 et Glc7 pourraient donc être responsables de l'équilibre de la phosphorylation de H3 sur la sérine 10 pendant la mitose. Toutefois, la mutation de cette sérine n'a pas de conséquence mitotique chez *Saccharomyces cerevisiae*.

Figure n°I23



**Glc7 s'oppose à l'action d'Ipl1 au cours de plusieurs processus mitotiques.**

A. Glc7 et Ipl1 régulent l'interaction kinétochore/microtubule.

B. Glc7 et Ipl1 régulent l'état de phosphorylation de la sérine 10 de l'histone H3.

### 3.2.2. Sous-unités potentiellement impliquées dans les rôles de la PP1c en mitose

#### 3.2.2.1. Sds22

Sds22 pourrait être un polypeptide régulateur nécessaire à une ou plusieurs fonctions mitotiques de Glc7. *SDS22* est un gène essentiel qui a été identifié par conservation de séquence avec le gène *sds22<sup>+</sup>* de *S. pombe* et par criblage à l'aide du mutant *glc7<sup>Y170</sup>* (Hisamoto et al., 1995; MacKelvie et al., 1995).

Il a été montré que la protéine Sds22 interagissait avec Glc7 (Hisamoto et al., 1995; MacKelvie et al., 1995), via un motif différent du motif canonique RVXF. Les membres de la famille Sds22 ne possèdent d'ailleurs pas ce motif. Cette interaction a lieu sur un site de Glc7 distinct de celui utilisé pour lier le motif RVXF (Ceulemans et al., 2002; Pedelini et al., 2006). Sds22 est nécessaire à une localisation correcte de Glc7. En effet, chez le mutant *sds22-6*, le pool nucléaire de Glc7 est relocalisé sous forme de foci nucléaires et cytoplasmiques à température restrictive (Peggie et al., 2002). La totalité du pool de Sds22 semble se lier à Glc7, le contraire n'étant pas vrai (Peggie et al., 2002).

Comme le mutant *glc7-10* (Sassoon et al., 1999), les mutants *sds22-5* et *sds22-6* montrent un fort taux de perte de chromosome à température restrictive mais contrairement à *glc7-10*, ces

mutations n'engendrent pas un arrêt en mitose (Peggie et al., 2002). Toutefois, la déplétion en Sds22 à l'aide du promoteur *GAL* entraîne une légère accumulation en G2/M des cellules (Hisamoto et al., 1995). La surexpression de *SDS22* supprime l'accumulation en G2/M des cellules du mutant *glc7-12*, ainsi que sa létalité dans une certaine gamme de température restrictive (MacKelvie et al., 1995). Inversement, la surexpression de *GLC7* augmente la température restrictive des mutants thermosensibles *sds22-5* et *sds22-6* (Peggie et al., 2002). Elle supprime également les morphologies nucléaires anormales observées en cas de déplétion en Sds22, sans toutefois éliminer l'accumulation en G2/M (Hisamoto et al., 1995). Les effets de la surexpression de *SDS22* sur les mutants *glc7* sont spécifiques de certains allèles. En effet, la surexpression de *SDS22* ne restaure pas la viabilité du mutant *glc7-10* à température restrictive (MacKelvie et al., 1995). Sds22 semble ainsi être un régulateur positif de Glc7 au cours de la mitose.

Les fonctions mitotiques de Glc7 pourraient plus exactement être régulées via le complexe ternaire Glc7/Sds22/Ypi1 (Pedelini et al., 2006). Ypi1 est une petite protéine possédant le motif RVXF caractéristique des sous-unités régulatrices de PP1, qui a été identifiée récemment comme un inhibiteur *in vitro* de Glc7 (Garcia-Gimeno et al., 2003). Le fait que les cellules surexprimant *YPI1* montrent un plus faible taux de glycogène que la souche sauvage a conduit à l'hypothèse que Ypi1 serait un inhibiteur *in vivo* de Glc7 (Garcia-Gimeno et al., 2003). Cependant, la déplétion en *YPI1*, tout comme celle en *SDS22*, engendre une accumulation des cellules en G2/M et Ypi1 est nécessaire comme Sds22 au maintien de la localisation nucléaire de Glc7, suggérant un rôle positif de Ypi1 sur Glc7 *in vivo* au cours de la mitose (Pedelini et al., 2006).

L'action exacte de Sds22 et/ou Ypi1 sur Glc7 et notamment sur son rôle dans la ségrégation des chromosomes au cours duquel elle antagonise Ipl1, n'est pas clair. D'une part, Sds22 et Ypi1 semblent être des régulateurs positifs, ce qui serait en accord avec le fait que la mutation *sds22-6* supprime le défaut de croissance du mutant *ipl1-2* à 34°C (Peggie et al., 2002). D'autre part, la surexpression de *YPI1* ou de *SDS22* suppriment la thermosensibilité du mutant *ipl1-321* (Pedelini et al., 2006; Pinsky et al., 2006). Ce paradoxe apparent peut être résolu par l'hypothèse que les protéines Sds22 et Ypi1 requises pour l'action de Glc7 soient capables lorsqu'elles sont surexprimées de titrer la phosphatase et ainsi d'inhiber son action sur les protéines ciblées par Ipl1 (Pedelini et al., 2006; Pinsky et al., 2006).

### 3.2.2.2. *Glc8*

Le double effet de Sds22 concernant la régulation de Glc7, à la fois nécessaire mais capable d'activité inhibitrice envers la phosphatase lorsqu'elle est surexprimée, pourrait également concerner la sous-unité Glc8 (Tung et al., 1995). D'une part, l'absence de Glc8 a une influence négative sur Glc7. En effet, la délétion de *GLC8* réduit de 60% l'activité *in vivo* de la phosphatase et est létale chez plusieurs mutants *glc7* (Nigavekar et al., 2002; Tan et al., 2003). De plus, *GLC8* est nécessaire à l'augmentation d'activité phosphatase observée lorsque les cellules atteignent la phase stationnaire et que la synthèse de glycogène est activée (Nigavekar et al., 2002). Enfin, les défauts de ségrégation chromosomique observés en cas de surexpression de *GLC7* sont supprimés par la mutation *glc8-Δ101* (Tung et al., 1995). D'autre part, il a été montré que Glc8 inhibait l'activité *in vitro* de Glc7 vis-à-vis de la phosphorylase a et que la surexpression de *GLC8* supprimait, comme les mutations *glc8-Δ101* et *glc7-1*, le défaut de croissance à température restrictive du mutant *ipl1-1* (Tung et al., 1995). Cette surexpression



supprime également la thermosensibilité du mutant *ipl1-321* (Pinsky et al., 2006). Il reste surprenant que la surexpression de *GLC8* ne supprime pas le phénotype de gain de chromosomes induit par la surexpression de *GLC7* (Tung et al., 1995).

L'action de Glc7 semble donc requérir les sous-unités Sds22 et Glc8 mais celles-ci pourraient se comporter comme des inhibiteurs lorsqu'elles sont surexprimées, peut-être en titrant alors Glc7. *In vivo*, ces sous-unités pourraient fonctionner comme des activateurs de Glc7 et, dans certaines conditions physiologiques ou vis-à-vis de substrats particuliers, comme des inhibiteurs de Glc7. Chez *Saccharomyces cerevisiae*, la majorité de la PP1c est liée à Sds22. Par contre, l'affinité de Glc7 envers Glc8 est faible. Chez les cellules de mammifères, la PP1 est majoritairement liée à l'inhibiteur I-2 (l'homologue humain de Glc8).

### 3.2.2.3. *Gip3 et Gip4*

Ces deux protéines ont été proposées comme sous-unités régulatrices de Glc7 car elles sont capables d'interagir avec cette phosphatase et d'influencer sa localisation subcellulaire (Pinsky et al., 2006). Une forte surexpression de *GIP3* ou *GIP4* via le promoteur *GAL* est létale et engendre un défaut de ségrégation des chromosomes. Elle entraîne également une accumulation des cellules en G2/M, phénotype observé pour de nombreux mutants *glc7*. De plus, elle supprime la thermosensibilité et le défaut de phosphorylation de Dam1 du mutant *ipl1-321* (Pinsky et al., 2006). Dans la souche sauvage, Glc7 est présente de façon prédominante dans le noyau tout au long du cycle (Bloecher and Tatchell, 2000). Il a été montré que la localisation nucléaire de Glc7 disparaît dans les cellules surexprimant *GIP3* ou *GIP4* (Pinsky et al., 2006).

Pourtant les délétants *gip3Δ* et *gip4Δ* ne montrent pas de phénotype particulier (Pinsky et al., 2006). Il est donc peu probable que ces protéines soient des constituants actifs du mécanisme de ségrégation des chromosomes. Les auteurs ont donc proposé que les effets de la surexpression de *GIP3* ou *GIP4* soient la conséquence de l'altération de la localisation nucléaire de Glc7, ce qui éloignerait Glc7 des cibles d'Ipl1 (Pinsky et al., 2006).

### 3.2.2.4. *Bud14*

Au cours de la mitose, Glc7 n'est pas seulement impliquée dans la régulation des interactions kinétochores/microtubules. Elle intervient également au niveau du positionnement du fuseau, en régulant l'interaction entre les microtubules astraux et le cortex du bourgeon. Pour cela, Glc7 pourrait plus précisément influencer sur la dynéine, complexe moteur des microtubules (Knaus et al., 2005).

Chez la levure, le fuseau pré-anaphasique passe le col entre la cellule-mère et le bourgeon en partie parce qu'il est tiré par les microtubules astraux qui émanent du SPB via leur interaction avec le cortex du bourgeon. En effet, ces microtubules cytoplasmiques, une fois attachés au cortex du bourgeon, glissent le long de ce cortex de façon dépendante de la dynéine. Lors de l'attachement, la dynéine présente à l'extrémité des microtubules est ancrée au cortex. Elle participe ensuite à la traction du fuseau en se déplaçant sur les microtubules en direction du SPB.

Chez le mutant *bud14Δ*, le fuseau arrive à passer l'étranglement mais son positionnement est instable et il revient parfois dans la cellule-mère (Knaus et al., 2005). La surexpression de *BUD14* est toxique et engendre un arrêt en G2/M des cellules. Les cellules surexprimant *BUD14* ont des microtubules astraux plus longs que la souche sauvage et un fuseau pré-anaphasique mal positionné. Celui-ci se retrouve entièrement dans le bourgeon chez 30% des cellules (Knaus et

al., 2005). Ces données suggèrent que Bud14 promeut l'interaction entre les microtubules astraux et le cortex du bourgeon.

Bud14 interagit avec Glc7 via son motif RVXF. La perte de l'interaction Glc7/Bud14 (mutation du motif RVXF sur *BUD14* ou mutation *glc7-133*) supprime la toxicité de la surexpression de *BUD14* et le mauvais positionnement du fuseau pré-anaphasique qu'elle induit. Ce mauvais positionnement du fuseau est également supprimé si on inactive la dynéine, bien que cette inactivation ne corrige pas les autres défauts induits par la surexpression de *BUD14* cités préalablement. Par ailleurs, Bud14 est nécessaire à la localisation de Glc7 au niveau du cortex du bourgeon. Bud14 est d'ailleurs elle-même localisée sur ce site en anaphase, de façon indépendante de l'interaction Glc7/Bud14 (Cullen and Sprague, 2002; Knaus et al., 2005). Ces données conduisent au modèle suivant : Bud14 serait responsable du recrutement de Glc7 au niveau du cortex du bourgeon où la phosphatase pourrait promouvoir les interactions microtubules/cortex pendant la mitose en activant la dynéine (Knaus et al., 2005).

La sous-unité Bud14 semble réguler l'action de Glc7 au cours d'autres processus cellulaires, comme la croissance polarisée et la croissance filamenteuse (Cullen and Sprague, 2002). La surexpression de *BUD14* supprime la thermosensibilité du mutant *ip11-321*, ce qui pourrait également suggérer que Bud14 est impliquée dans la régulation des interactions kinétochores/microtubules, à supposer bien sûr que la surexpression de *BUD14* n'induit pas une titration non physiologique de Glc7 (Pinsky et al., 2006). Bud14/Glc7 pourrait enfin jouer un rôle dans la régulation de Msn2, un facteur de transcription régulant l'expression des gènes de réponse aux stress (gènes possédant au niveau de leur promoteur l'élément STRE (« STress Response Element ») et répondant entre autres aux stress génotoxiques) (Lenssen et al., 2005; Schmitt and McEntee, 1996).

## 4. Les PP1 chez les autres organismes

### 4.1. La PP1 chez *S. pombe*

Chez *Schizosaccharomyces pombe*, il existe deux isoformes de la sous-unité catalytique de la PP1, qui sont codées par deux gènes : *dis2*<sup>+</sup> et *sds21*<sup>+</sup>. Ces deux gènes ne sont pas essentiels mais la délétion des deux gènes est létale. Dis2 et Sds21 semblent avoir des fonctions partiellement redondantes (Ohkura et al., 1989).

Dis2 (« defective in sister chromatid disjoining 2 ») a tout d'abord été identifiée comme étant impliquée dans la séparation des chromatides sœurs au cours de la mitose via l'étude de l'allèle cryosensible *dis2-11* (Ohkura et al., 1988). Le mutant *dis2-11* s'arrête en mitose à température restrictive : ses chromatides sœurs se condensent de façon normale mais ne se séparent pas. Dans ces cellules, chacun des 3 chromosomes répliqués peut être visualisé de façon individuelle. Ces chromosomes finissent par rejoindre les extrémités de la cellule et l'on peut ainsi voir les 3 chromosomes répliqués à un même pôle de la cellule ou 2 chromosomes à un pôle et l'autre à l'autre pôle. Ce défaut ne résulte pas d'un défaut d'élongation du fuseau puisque celui-ci se forme et s'allonge correctement (Ohkura et al., 1988). Dis2 s'accumule préférentiellement dans le noyau et est plus abondante que Sds21 (Ishii et al., 1996; Ohkura et al., 1989). Le gène *sds21*<sup>+</sup> a été identifié à l'aide d'un crible visant à trouver des suppresseurs de l'allèle *dis2-11* (Ohkura et al., 1989). La double délétion *dis2Δ sds21Δ* engendre un phénotype un peu différent de celui de l'allèle *dis2-11* au sens où elle semble entraîner un arrêt à la transition

métaphase/anaphase. Mais son étude est bien évidemment difficile en raison de la létalité synthétique. L'allèle *dis2-11* est en fait singulier puisque, de façon surprenante, il découple deux événements, à savoir la séparation des chromosomes et l'élongation du fuseau, ce qui ne se produit pas chez le double délétant *dis2Δ sds21Δ* (Ishii et al., 1996). Ces résultats indiquent que la PP1 chez *S. pombe* est impliquée dans la régulation de la séparation des chromatides sœurs.

Dis2 est régulée en partie via une phosphorylation inhibitrice de sa thréonine 316. Cette phosphorylation a lieu exclusivement en mitose et pourrait être générée par la kinase Cdc2 (Ishii et al., 1996; Yamano et al., 1994). Sds21, quant à elle, ne semble pas être phosphorylée au cours du cycle (Yamano et al., 1994). La surexpression de *sds21<sup>+</sup>* ou de *dis2-T316A* est toxique contrairement à celle de *dis2<sup>+</sup>*, et empêche l'entrée en mitose (Ishii et al., 1996; Yamano et al., 1994). Cette toxicité pourrait s'expliquer par le fait que Dis2 est phosphorylée en cas de surexpression et donc inhibée, alors que Dis2-T316A et Sds21 ne peuvent pas l'être (Ishii et al., 1996; Yamano et al., 1994).

En dehors de ces quelques informations, le rôle des PP1 chez *S. pombe* est très mal connu. Il a toutefois été montré qu'elles étaient impliquées dans le rétablissement après un stress génotoxique (den Elzen et al., 2004; den Elzen and O'Connell, 2004). Ce point sera présenté en détail et discuté dans le chapitre des résultats.

## 4.2. La PP1 chez les mammifères

Le génome humain comporte 3 gènes codant pour la sous-unité catalytique de la protéine phosphatase de type 1. Il s'agit des gènes *PPP1CA*, codant l'isoforme  $\alpha$ , *PPP1CB*, codant l'isoforme  $\beta$  (également nommée isoforme  $\delta$ ) et *PPP1CC* codant les isoformes  $\gamma 1$  et  $\gamma 2$  (isoformes obtenues par épissage alternatif). Ces isoformes sont fortement similaires et diffèrent surtout par leurs domaines C-terminaux (Andreassen et al., 1998). Même si leur caractérisation *in vitro* ne montre pas de différences significatives entre elles, elles semblent tout de même avoir des rôles et des cibles distincts *in vivo* puisque leurs localisations subcellulaires sont très différentes. Comme chez la levure, leur concentration est plus forte dans le noyau que dans le cytoplasme (Andreassen et al., 1998; Bloecher and Tatchell, 2000; Fernandez et al., 1992). En interphase, la PP1 $\alpha$  semble s'associer à la matrice nucléaire, alors que la PP1 $\gamma 1$  est présente au niveau du nucléole et que la PP1 $\delta$  est associée à la chromatine. Pendant la mitose, la PP1 $\alpha$  semble s'accumuler au niveau des centrosomes (équivalents des SPB de la levure), la PP1 $\gamma 1$  au niveau du fuseau tandis que la PP1 $\delta$  est associée aux chromosomes (Andreassen et al., 1998). L'abondance relative des différentes isoformes dépend des tissus.

Comme chez la levure, les protéines phosphatases de type 1 sont impliquées chez les cellules de mammifères dans un grand nombre de processus cellulaires comme l'épissage, la transcription, la division cellulaire, la contraction musculaire, le métabolisme et l'apoptose (Ceulemans and Bollen, 2004; Ceulemans et al., 2002) et sont régulées à l'aide de sous-unités. Par exemple, les sous-unités G ciblent la PP1c vers les particules de glycogène en particulier dans le muscle (sous-unités G<sub>M</sub>) et dans le foie (sous-unités G<sub>L</sub>), tandis que la sous-unité M<sub>110</sub> cible la PP1 vers la myosine, ce qui permet la régulation de la contraction musculaire et de la forme cellulaire. Le complexe PP1c/M<sub>110</sub> comporte aussi une petite sous-unité M<sub>20</sub> et est régulé négativement par la phosphorylation de la sous-unité M<sub>110</sub> (Aggen et al., 2000; Ceulemans and Bollen, 2004). L'interaction avec les sous-unités régulatrices peut dépendre des isoformes. Chez les mammifères, un grand nombre d'inhibiteurs physiologiques de la PP1c ont été identifiés. Les

plus connus sont les inhibiteurs cytosoliques I-1 (« Inhibitor-1 »), qui ne possède pas d'homologue décrit chez *S. cerevisiae*, et I-2 (« Inhibitor-2 ») dont l'homologue potentiel est Glc8. I-1 doit être phosphorylée pour inhiber la PP1c, alors que seule la forme déphosphorylée de I-2 peut inhiber la PP1c (Aggen et al., 2000; Stark, 1996).

Le rôle des PP1 en cas de dommages de l'ADN ou de stress réplicatif n'est pas très clair même si, contrairement au cas de *Saccharomyces cerevisiae*, quelques données ont pu être obtenues. Ainsi, la phosphorylation de la thréonine 320 des isoformes  $\alpha$  et  $\delta$ , thréonine située dans un site consensus des Cdk, disparaît suite à des radiations ionisantes de façon dépendante d'ATM. La phosphorylation de cette thréonine, qui a lieu chez *S. pombe* comme chez les cellules de mammifères, atténue l'activité de la PP1. Les PP1 semblent donc être activées suite à un stress génotoxique via leur déphosphorylation (Guo et al., 2002). Par ailleurs, il a été montré que la sérine 15 de p53, phosphorylée par ATM/ATR après une irradiation UV, était principalement déphosphorylée par la PP1. GADD34 (« Growth Arrest and DNA damage 34 ») pourrait être une sous-unité régulant négativement la PP1 pour cette fonction. En effet, il a été montré que GADD34 promouvait la phosphorylation et la stabilisation de p53 (Haneda et al., 2004). Enfin, on sait que la PP1 $\alpha$  interagit avec et déphosphoryle Brca1 *in vitro*, et que sa surexpression atténue partiellement l'hyperphosphorylation de Brca1 dépendante d'ATM observée après une irradiation  $\gamma$  *in vivo* (Liu et al., 2002). Ainsi, la PP1 semble avoir globalement un effet négatif sur les checkpoints de l'ADN, atténuant leur activation et/ou facilitant leur inactivation. Cette idée est confortée par des études menées chez d'autres eucaryotes supérieurs. En effet, chez le xénope, l'inhibition de Cdc25 (phosphatase nécessaire à l'activation de Cdc2 requise pour l'entrée en mitose) par les checkpoints de l'ADN s'effectue principalement par la phosphorylation de sa sérine 287. La PP1 semble être responsable de la déphosphorylation de cette sérine, déréprimant ainsi Cdc25 au moment de l'entrée en mitose (Margolis et al., 2003).



# **RÉSULTATS ET DISCUSSION**



# Glc7 et l'inactivation des mécanismes de surveillance de l'ADN

## 1. Contexte

### *1.1. Les moyens d'étude de l'adaptation*

Une souche spécifique a été construite par le laboratoire de James Haber pour étudier le phénomène d'adaptation : la souche JKM139. Cette souche a été modifiée de manière à pouvoir permettre l'induction d'une cassure double-brin unique et irréparable par ajout de galactose dans le milieu de culture. La cassure est générée par une endonucléase naturelle, l'endonucléase HO. Trois sites de restriction pour cette endonucléase sont naturellement présents dans une cellule haploïde de levure *Saccharomyces cerevisiae*. Ils sont situés sur le chromosome III. Un de ces sites est situé au locus *MAT* (locus conférant le type sexuel (a ou  $\alpha$ )). Les deux autres sites sont situés aux loci *HML $\alpha$*  et *HMRa*, mais l'organisation de la structure chromatinienne rend ces deux derniers inaccessibles à l'enzyme. Lors du changement de type sexuel, l'ADN est clivé au niveau du seul site HO accessible et la cassure est réparée par recombinaison homologue en utilisant l'une des cassettes homologues *HML $\alpha$*  et *HMRa*. Dans la souche JKM139, le gène codant pour l'endonucléase HO a été délété. Une construction 'promoteur *GAL*'-HO, plaçant l'expression de l'endonucléase sous le contrôle du promoteur *GAL* inductible par le galactose, a été insérée au locus *ADE3*. On a ainsi une expression contrôlée de l'endonucléase. Par ailleurs, les cassettes *HML* et *HMR* ont été délétées pour empêcher la réparation de la cassure double-brin par recombinaison homologue (cf figure n°G1).

Ainsi, la souche JKM139 est cultivée la nuit dans un milieu contenant du raffinose. L'expression de *HO* n'est alors ni réprimée (comme elle le serait en présence de glucose), ni induite. L'ajout de galactose dans le milieu entraîne l'expression du gène *HO* et une induction rapide d'une coupure unique et irréparable au locus *MAT*. En fait, il existe une compétition entre NHEJ et recombinaison homologue pour la réparation de cette cassure. Le NHEJ peut réparer efficacement les extrémités intactes générées par l'endonucléase. Si le NHEJ répare de manière fidèle, l'endonucléase coupe à nouveau le site HO. Plusieurs cycles de réparation par NHEJ peuvent avoir lieu, mais dès que les extrémités de la cassure sont résectées, le NHEJ ne peut plus agir et le processus de recombinaison homologue est irréversiblement engagé (Frank-Vaillant and Marcand, 2002). Comme la réparation par recombinaison homologue n'est pas possible, la cassure devient irréparable. Le NHEJ peut parfois réparer de façon mutagène et altérer le site HO, ce qui entraîne la formation de colonies viables. Cependant, seule une cellule sur 1000 semble être concernée par ce phénomène (Lee et al., 1998).

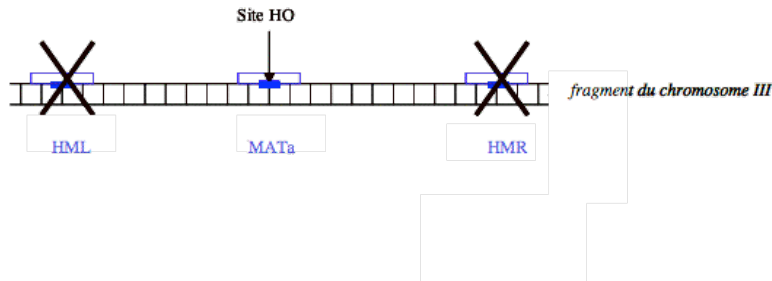
Il a été montré que l'induction d'une seule cassure double-brin est suffisante pour activer le checkpoint de l'ADN (Sandell and Zakian, 1993). Ainsi, 6 heures après ajout de galactose, on observe une accumulation des cellules en G2/M par FACS : les cellules sont arrêtées dans le cycle par le checkpoint. On peut suivre le devenir de ces cellules individuellement en les « spottant » sur galactose puis en les observant au microscope. On constate alors qu'une grande majorité des cellules ne restent pas arrêtées indéfiniment en G2/M mais qu'elles arrivent au contraire à effectuer quelques divisions. Lors de ces divisions, malgré le fait que la lésion soit toujours présente, les cellules ne subissent plus d'arrêt du cycle. C'est pourquoi, on qualifie le phénomène d'adaptation, puisque les cellules ne réagissent plus à un stimulus auquel elles étaient



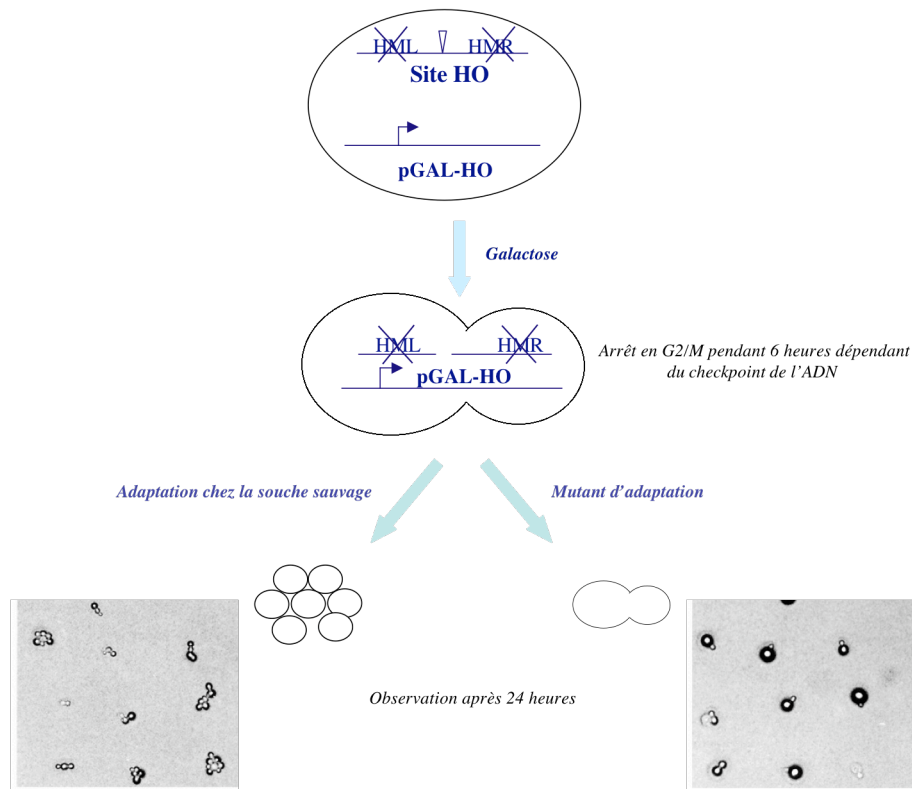
sensibles.

Figure n°G1

A



B



**La souche JKM139 et l'étude de l'adaptation.**

- A. Les modifications du chromosome III dans la souche JKM139: délétion de *HML* et *HMR*.
- B. Après ajout de galactose dans le milieu de culture, une cassure double-brin unique et irréparable est induite au site HO. Cette cassure déclenche l'activation du checkpoint de l'ADN qui arrête les cellules en G2/M. On peut suivre la capacité d'adaptation des souches par observation au microscope 24 heures après induction de la coupure: la souche sauvage reprend le cycle et forme des microcolonies, les mutants d'adaptation restent bloqués en G2/M. Photographies extraites de (Lee et al., 1998).

Pour quantifier la capacité d'adaptation d'une souche, le laboratoire de James Haber a mis au point un test nommé « test d'adaptation ». Il consiste à cultiver la souche dans un milieu liquide contenant du raffinose comme seule source de carbone, puis à induire la cassure par ajout de galactose. Les cellules se synchronisent en G2/M en quelques heures via l'activation de leur checkpoint. On dépose alors des gouttes de suspensions cellulaires sur un milieu contenant du galactose (« spotting »). Le lendemain, chaque cellule isolée a évolué sous la forme d'une microcolonie comportant de deux (pour les cellules qui sont restées bloquées en G2/M) à une vingtaine de cellules environ (cf figure n°G1). Par un comptage sur 200 microcolonies environ, on détermine le pourcentage de microcolonies comportant 2 cellules, comportant 3 cellules, 4 cellules, etc... Ainsi, la capacité d'adaptation d'une souche (c'est-à-dire sa capacité à inactiver le checkpoint de l'ADN et à reprendre son cycle de division après le blocage en G2/M) est évaluée par sa capacité à former des microcolonies comportant un nombre de cellules d'autant plus important que la souche adapte mieux. Pour la souche sauvage, on obtient typiquement un maximum de microcolonies à 3, 4 ou 5 cellules. Moins de 10% des cellules restent bloquées en G2/M et moins de 10% arrivent à former des microcolonies de 8 cellules et plus. Un comptage représentatif pour la souche sauvage est montré figure n°G6A.

### 1.2. Principe du crible à l'origine de l'étude de Glc7

L'étude au laboratoire des phosphatases Ptc2 et Ptc3 a montré l'implication de phénomènes de déphosphorylation dans l'inactivation des mécanismes de surveillance de l'ADN. L'activation des checkpoints mettant en jeu une cascade de phosphorylations, il est probable que d'autres phosphatases soient impliquées dans leur désactivation.

Le mutant *ptc2Δ ptc3Δ* est défectueux pour l'adaptation : il montre un défaut de déphosphorylation de Rad53 et un défaut de reprise du cycle après induction de la cassure HO (Leroy et al., 2003). La majorité des cellules de ce double délétant restent bloquées en G2/M après l'activation du checkpoint de l'ADN, probablement parce qu'elles n'arrivent pas à déphosphoryler Rad53 et donc à inactiver le checkpoint. La surexpression de *PTC2* a l'effet inverse et entraîne une reprise plus rapide du cycle. Les cellules subissent alors plusieurs cycles de division et forment des microcolonies de plus de 8 cellules. Elles ne peuvent pour autant former des colonies viables car la résection au niveau des extrémités de la cassure entraîne la perte du chromosome III et de gènes essentiels.

Pour identifier de nouvelles phosphatases impliquées dans le phénomène d'adaptation, un crible a été effectué par Emilie Ma au laboratoire avant mon arrivée. Une souche *ptc2Δ ptc3Δ* a été transformée par une banque de plasmides multicopies (issus du plasmide pRS426) contenant les gènes de plusieurs phosphatases PSP de *Saccharomyces cerevisiae*, construite par Chaouki Miled en 1998. Nous avons concentré notre étude sur les PSP car tous les résidus de Rad9 et Rad53 qui ont été identifiés comme étant phosphorylés après un stress génotoxique sont des sérines ou des thréonines (Smolka et al., 2005; Sweeney et al., 2005). Le but du crible était d'identifier une phosphatase dont la surexpression supprime le phénotype du mutant *ptc2Δ ptc3Δ*. En effet, si une phosphatase est nécessaire au processus de désactivation des checkpoints de l'ADN, il est possible que sa surexpression dans le mutant *ptc2Δ ptc3Δ* améliore l'adaptation de cette souche, c'est-à-dire qu'elle facilite la reprise du cycle cellulaire et supprime l'arrêt G2/M quasi-permanent de ce mutant.

Si ce crible peut permettre d'identifier des phosphatases spécifiquement impliquées dans le phénomène d'adaptation, qui affectent la déphosphorylation de Rad53 de façon directe ou

indirecte (par exemple en jouant sur Ptc2 et Ptc3), il peut également permettre de trouver des phosphatases dont la surexpression atténue le signal activant le checkpoint de l'ADN, des phosphatases dont la surexpression inhibe l'activité des protéines nécessaires à l'activation de Rad53 ou des phosphatases (ciblées ou non par le checkpoint) dont la surexpression supprime seulement le blocage du cycle dû au stress génotoxique, indépendamment de l'activité du checkpoint de l'ADN. D'autres mécanismes plus compliqués ou moins physiologiques qui permettraient à une phosphatase surexprimée de supprimer le phénotype du mutant *ptc2Δ ptc3Δ* ne sont bien évidemment pas exclus.

### 1.3. Le crible

Un test d'adaptation a été effectué sur les souches issues de la transformation par la banque. Comme contrôle, nous avons utilisé la souche *ptc2Δ ptc3Δ* portant le plasmide vide pRS426. Les résultats sont montrés figure n°G2. Nous pouvons observer que près de 70% des cellules du mutant *ptc2Δ ptc3Δ* restent bloquées en G2/M. La surexpression de nombreuses phosphatases n'influence pas l'adaptation du double délétant. Seule la surexpression de *GLC7*, gène codant pour la sous-unité catalytique de la PP1, supprime le défaut d'adaptation du mutant de façon significative.

Figure n°G2

Nombre de cellules	2	3	4	5	6	7	>=8	
vecteur vide	68	11	10	9	2	0	0	
<i>GLC7</i> (GC)	8	15	16	35	12	4	10	PP1
<i>GLC7</i> (PC)	80	7	8	1	2	1	1	PP1
<i>PPH21</i>	78	13	8	1	0	0	0	PP2A
<i>PPH22</i>	67	14	7	9	3	0	0	PP2A
<i>PPH3</i>	71	15	7	4	3	0	0	PP2A-relate d
<i>SIT4</i>	72	15	6	3	4	0	0	PP2A-relate d
<i>PPG1</i>	74	8	8	9	1	0	0	PP2A-relate d
<i>CNA1</i>	69	13	11	4	1	0	2	PP2B
<i>CNA2</i>	71	13	9	3	2	2	0	PP2B
<i>PTC4</i>	66	16	5	9	2	1	1	PP2C
<i>PTC5</i>	62	10	17	5	3	1	2	PP2C
<i>PTC6</i>	50	24	12	8	2	0	4	PP2C
<i>PPZ1</i>	77	10	7	3	2	0	1	PPZ

**Crible visant à identifier de nouvelles phosphatases impliquées dans l'inactivation des checkpoints de l'ADN.**

Test d'adaptation effectué sur les souches issues de la transformation de la souche MCM322 (*lev348 ptc2Δ ptc3Δ*) par une banque de plasmides 2μ de base pRS426 dans lesquels ont été insérés les gènes codant pour 12 phosphatases de *S. cerevisiae*. Les valeurs représentées correspondent aux proportions de microcolonies comportant 2 cellules, 3 cellules, 4 cellules,... comptabilisées à l'issue du test d'adaptation.

Cependant, lors de la transformation par le plasmide pRS426/*GLC7*, des clones de taille

hétérogène ont été obtenus. Sur la boîte de transformation, au milieu d'un tapis de petits clones (PC) poussent une vingtaine de gros clones (GC) aux bords irréguliers. Petits clones et gros clones ont été testés séparément pour l'adaptation. Seuls les gros clones ne présentent plus le défaut d'adaptation du mutant *ptc2Δ ptc3Δ*. Pour étudier plus en détail les gros clones, l'ADN plasmidique de quelques-uns a été extrait et amplifié par transformation chez *E. coli*. Les plasmides issus des GC ont été vérifiés par digestion et étaient semblables au plasmide originel (pRS426/*GLC7*). La souche *ptc2Δ ptc3Δ* a alors été retransformée avec les plasmides issus des gros clones : cette fois-ci la taille des transformants était homogène, avec un tapis de petits clones ronds sans aucune distinction PC/GC. Par ailleurs, le défaut d'adaptation de la souche initiale (JKM139 *ptc2Δ ptc3Δ*) n'était plus complétement... Ce phénomène reste inexpliqué. Comme nous l'avons souligné dans l'introduction, il a déjà été constaté qu'une forte surexpression de *GLC7* était toxique, voire létale dans une souche sauvage (Black et al., 1995; Francisco et al., 1994; Hisamoto et al., 1994). Le phénotype GC/PC pourrait provenir d'un effet secondaire de cette toxicité. Pour étudier de façon correcte l'effet de la surexpression de la PP1 sur l'adaptation, *GLC7* a été recloné dans des plasmides centromériques (pRS316 et pRS314). La taille des clones obtenus après transformation avec ces plasmides était cette fois homogène.

## 2. Résultats

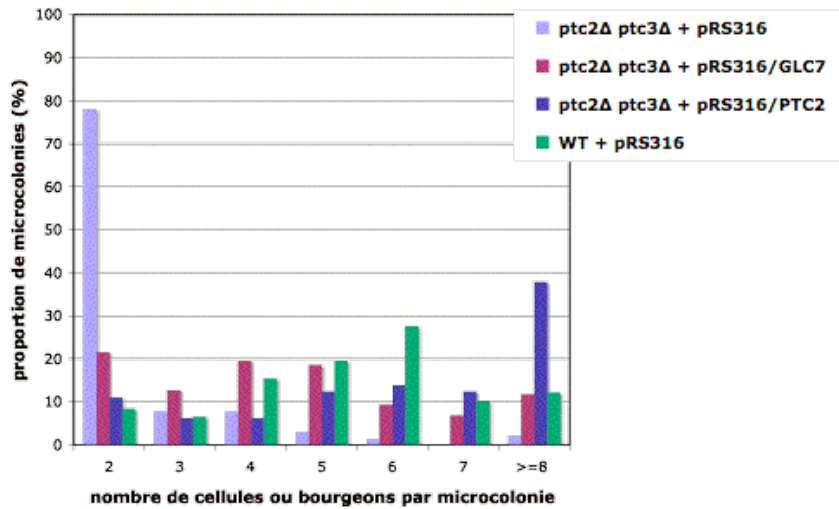
### 2.1. La surexpression de *GLC7* supprime partiellement le défaut d'adaptation de nombreux mutants.

A l'aide des plasmides centromériques, nous avons tout d'abord vérifié que la surexpression modérée de *GLC7* supprime le défaut d'adaptation des mutants *ptc2Δ* et *ptc2Δ ptc3Δ*. Les résultats sont montrés figures n°G3 et G4. Il est important de comparer des souches portant les mêmes marqueurs d'auxotrophie, car les pourcentages peuvent être légèrement décalés selon leur présence ou leur absence. Par exemple, un mutant *ptc2Δ trp1* montre un plus fort défaut d'adaptation qu'un mutant *ptc2Δ TRP1* (80% de cellules arrêtées en G2/M contre 65%) (données non montrées).

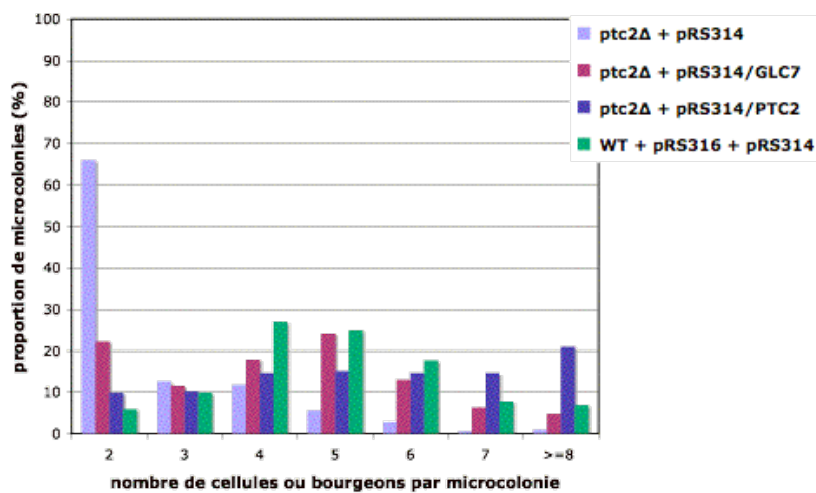
D'après les histogrammes de la figure n°G3, on voit que la surexpression modérée de *GLC7* via un plasmide centromérique supprime partiellement le défaut d'adaptation des mutants *ptc2Δ* et *ptc2Δ ptc3Δ*. En effet, on ne retrouve pas exactement le phénotype sauvage. La surexpression de *PTC2*, quant à elle, confère une capacité d'adaptation plus forte que celle du sauvage. On observe en effet un décalage du profil de l'histogramme vers la catégorie des microcolonies à 8 cellules et plus.

Figure n°G3

A



B



**Effet de la surexpression de *GLC7* sur l'adaptation des mutants *ptc2Δ ptc3Δ* et *ptc2Δ*.**

- A. Les souches MCM322 (JKM139 *bar1Δ ptc2Δ ptc3Δ*) et MCM261 (JKM139 *bar1Δ*) portant le plasmide vide *pRS316*, le plasmide *pRS316/GLC7* ou le plasmide *pRS316/PTC2* sont cultivées en milieu liquide contenant du raffinose. On induit l'expression de *HO* en ajoutant du galactose. Six heures après l'induction, un aliquot de cellules est soniqué et «spotté» sur un milieu contenant du galactose. On comptabilise les proportions de microcolonies comportant 2 cellules, 3 cellules, 4 cellules,... après 24 heures. Ces proportions sont reportées sur l'histogramme.
- B. Test d'adaptation effectué sur les souches MCM336 (JKM139) et MCM413 (JKM139 *ptc2Δ*) portant le ou les plasmides vides *pRS314* et *pRS316*, le plasmide *pRS314/GLC7* ou le plasmide *pRS314/PTC2*. La souche sauvage porte le plasmide *pRS316* par souci d'homogénéité des marqueurs d'auxotrophie.

Nous avons ensuite voulu savoir si l'effet de la PP1 était spécifique des mutants *ptcΔ* ou s'il pouvait être observé dans d'autres mutants d'adaptation. Un nombre important de tels

mutants ont été décrits dans la littérature. Ils sont capables d'activer le checkpoint de l'ADN en réponse à une cassure double-brin mais restent bloqués de façon permanente en G2/M comme c'est le cas pour les mutants *ptcΔ*. Nous commençons par présenter brièvement les différents mutants, puis nous exposons les résultats obtenus.

Tid1/Rdh54 est un facteur de recombinaison. Il promeut l'invasion de brin dépendante de Rad51 lors de la recombinaison homologue *in vitro* (Petukhova et al., 2000). Tid1 semble surtout être impliquée dans les événements de recombinaison interchromosomique intervenant notamment pendant la méiose, même si la protéine pourrait avoir un rôle mineur, partiellement redondant avec celui de Rad54, lors des phénomènes de recombinaison mitotiques (Shinohara et al., 1997). Le mutant *tid1Δ* montre un défaut d'adaptation : les cellules de ce mutant restent bloquées à plus de 90% en G2/M après induction de la cassure HO. Ce phénotype est supprimé dans le double délétant *rad9Δ tid1Δ* (Lee et al., 2001b). Il montre par ailleurs une hyperphosphorylation de Rad53 persistente après la cassure HO, confirmant que les cellules n'arrivent pas à désactiver le checkpoint de l'ADN et à adapter (Lee et al., 2001b).

Le complexe Ku, composé de deux sous-unités, Yku70 (ou Hdf1) et Yku80 (ou Hdf2), intervient dans plusieurs voies. Sa capacité de liaison aux extrémités d'ADN semble être impliquée dans la plupart de ses rôles. Il intervient par exemple dans le NHEJ, un des mécanismes permettant la réparation de cassures double-brin. Le NHEJ entraîne la formation d'un pont entre les deux extrémités de la cassure, métabolise ces extrémités puis les lie. Le complexe Ku intervient dans les premières étapes de ce processus en se liant aux extrémités de la cassure (Daley et al., 2005). Il pourrait ainsi les protéger de la dégradation, les maintenir à proximité et/ou recruter des facteurs de réparation. Il a été montré qu'en cas de cassure double-brin (cassure HO), Yku80 était en partie relocalisée sur le site de la lésion aux dépens de sa localisation télomérique (Martin et al., 1999). Le complexe Ku intervient aussi dans la maintenance des télomères, le silencing de gènes situés près des télomères et l'ancrage périnucléaire des télomères (Palmbos et al., 2005). Les délétants *yku70Δ* et *yku80Δ* sont thermosensibles. Leur viabilité est très affectée à 37°C (Teo and Jackson, 2001). Rad53 montre une forte capacité d'autophosphorylation dépendante de *RAD9* et *RAD24* dans le mutant *yku80Δ*, ce qui pourrait suggérer que le checkpoint de l'ADN est activé chez ce mutant à température restrictive (Teo and Jackson, 2001). Il a été proposé que des structures altérées des extrémités télomériques soient à l'origine de cette activation (Teo and Jackson, 2001). Le mutant *yku70Δ* présente un défaut d'adaptation. En effet, environ 90% des cellules restent bloquées en G2/M après induction de la cassure HO. Chez ce mutant, le taux de résection 5'→3' des extrémités de la cassure double-brin est deux fois plus élevé que dans le sauvage. Ceci semble être à l'origine de son incapacité à adapter, puisque des mutations qui retardent le taux de résection ont l'effet opposé et suppriment l'arrêt permanent des cellules *yku70Δ* (Lee et al., 1998).

Cdc5 appartient à la famille des polo-like kinases très conservée chez les eucaryotes. Elle est essentielle au bon déroulement de nombreux événements mitotiques. Son activation en mitose est dépendante de la Cycline-Dépendante Kinase Cdc28 (Mortensen et al., 2005). Cdc5 intervient notamment pour la progression de l'anaphase, probablement via son implication dans les voies FEAR (voie intervenant en début d'anaphase) et MEN (voie activée en fin d'anaphase), voies permettant l'activation de la phosphatase Cdc14, l'inactivation des Cdks et ainsi la sortie de mitose (Visintin et al., 2003). Il a été montré qu'elle était aussi impliquée dans des événements

plus précoces de la mitose. Il semble en effet que Cdc5 phosphoryle la sous-unité Scc1 du complexe cohésine afin de faciliter son clivage, et promeut ainsi la séparation des chromatides sœurs lors de la transition métaphase/anaphase (Alexandru et al., 2001). D'autres rôles de Cdc5 ont été décrits, comme son implication dans la formation du CAR (« Contractile Actin Ring ») (Yoshida et al., 2006), et je pense que beaucoup restent à découvrir. Les éventuels liens entre ces différents rôles seraient aussi intéressants à étudier. En tout cas, Cdc5 pourrait servir de cible pour les checkpoints de l'ADN pour bloquer la sortie de mitose (Sanchez et al., 1999). Il a d'ailleurs été montré qu'elle était phosphorylée chez le mutant *cdc13-1* de façon dépendante des protéines des checkpoints (Cheng et al., 1998). Un système d'étude de l'adaptation légèrement différent de celui utilisé par notre laboratoire a permis d'identifier l'implication de Cdc5 dans l'inactivation des checkpoints de l'ADN. Ce système est également basé sur l'induction d'une cassure double-brin générée par l'endonucléase HO (dont l'expression est induite par le galactose), mais le site de coupure est situé sur un chromosome surnuméraire, copie légèrement modifiée du chromosome VII endogène. L'étude se fait dans un contexte *rad52Δ* pour éliminer la réparation par recombinaison, voie majeure de réparation des cassures double-brin chez *Saccharomyces cerevisiae*. On caractérise la capacité d'adaptation en suivant le devenir de cellules isolées après induction de la coupure. Dans une souche « sauvage » (*rad52Δ*), 87% des cellules arrivent à former des colonies viables sur galactose. Ces cellules perdent rapidement le chromosome cassé (Toczyski et al., 1997). Le mutant *cdc5-ad* montre un fort défaut d'adaptation puisque 90% des cellules restent bloquées en G2/M dans ce test. La délétion de *RAD9* supprime la mortalité des mutants *cdc5-ad* sur galactose, suggérant que les cellules meurent à cause de l'arrêt permanent imposé par le checkpoint (Toczyski et al., 1997). Ceci exclut aussi une létalité due à un défaut de sortie mitotique du mutant *cdc5-ad*.

Les protéines Ckb1 et Ckb2 sont les sous-unités régulatrices de la protéine CK2 (anciennement Caséine Kinase 2), tétramère comprenant aussi deux sous-unités catalytiques codées par les gènes *CKA1* et *CKA2*. Les sous-unités régulatrices semblent être responsables de sa spécificité de substrat. La CK2 est impliquée dans différents processus cellulaires comme la progression du cycle, la polarité cellulaire et l'homéostasie des ions (Glover, 1998; Hanna et al., 1995). L'influence de la délétion de *CKB2* sur le processus adaptatif a été tout d'abord étudiée par D.Toczyski et L.Hartwell à l'aide du système décrit ci-dessus pour le mutant *cdc5-ad*. Ils ont montré que le délétant *ckb2Δ* se comportait comme le mutant *cdc5-ad* avec toutefois un phénotype moins fort (Toczyski et al., 1997). Il a été montré au laboratoire que la phosphatase Ptc2 déphosphoryle probablement directement Rad53 lors du processus d'adaptation après une cassure double-brin, et que Ptc2 doit être phosphorylée pour interagir avec Rad53 (Leroy et al., 2003). Nous avons récemment montré que le domaine FHA1 de Rad53 se lie à la phosphothréonine pT376 de Ptc2. Or, Ckb1 et Ckb2 sont nécessaires à l'interaction *in vivo* entre Ptc2 et Rad53, et Ckb1 interagit avec Ptc2 *in vitro* (Guillemain et al., 2007). La protéine kinase CK2 pourrait donc être la kinase responsable de la phosphorylation de la thréonine T376 de Ptc2, nécessaire à l'interaction Ptc2/Rad53, ce qui expliquerait les défauts d'adaptation et de rétablissement des mutants *ckb1Δ* et *ckb2Δ* (Guillemain et al., 2007).

Srs2 est une hélicase qui semble réguler négativement la recombinaison homologue et orienter la réparation vers une voie non-recombinogène, ce qui est en accord avec le phénotype hyper-recombinatoire des mutants *srs2*. Srs2 possède par ailleurs une activité translocase : elle est capable de décrocher Rad51 du filament présynaptique *in vitro* (Macris and Sung, 2005). Lors de

dommages pendant la phase S, il a été proposé que son recrutement sur des sites de lésions se fasse par l'intermédiaire de formes particulières de PCNA et qu'elle pourrait ainsi inhiber la formation d'intermédiaires toxiques de recombinaison (Pfander et al., 2005). Il a par ailleurs été montré que Srs2 influence la désactivation du checkpoint de l'ADN. Le délétant *srs2Δ* est défectueux pour le rétablissement après une cassure double-brin de l'ADN contrairement aux mutants *yku70Δ*, *tid1Δ* et *cdc5-ad*. Le défaut de rétablissement est supprimé lorsque le checkpoint est artificiellement désactivé par ajout de caféine. Le mutant *srs2Δ* est aussi défectueux pour l'adaptation même si ce défaut est un peu moins prononcé que pour les mutants *yku70Δ*, *tid1Δ* et *cdc5-ad*. Ce phénotype est supprimé par la délétion de *RAD9* ou *RAD17* (Vaze et al., 2002). D'autre part, Srs2 est modifiée suite à l'activation du checkpoint de l'ADN, notamment lors de dommages intra-S (réorganisation de complexes, phosphorylation) (Chiolo et al., 2005; Liberi et al., 2000). Ainsi, la létalité observée chez le mutant *srs2Δ* lors des tests d'adaptation et de rétablissement ne semble pas être due à un défaut de réparation, mais plutôt à l'incapacité même de désactiver le checkpoint en dépit de la réparation des dommages (Vaze et al., 2002). Il a été proposé que Srs2 décroche une ou des protéines du checkpoint de l'ADN des sites de lésions, induisant ainsi la désactivation du checkpoint (Vaze et al., 2002).

La protéine Rad51 intervient dans la recombinaison homologue, principale voie de réparation des cassures double-brin chez *Saccharomyces cerevisiae*. Rad51 se lie à l'ADN simple-brin issu de la résection des extrémités de la cassure au début du processus de recombinaison. C'est ce nucléofilament qui va localiser la séquence homologue avec laquelle il pourra y avoir appariement et échange de brins (Krogh and Symington, 2004). Le mutant *rad51Δ*, comme d'autres mutants de protéines impliquées dans la recombinaison homologue, montre un défaut d'adaptation. 75% des cellules restent bloquées en G2/M après cassure HO (Lee et al., 2003). Le rôle de Rad51 dans l'adaptation semble être indépendant de sa capacité à lier l'ADN simple-brin (Lee et al., 2003). De façon surprenante, la délétion de *RAD52* supprime le défaut d'adaptation du mutant *rad51Δ* alors qu'elle n'a pas d'effet sur l'adaptation de la souche sauvage (Lee et al., 2003). Même si l'on constate une représentation importante de protéines impliquées dans la recombinaison homologue chez les mutants d'adaptation connus, le lien entre les deux phénomènes n'est pas clair. Notamment parce que d'autres mutants de la recombinaison homologue, tels que les mutants *rad54*, *rad55*, *rad57* et *rad59*, ne montrent pas de défaut dans l'inactivation du checkpoint de l'ADN (Lee et al., 2003).

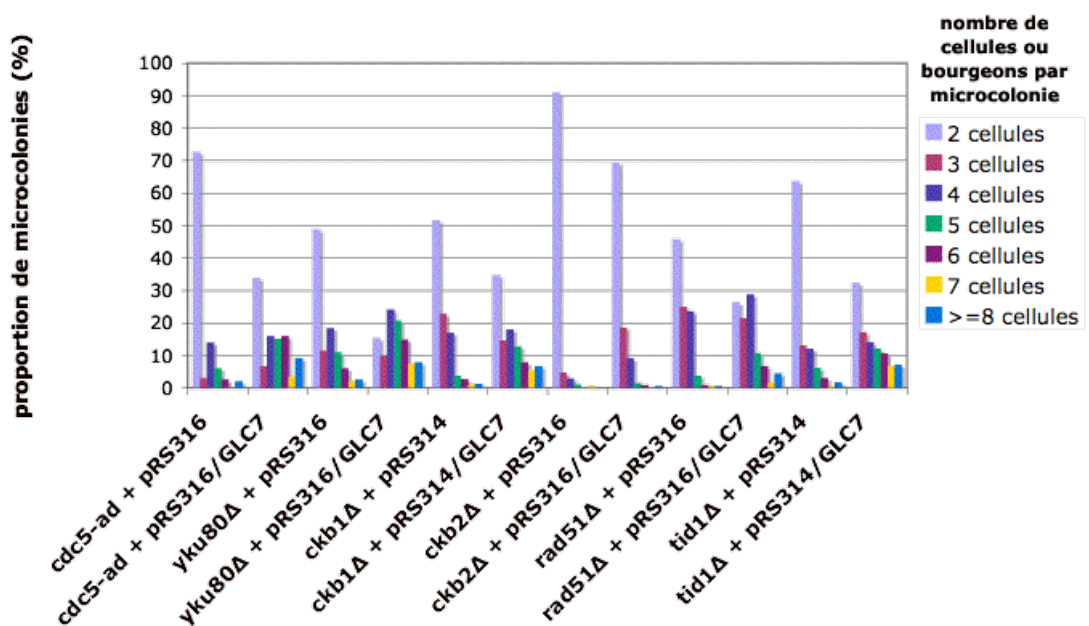
Les différents mutants présentés ci-dessus montrent des caractéristiques communes : une majorité des cellules restent bloquées en G2/M après induction de la cassure HO même si le taux d'arrêt n'est pas identique pour tous. Tous semblent être capables d'activer le checkpoint de manière correcte. En effet, pendant les premières heures après induction de la lésion, aucune différence n'a été remarquée entre la souche sauvage et les mutants, que ce soit au niveau de l'accumulation des cellules en G2/M ou au niveau de la phosphorylation de Rad53. Par contre, on observe pour ces mutants, une persistance de la phosphorylation de Rad53 plusieurs heures après que Rad53 ait été déphosphorylée chez la souche sauvage. Comme il l'a été rapporté pour certains mutants, leur arrêt permanent en G2/M est supprimé quand on délète des gènes du checkpoint comme *RAD9*, *RAD17* ou *MEC1* (Lee et al., 2001b; Lee et al., 2003; Vaze et al., 2002). Il est probable que des mécanismes distincts soient à l'origine des défauts d'adaptation de ces mutants. En effet, il a été montré que le taux de résection 5'→3' des extrémités de la cassure était accéléré chez le mutant *yku70Δ*, alors qu'il ne l'est pas chez les mutants *rad51Δ* et *tid1Δ*



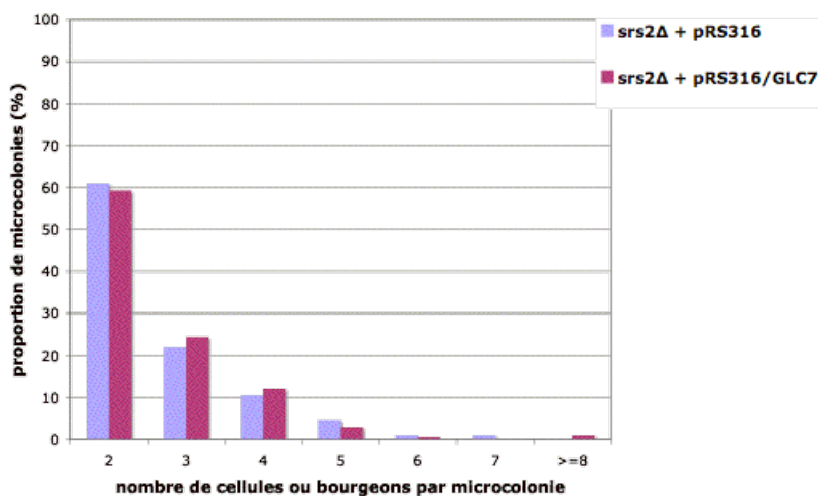
(Lee et al., 1998; Lee et al., 2001b; Lee et al., 2003). De plus, une mutation dans la plus grande sous-unité de RPA, *rfal-t11*, restaure l'adaptation des mutants *yku70Δ* et *tid1Δ*, supprime partiellement le défaut d'adaptation des cellules *rad51Δ* et n'a pas d'effet sur le mutant *cdc5-ad* (Lee et al., 2003). La délétion de *RAD52* supprime le défaut d'adaptation des mutants *rad51Δ* et *srs2Δ* mais n'a pas d'effet sur les mutants *tid1Δ*, *yku70Δ* et *cdc5-ad* (Lee et al., 2003). Enfin, le mutant *srs2Δ* est défectueux pour le rétablissement contrairement aux mutants *cdc5-ad*, *yku70Δ* et *tid1Δ*, alors qu'il était concevable d'imaginer qu'une voie unique permettait d'inactiver le checkpoint après réparation ou non des lésions (Vaze et al., 2002).

Figure n°G4

A



B



**Effet de la surexpression de *GLC7* sur les mutants d'adaptation.**

- A. Test d'adaptation effectué sur les souches MCM426 (JKM179 *cdc5-ad*), MCM263 (JKM139 *bar1Δ yku80Δ*), MCM449 (JKM139 *ckb1Δ*), MCM458 (JKM139 *ckb2Δ*), MCM348 (JKM139 *rad51Δ*) et MCM347 (JKM139 *tid1Δ*) portant le plasmide vide pRS314 ou pRS316, le plasmide pRS314/GLC7 ou le plasmide pRS316/GLC7. L'histogramme est présenté de manière différente pour plus de clarté.
- B. Test d'adaptation effectué sur la souche MCM346 (JKM139 *srs2Δ*) portant le plasmide vide pRS316 ou le plasmide pRS316/GLC7.

Nous avons vu que la surexpression modérée de *GLC7* supprimait partiellement le défaut d'adaptation des délétants *ptc2Δ* et *ptc2Δ ptc3Δ*. Pour mieux caractériser l'effet de la PP1c sur l'inactivation des checkpoints, nous avons surexprimé *GLC7* dans différents mutants d'adaptation, à savoir les mutants *cdc5-ad*, *yku80Δ*, *ckb1Δ*, *ckb2Δ*, *rad51Δ*, *tid1Δ* et *srs2Δ*. Le fond génétique utilisé a été précédemment décrit et correspond à la souche JKM139. Nous avons testé la capacité adaptative des souches obtenues. Les résultats sont montrés sur la figure n°G4. Nous retrouvons bien le phénotype commun décrit dans la littérature pour ces mutants : pour chacun d'entre eux, la moitié des cellules ou plus montrent un arrêt permanent en G2/M lorsqu'elles portent un plasmide vide, confirmant leur défaut d'adaptation. Les pourcentages d'arrêt en G2/M ne sont pas forcément exactement identiques à ceux décrits dans la littérature. Ceci est probablement dû en partie à la présence de marqueurs d'auxotrophie différents. Pour cette même raison, il est difficile de comparer les mutants entre eux et avec les données présentées sur les figures n°G5 et G6. L'hétérogénéité des milieux ou des conditions de croissance peuvent par ailleurs également légèrement modifier les histogrammes d'une expérience à l'autre. Pour tous les mutants testés, excepté le délétant *srs2Δ*, la surexpression de *GLC7* entraîne une réduction significative de la proportion de cellules restées bloquées en G2/M de façon permanente après la cassure HO. Pour le mutant *cdc5-ad*, alors que 70% des cellules environ ne reprennent pas le cycle si la souche porte un plasmide vide, 30% seulement d'entre elles n'arrivent pas à adapter en présence du plasmide pRS316/GLC7.

Le fait que la surexpression de *GLC7* ait un effet sur presque tous les mutants d'adaptation testés et que ceux-ci soient affectés dans des voies cellulaires très diverses (réparation, cycle, régulation de Rad53) suggère que Glc7 a un effet assez direct sur le phénomène d'adaptation. Il est cependant difficile de tirer plus de conclusions étant donné que les causes des défauts d'adaptation de ces mutants ne sont pas clairement identifiées. On peut tout de même faire remarquer que la surexpression de *PTC2* supprime elle aussi le défaut d'adaptation des cellules *cdc5-ad* et *yku80Δ* et que cette phosphatase agit directement au niveau de Rad53 (Leroy et al., 2003). En tout cas, comme les mutants ne sont pas tous défectueux pour les mêmes voies, on peut penser que l'effet de Glc7 est indépendant du métabolisme de la cassure.

Il est intéressant de noter que la surexpression de *GLC7* n'a pas d'effet sur le mutant *srs2Δ*. Ce résultat est à prendre avec précaution car un seul mutant *srs2Δ* a été testé. Cependant, il a été montré que Srs2 était phosphorylée suite à des lésions de l'ADN, notamment suite à des dommages intra-S (hydroxyurée, UV, MMS, 4-NQO), qu'elle était déphosphorylée lors du rétablissement après un traitement à l'hydroxyurée (Liberi et al., 2000) et qu'elle était impliquée dans la désactivation du checkpoint de l'ADN lors de l'adaptation ou du rétablissement après cassure HO (Vaze et al., 2002). Si l'on suppose que :

- Srs2 est aussi une cible du checkpoint en dehors de dommages intra-S,
- Srs2 est aussi phosphorylée après induction d'une cassure double-brin,

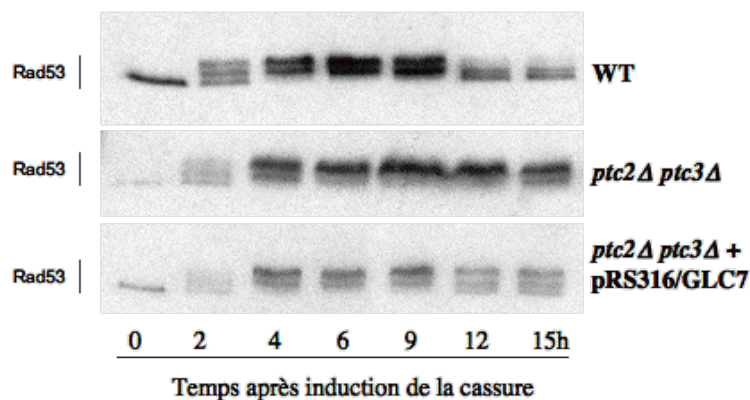
- la déphosphorylation de Srs2 est nécessaire à la désactivation du checkpoint, on peut faire l'hypothèse que Glc7 soit nécessaire à la déphosphorylation de Srs2 après cassure HO, ce qui expliquerait l'absence d'effet de la surexpression de *GLC7* dans ce seul mutant d'adaptation. Toutefois, après traitement à l'hydroxyurée, la déphosphorylation de Rad53 a lieu avant celle de Srs2 (Liberi et al., 2000).

## 2.2. La surexpression de *GLC7* accélère la désactivation du checkpoint chez le mutant *ptc2Δ*.

Pour mieux caractériser l'effet de Glc7 sur l'inactivation des checkpoints de l'ADN, nous avons suivi l'état de phosphorylation de Rad53 (marqueur de l'activité du checkpoint) et la progression dans le cycle des mutants *ptc2Δ* et *ptc2Δ ptc3Δ* surexprimant *GLC7* après cassure HO. Il a été montré au laboratoire qu'après induction de la cassure, Ptc2 et Ptc3 facilitaient la reprise du cycle cellulaire en désactivant le checkpoint probablement en déphosphorylant Rad53 (Leroy et al., 2003). Comme le montre l'analyse par Western-Blot de la figure n°G5, les formes phosphorylées de Rad53 persistent aux temps t=12, 15 et 18h après ajout de galactose chez les délétants *ptc2Δ* et *ptc2Δ ptc3Δ* alors que Rad53 est progressivement déphosphorylée dans la souche sauvage. La surexpression de *GLC7* supprime de façon significative le phénotype de ces mutants puisque les formes phosphorylées de Rad53 disparaissent dès t=12h. Nous avons également suivi la progression dans le cycle par FACS (cf figure n°G5C). A t=9h, la souche sauvage comme le délétant *ptc2Δ* sont bloquées en G2/M. Cependant, les cellules de la souche sauvage adaptent et progressent dans le cycle comme le montre la réapparition de cellules en G1 sur le FACS aux points t=12, 15 et 18h, contrairement aux cellules mutantes qui restent bloquées en G2/M<sup>1</sup>. La surexpression de *GLC7* supprime partiellement le défaut de reprise du cycle des délétants *ptc2Δ* et *ptc2Δ ptc3Δ* (cf figure n°G5C et données non montrées). Ainsi, même si Glc7 a une influence nette sur la déphosphorylation de Rad53, la surexpression de *GLC7* ne complémente pas totalement la délétion de *PTC2*.

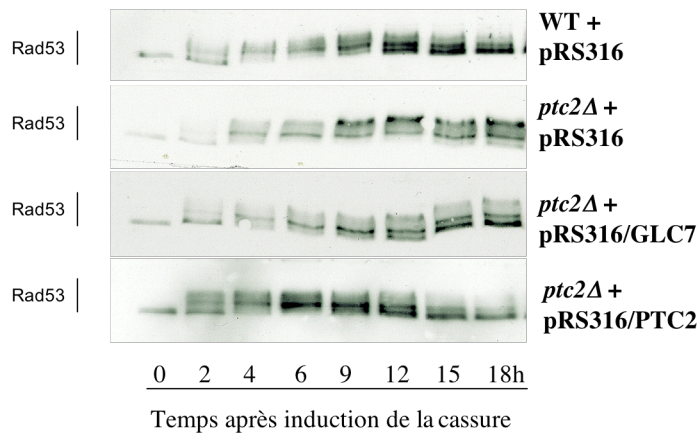
Figure n°G5

A

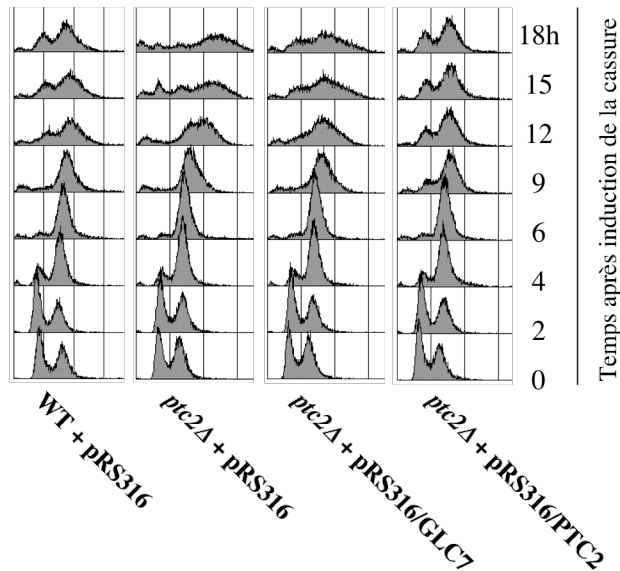


<sup>1</sup> Les petits pics en sub-G1 visibles aux temps t=12, 15 et 18h dans les mutants pourraient être dus à la présence de débris formés lors de la sonication.

B



C



**Effet de la surexpression de *GLC7* sur la phosphorylation de Rad53 et la reprise du cycle chez les mutants *ptc2Δ* et *ptc2Δ ptc3Δ*.**

- A. La souche MCM336 (WT, JKM139) et la souche MCM322 (JKM139 *bar1Δ ptc2Δ ptc3Δ*) portant ou non le plasmide pRS316/GLC7 sont cultivées en milieu liquide contenant du raffinose. On induit l'expression de *HO* en ajoutant du galactose à  $t=0$ . Des aliquots sont prélevés aux temps indiqués après induction et analysés par Western-Blot pour visualiser l'état de phosphorylation de Rad53.
- B. Les souches MCM336 (WT, JKM139) et L195 (JKM139 *ptc2Δ*) portant le plasmide vide pRS316, le plasmide pRS316/GLC7 ou le plasmide pRS316/PTC2 sont analysées par Western-Blot avec un anticorps dirigé contre la protéine Rad53 à différents temps après induction de la cassure HO.
- C. Analyse par FACS des points de la figure n°B.

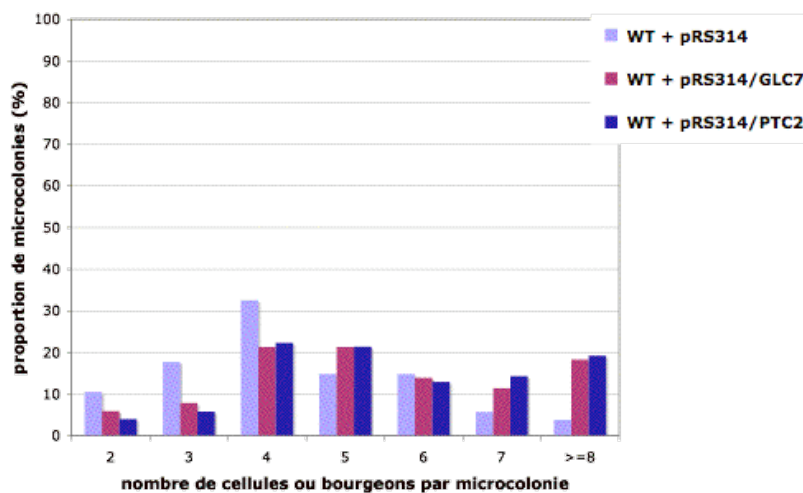
### 2.3. La surexpression de *GLC7* a peu d'effet sur l'adaptation de la souche sauvage.

Après l'étude des mutants d'adaptation, nous avons voulu connaître l'influence de la surexpression de *GLC7* sur l'adaptation de la souche sauvage. Le test d'adaptation présenté figure n°G6A montre que la surexpression de *GLC7* a un léger effet sur la souche sauvage et lui permet de faire environ une division supplémentaire après cassure HO. Cet effet est faible mais reproductible. J'ai en parallèle fait figurer les résultats obtenus avec une surexpression modérée de *PTC2*. Elle aussi permet au sauvage de mieux adapter.

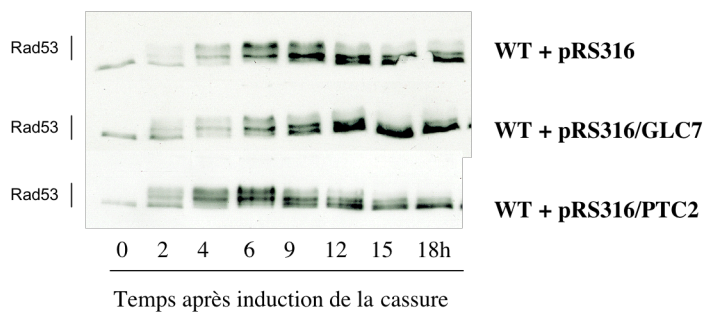
Si l'on suit la phosphorylation de Rad53 après cassure HO, nous observons là aussi un léger effet, visible seulement au point t=9h (cf figure n°G6B). Les formes phosphorylées de Rad53 après induction d'une cassure double-brin migrent sous la forme de 3 bandes. Les deux bandes migrant le moins rapidement sont les formes majoritaires dans le sauvage à t=9h, alors que ce sont les deux bandes migrant le plus rapidement qui le sont si l'on surexprime *GLC7* ou *PTC2*. De même, sur les FACS (cf figure n°G6C), il semble qu'au point t=9h, la proportion de cellules en G1 soit un peu plus importante si l'on surexprime *GLC7* ou *PTC2*, suggérant une reprise un peu plus rapide du cycle.

Figure n°G6

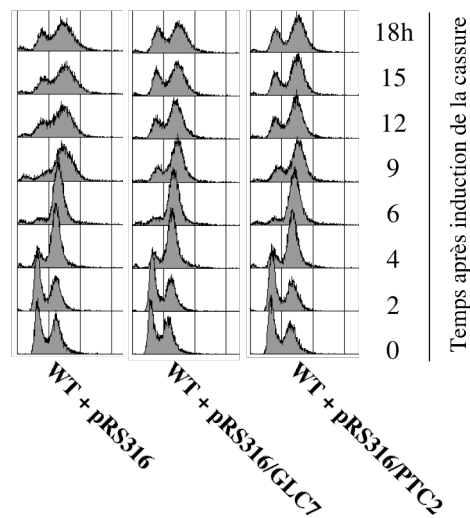
A



B



C



**Effet de la surexpression de *GLC7* sur l'adaptation chez la souche sauvage.**

- A. Test d'adaptation effectué sur la souche MCM336 (WT, JKM139) portant le plasmide vide pRS314, le plasmide pRS314/*GLC7* ou le plasmide pRS314/*PTC2*.
- B. La souche L72 (WT, JKM139 *CHK1-myc*) portant le plasmide vide pRS316, le plasmide pRS316/*GLC7* ou le plasmide pRS316/*PTC2* est analysée par Western-Blot à différents temps après induction de la cassure HO pour suivre l'état de phosphorylation de Rad53.
- C. Analyse par FACS des points de la figure n°B.

## 2.4. Quelques hypothèses

Plusieurs mécanismes pourraient expliquer les effets de la surexpression de *GLC7* sur l'adaptation.

- *Glc7* pourrait être directement impliquée dans le phénomène d'adaptation. Un effet plus important sur la souche sauvage aurait permis de conforter cette idée. Toutefois, nous n'avons pu étudier que l'effet d'une surexpression modérée de *GLC7* (via un plasmide centromérique) puisqu'une forte surexpression est délétère. Ceci pourrait expliquer que nous ayons des difficultés à observer une influence de *Glc7* dans un contexte sauvage. Un rôle direct sur la kinase Rad53 est possible et permettrait d'expliquer l'ensemble des phénotypes observés. En effet, comme nous l'avons vu en introduction, la désactivation de Rad53 semble être nécessaire et suffisante pour l'adaptation. Pour conforter l'idée d'une implication spécifique de *Glc7* dans le processus d'adaptation nous pourrions étudier l'effet de la surexpression de *GLC7* dans d'autres contextes d'adaptation, par exemple, en utilisant le mutant *cdc13-1* à température restrictive.
- Il a été montré que Rad53 n'était pas phosphorylée après induction de la cassure HO si

les cellules sont en G1 (plus précisément, si elles sont bloquées par de l' $\alpha$ -facteur) (Ira et al., 2004; Pelliccioli et al., 2001). Il est donc possible que la déphosphorylation de Rad53 ne soit qu'une conséquence secondaire d'une sortie de mitose prématurée induite par la surexpression de *GLC7*. Ainsi, Glc7 pourrait être une cible du checkpoint de l'ADN, qui la réprimerait pour bloquer le cycle, ou elle pourrait plus simplement être impliquée dans le mécanisme de sortie de mitose. Il faudrait toutefois vérifier que la sortie de mitose peut bien être à l'origine de la déphosphorylation de Rad53 dans notre expérience, par exemple en mutant les protéines cibles nécessaires à l'arrêt après un stress génotoxique.

- Nous ne pouvons exclure un effet aspécifique sur la cascade de protéines phosphorylées que constitue le checkpoint.

### **2.5. La surexpression de *GLC7* améliore le rétablissement du mutant *ptc2* $\Delta$ .**

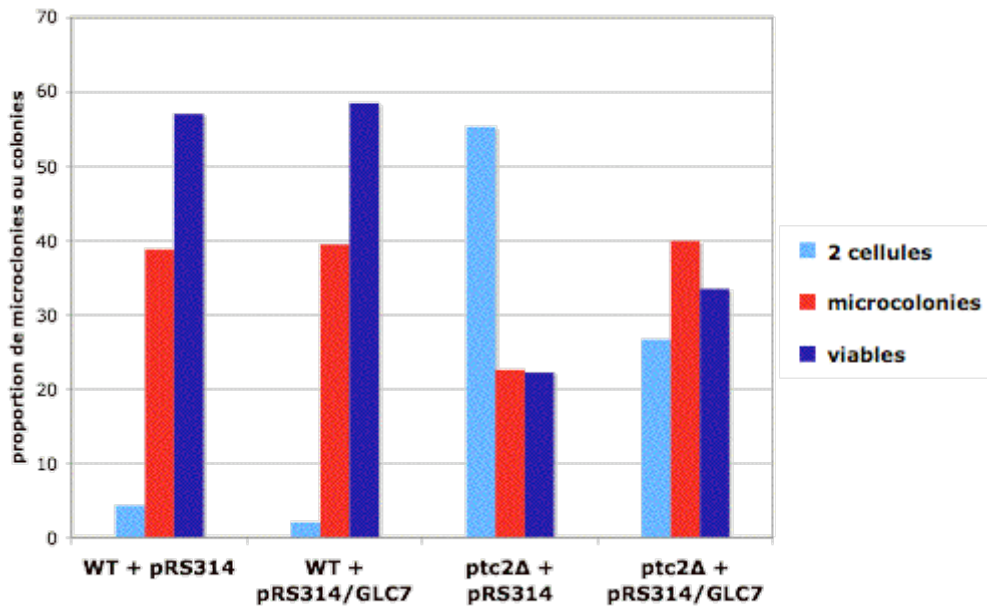
Il semble intéressant de savoir si la surexpression de *GLC7* a un effet sur le phénomène de rétablissement. Le cas échéant, cela conforterait l'idée d'une implication de Glc7 dans l'inactivation des mécanismes de surveillance de l'ADN de façon plus globale. Il a été montré que *Ptc2* intervenait à la fois dans le rétablissement et l'adaptation (Leroy et al., 2003). La désactivation de Rad53 semble donc être nécessaire aux deux phénomènes. Le rétablissement est étudié dans la souche YMV2 où l'on peut induire une unique cassure double-brin via l'expression de l'endonucléase HO, cette cassure pouvant être réparée par SSA (cf figure n°I13). Les deux séquences homologues permettant cette réparation ont été placées relativement loin l'une de l'autre pour qu'une quantité suffisante de simple-brin soit formée (résection des extrémités pendant 6 à 8 heures) et que le checkpoint soit activé (Vaze et al., 2002). Cette souche est cultivée la nuit dans un milieu contenant du raffinose, puis du galactose est ajouté dans le milieu de culture pour induire la lésion. Le checkpoint est activé et les cellules se synchronisent en G2/M. Six heures après l'addition de galactose, on « spotte » les cellules sur un milieu contenant du galactose, puis on incube à 30°C. Les cellules qui n'ont pu reprendre leur progression dans le cycle forment des microcolonies comportant seulement deux cellules. Celles qui ont réparé la lésion et ont désactivé le checkpoint sans difficulté forment des colonies viables. D'autres encore qui connaissent peut-être des problèmes de réparation repartent dans le cycle mais meurent après quelques divisions et forment des microcolonies de 3 à quelques dizaines de cellules. Pour évaluer la capacité de rétablissement, on comptabilise au microscope les proportions de cellules pour ces trois catégories.

La figure n°G7 montre que la surexpression de *GLC7* à l'aide d'un plasmide centromérique n'influence pas le rétablissement d'une souche sauvage après cassure HO. Plus de 50% des cellules arrivent à former une colonie viable. Comme attendu, le mutant *ptc2* $\Delta$  montre un défaut de rétablissement puisque la majorité des cellules restent bloquées en G2/M. Il a été montré que ce défaut n'était pas dû à un défaut de réparation de la lésion mais plutôt à un défaut d'inactivation du checkpoint (Leroy et al., 2003). La surexpression de *GLC7* fait chuter de moitié la proportion de cellules restant en G2/M dans ce mutant au profit des microcolonies comme des colonies viables (cf figure n°G7).

Ces résultats sont similaires à ceux obtenus pour le phénomène d'adaptation, avec une influence quasi-nulle de la surexpression de *GLC7* sur le sauvage et une amélioration partielle du

phénotype du mutant *ptc2Δ*.

Figure n°G7



**Effet de la surexpression de *GLC7* sur le rétablissement.**

Les souches MCM338 (WT, YMV2) et MCM339 (YMV2 *ptc2Δ*) portant le plasmide vide pRS314 ou le plasmide pRS314/*GLC7* sont cultivées en milieu liquide contenant du raffinose. On induit l'expression de *HO* en ajoutant du galactose. Six heures après induction, un aliquot de cellules est soniqué et «spotté» sur un milieu contenant du galactose. On comptabilise les proportions de cellules restées bloquées en G2/M («2 cellules»), de cellules ayant pu effectuer quelques divisions («microcolonies») et de cellules ayant donné naissance à des colonies viables («viables») après 24 heures d'incubation à 30°C. Ces proportions sont reportées sur l'histogramme.

## 2.6. La phosphorylation de *Rad53* après cassure *HO* est prolongée lors de l'extinction de l'expression de *GLC7*.

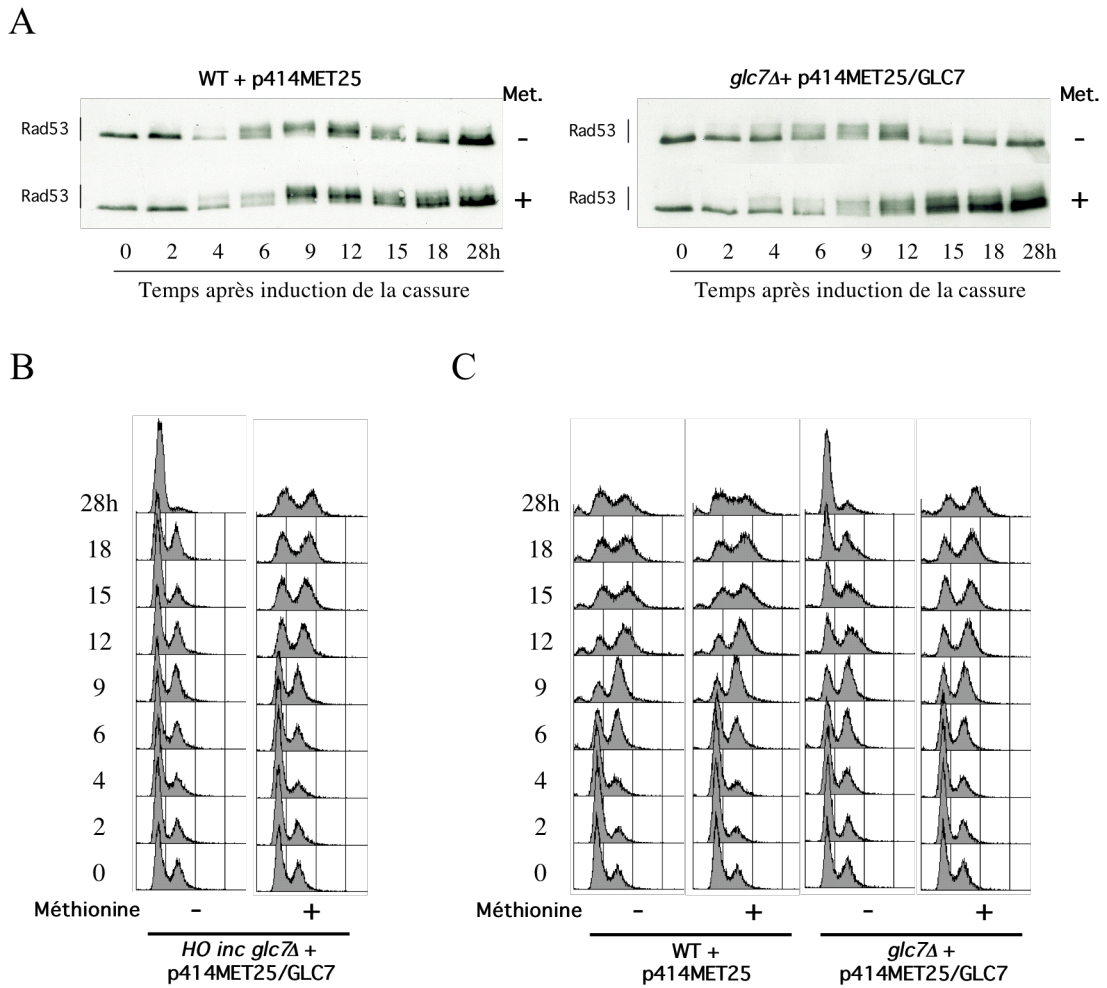
*GLC7* est un gène essentiel. L'étude du délétant est donc impossible. Toutefois, pour tenter de confirmer les résultats obtenus avec la surexpression de *GLC7*, nous avons testé un système d'extinction de l'expression. Le gène *GLC7* chromosomique a été disrupté dans une souche contenant un plasmide portant le gène *GLC7* sous le contrôle du promoteur *MET25*. Ce promoteur est réprimé en présence de méthionine. Cette souche n'est viable qu'à 75% en absence de méthionine et ne forme aucune colonie viable en présence de méthionine, les cellules mourant sous la forme de microcolonies comportant jusqu'à 30 cellules.

Comme le montre la figure n°G8A, après induction de la cassure double-brin, la phosphorylation de *Rad53* semble persister plus longtemps chez le mutant *glc7Δ* portant le plasmide p414MET25/*GLC7* si l'expérience a lieu en présence de méthionine, donc en absence de *Glc7*. Ce résultat est cohérent avec les données obtenues avec la surexpression de *GLC7* et semble indiquer que *Glc7* est nécessaire à la déphosphorylation de *Rad53* après une cassure



double-brin dans un contexte sauvage.

Figure n°G8



**Effet de la déplétion en *Glc7* sur la phosphorylation de Rad53 et la reprise du cycle après cassure HO.**

- A. Les souches MCM336 (WT, JKM139) et L54 (JKM139 *glc7Δ*) portant le plasmide vide p414MET25 ou le plasmide p414MET25/GLC7 sont cultivées en milieu liquide contenant du raffinose. On induit l'expression de *HO* en ajoutant du galactose à  $t=0$  et on ajoute ou non en même temps de la méthionine. Des aliquots sont prélevés aux temps indiqués après induction de la coupure et analysés par Western-Blot avec un anticorps dirigé contre la protéine Rad53.
- B. La souche L262 (JKM139 *HO inc glc7Δ*) portant le plasmide p414MET25/GLC7 est cultivée en milieu liquide contenant du raffinose. On ajoute à  $t=0$  du galactose dans le milieu de culture. Des aliquots sont prélevés aux temps indiqués après addition de galactose et analysés par FACS.
- C. Analyse par FACS des points de la figure n°A.

Il a été vérifié que la déplétion en *Glc7* n'induisait pas une hyperphosphorylation de Rad53 en absence de cassure HO (données non montrées). Pour cela, nous avons utilisé une souche, issue de la souche JKM139, dont le site HO est muté (« *HO inc* ») et n'est plus coupé par l'endonucléase. Cette souche ne forme plus de cassure double-brin en présence de galactose.

Nous avons utilisé les mêmes conditions de culture que lors d'un test d'adaptation (soit une transition raffinose/ galactose mais cette fois en milieu minimum) afin de pouvoir la comparer aisément avec une souche subissant la cassure. Nous avons également testé si la déplétion en Glc7 a une influence sur le cycle en absence de stress. Le résultat est présenté sur la figure n°G8B. Après 28 heures en présence de méthionine, le profil du FACS montre toujours deux pics de taille équivalente, caractéristiques de deux populations, une en G1 et une autre en G2/M. Notre système d'extinction de l'expression ne semble donc pas induire de blocage dans une phase particulière du cycle, notamment en G2/M. Après induction de la cassure double-brin, la souche sauvage portant un plasmide vide se synchronise mal en G2/M, probablement à cause du recours au milieu minimum pour cette expérience (cf figure n°G8C). La souche *glc7Δ* + p414MET25/GLC7 cultivée en absence de méthionine semble s'arrêter encore moins bien. Ceci est peut-être dû à une surexpression légère de *GLC7* par rapport à la souche sauvage qui entraîne une reprise un peu plus rapide du cycle. La souche *glc7Δ* + p414MET25/GLC7 cultivée en présence de méthionine montre un profil similaire à celui obtenu avec la souche *HO inc glc7Δ* + p414MET25/GLC7, c'est-à-dire en absence de coupure. Ceci suggère que l'absence de Glc7 affecte le cycle cellulaire indépendamment de la cassure HO. Les conclusions que l'on peut tirer des profils de FACS sont donc très limitées.

## 2.7. Etude avec la camptothécine

Les mutants *ptc2Δ* et *ptc3Δ* ne sont pas hypersensibles à la plupart des stress génotoxiques, y compris les rayons  $\gamma$  et la phléomycine qui induisent des cassures double-brin. Cette différence par rapport aux cassures induites par l'endonucléase HO pourrait être due à l'hétérogénéité des lésions formées après traitement par des agents exogènes. En effet, les délétions de *PTC2* et *PTC3* pourraient ne modifier que la viabilité des cellules dont l'inactivation des checkpoints constitue le facteur limitant pour la survie. En particulier, Ptc2 et Ptc3 pourraient n'affecter ni la viabilité de cellules ayant subi peu ou pas de dommages et dont les checkpoints ne sont que peu ou pas activés, ni la viabilité de cellules ayant subi des lésions intrinsèquement létales et qui mourront indépendamment de l'inactivation de leurs checkpoints. La proportion de cellules subissant un stress génotoxique exogène dont la survie est conditionnée par la fonctionnalité de Ptc2 et Ptc3 pourrait donc être suffisamment faible pour que l'effet de Ptc2 et Ptc3 ne soit pas statistiquement détectable. Par ailleurs, il est possible que Ptc2 et Ptc3 ne soient nécessaires à la déphosphorylation de Rad53 et à la désactivation du checkpoint que suite à certains types de dommages de l'ADN, puisque les sites de phosphorylation de Rad53 dépendent du type de stress génotoxique (Smolka et al., 2005; Sweeney et al., 2005).

Anne Peyroche a montré au laboratoire que les mutants *ptc2Δ* et *ptc2Δ ptc3Δ* sont hypersensibles au MMS et à la camptothécine, agent anti-tumoral qui agit via son interaction avec la topoisomérase I. La topoisomérase I est une enzyme qui régule le niveau de surenroulement de la molécule d'ADN. Elle clive l'un des deux brins puis établit une liaison covalente temporaire avec l'extrémité 3' de la cassure. Elle catalyse ensuite la relaxation positive ou négative de l'ADN surenroulé et la religation du brin cassé. La camptothécine stabilise de façon spécifique et irréversible le complexe formé par la topoisomérase I et l'ADN. Lorsque la topoisomérase a coupé l'un des deux brins, la camptothécine se fixe sur ce complexe et inhibe l'étape de religation, stabilisant ainsi la cassure simple-brin. Le passage d'une fourche de réplication au niveau de ce complexe ternaire conduit à la formation d'une cassure double-brin, ce qui explique que les cellules déficientes pour la réparation des cassures double-brin de l'ADN

(comme les mutants *rad52Δ*) soient hypersensibles à la camptothécine (Knab et al., 1993).

Nous avons retrouvé le phénotype d'hypersensibilité à la camptothécine des mutants *ptc2Δ* et *ptc2Δ ptc3Δ* dans notre fond génétique (cf figures n°G9A, G9B et données non montrées). Nous avons voulu savoir si cette hypersensibilité pouvait être imputée à un problème de désactivation des checkpoints de l'ADN. Pour cela nous avons suivi la progression du cycle de cellules sauvages et mutantes lors d'un traitement à la camptothécine. Nous avons synchronisé les cellules en G1 avec de l' $\alpha$ -facteur, puis nous les avons relarguées dans un milieu contenant de la camptothécine. De l' $\alpha$ -facteur a été ajouté à nouveau dans le milieu de culture 1h45 après le relargage pour éviter que les cellules ne repartent dans un autre cycle de division.

La figure n°G9C montre qu'en absence de camptothécine le mutant *ptc2Δ ptc3Δ* progresse dans le cycle de manière identique aux cellules sauvages. En cas de traitement continu avec la camptothécine, la souche sauvage montre un arrêt du cycle qui persiste pendant environ 4 heures pour la dose utilisée (cf figures n°G9C et G9E). Le mutant *ptc2Δ ptc3Δ* s'arrête également en G2/M avec une cinétique similaire à celle de la souche sauvage (cf figure n°G9C). Par contre, il montre un défaut de reprise du cycle. En effet, même 6h30 après le relargage, seule la moitié des cellules sont sorties de mitose et se sont réaccumulées en G1 (cf figure n°G9E). Rad53 est phosphorylée suite à un traitement à la camptothécine et des formes de la protéine migrant moins rapidement sont détectables par Western-Blot comme on peut le voir sur la figure n°G9D. Nous avons suivi l'état de phosphorylation de Rad53 en parallèle de l'étude du cycle. Nous observons une disparition des formes phosphorylées de Rad53 concomitante à la réaccumulation de cellules en G1 dans la souche sauvage. Par contre, Rad53 reste phosphorylée chez le mutant *ptc2Δ ptc3Δ* même 6h30 après relargage de l' $\alpha$ -facteur (cf figure n°G9D). Ces données suggèrent que le mutant *ptc2Δ ptc3Δ* n'arrive pas à désactiver le checkpoint après un traitement à la camptothécine.

Il a été montré au laboratoire que Ptc2 devait être phosphorylée sur la thréonine 376 pour interagir avec Rad53 et que cette phosphorylation était essentielle pour le rôle de Ptc2 dans l'inactivation des checkpoints de l'ADN suite à une cassure double-brin. En effet, la mutation de cette thréonine en alanine induit des défauts d'adaptation et de rétablissement comparables à ceux du mutant *ptc2Δ* (Guillemain et al., 2007). La thréonine 376 de Ptc2 semble être aussi importante pour la réponse à la camptothécine. En effet, un plasmide portant le gène *PTC2* muté (T376A) ne restaure pas la viabilité d'un mutant *ptc2Δ* en présence de camptothécine contrairement à un plasmide portant le gène *PTC2* sauvage (cf figure n°G9A). Nous avons par ailleurs observé que la souche *ptc2Δ ptc3Δ* portant le plasmide pRS316/*PTC2*-T376A présentait un défaut de déphosphorylation de Rad53 comparable à celui du mutant *ptc2Δ ptc3Δ* portant le plasmide (données non montrées). Un défaut de déphosphorylation de Rad53 par Ptc2 pourrait donc être la cause commune de l'hypersensibilité à la camptothécine et du défaut de rétablissement après une cassure HO du mutant *ptc2Δ*.

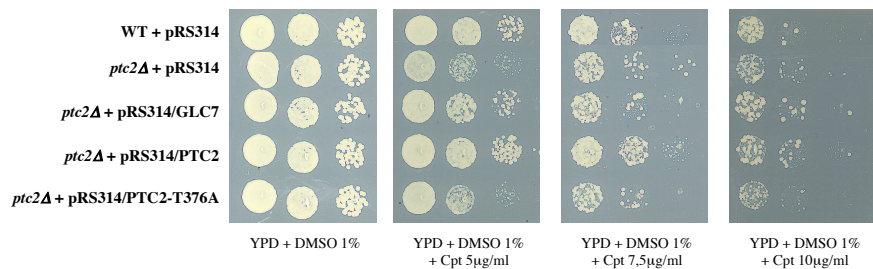
Glc7 étant impliquée dans la désactivation du checkpoint après cassure HO chez les mutants *ptc2Δ* et *ptc2Δ ptc3Δ*, nous avons testé son influence sur ces mutants lors d'un traitement à la camptothécine. Comme le montrent les figures n°G9A et G9B, la surexpression de *GLC7* supprime partiellement l'hypersensibilité du mutant *ptc2Δ* à la camptothécine. L'effet n'est pas aussi fort que celui induit par la surexpression de *PTC2* et rappelle le phénotype intermédiaire obtenu lors des tests d'adaptation après cassure HO. Par ailleurs, lors d'un traitement continu à la camptothécine, la présence du plasmide pRS316/*GLC7* accélère la reprise du cycle du mutant

*ptc2Δ ptc3Δ* et supprime son défaut de déphosphorylation de Rad53 (cf figures n°G9D et G9E). Rad53 semble même être déphosphorylée de façon plus rapide si l'on surexprime *GLC7* que si l'on surexprime *PTC2* puisque les formes phosphorylées de Rad53 ne sont pratiquement plus visibles à t=5h et t=5h30 après relargage dans cette souche (cf figure n°G9D).

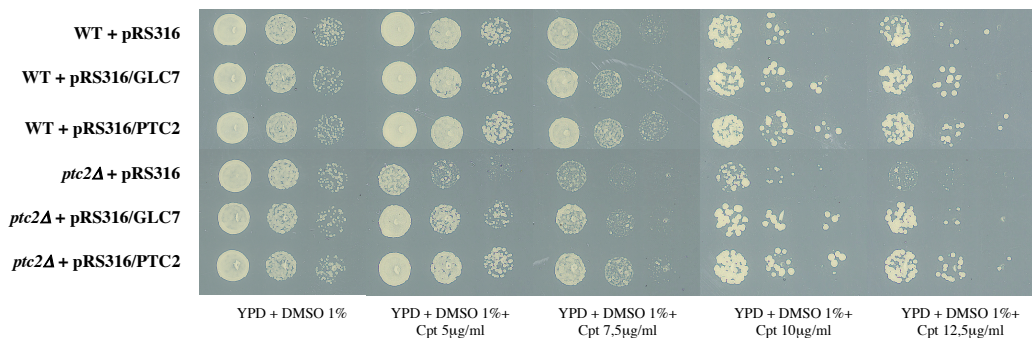
Nous retrouvons donc ici des résultats analogues à ceux obtenus après activation du checkpoint par une cassure double-brin, la surexpression de *GLC7* supprimant au moins partiellement les défauts du mutant *ptc2Δ*. L'étude de la réponse à la camptothécine nous permet ainsi de renforcer l'idée d'une implication générale de Glc7 dans les mécanismes d'inactivation des checkpoints de l'ADN.

Figure n°G9

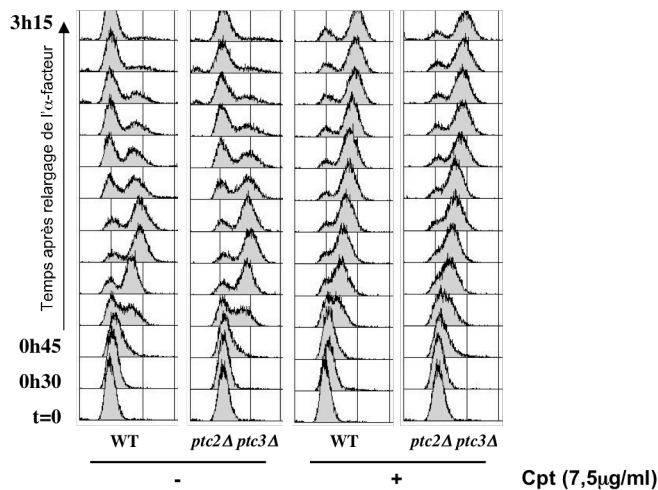
A



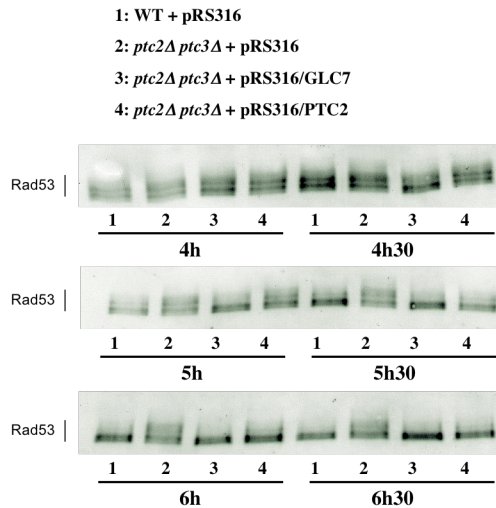
B



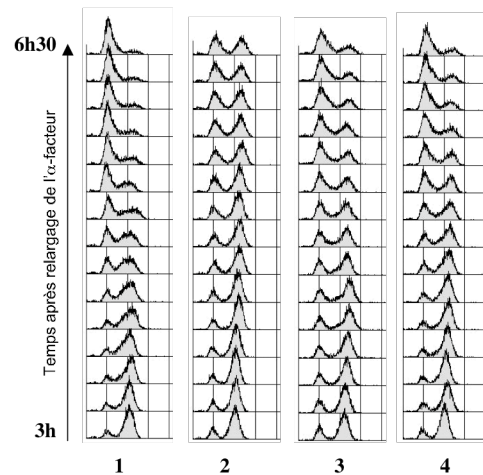
C



D



E



**Influence de la surexpression de *GLC7* sur la réponse à la camptothécine chez le mutant *ptc2Δ*.**

- A. La sensibilité des souches MCM336 (WT, JKM139), L195 (JKM139 *ptc2Δ*) portant le plasmide vide pRS314, le plasmide pRS314/GLC7, le plasmide pRS314/PTC2 ou le plasmide pRS314/PTC2-T376A est testée pour différentes concentrations de camptothécine. Des dilutions sérielles au 1/10 de cultures en phase exponentielle sont «spottées» sur les milieux indiqués puis incubées à 30°C. Elles sont examinées 2 à 3 jours plus tard.
- B. La sensibilité des souches MCM336 (WT, JKM139) et L196 (JKM139 *ptc2Δ*) portant le plasmide vide pRS316, le plasmide pRS316/GLC7 ou le plasmide pRS316/PTC2 est testée pour différentes concentrations de camptothécine. Des dilutions sérielles au 1/10 de cultures en phase exponentielle sont «spottées» sur les milieux indiqués puis incubées à 30°C. Elles sont examinées 2 à 3 jours plus tard.
- C. Les souches MCM261 (WT, JKM139 *bar1Δ*) et MCM322 (JKM139 *bar1Δ ptc2Δ ptc3Δ*) sont synchronisées à l'α-facteur, lavées puis relarguées à t=0 en présence ou en absence de camptothécine (7,5μg/ml). Des aliquots sont prélevés aux temps indiqués puis toutes les 15 minutes entre t=0h30 et 3h15 après relargage et analysés par FACS. De l'α-facteur est ajouté à nouveau à t=1h45 afin d'empêcher un nouveau cycle.
- D. Les souches MCM261 (WT, JKM139 *bar1Δ*) et MCM322 (JKM139 *bar1Δ ptc2Δ ptc3Δ*) portant le plasmide vide pRS316, le plasmide pRS316/GLC7 ou le plasmide pRS316/PTC2 sont synchronisées à l'α-facteur, lavées puis relarguées à t=0 en présence de camptothécine (7,5μg/ml). Des aliquots sont prélevés aux temps indiqués après relargage et analysés par Western-Blot avec un anticorps dirigé contre la protéine Rad53. De l'α-facteur est ajouté à nouveau à t=3h30.
- E. Même expérience que pour la figure n°D. Analyse par FACS d'aliquots prélevés toutes les 15 minutes entre t=3h et 6h30 après relargage de l'α-facteur.

**2.8. *Glc7* et *Chk1***

Au cours de notre étude, un article a été publié par N.R.den Elzen et M.J.O'Connell suggérant l'implication d'une des deux PP1c de la levure *Schizosaccharomyces pombe* dans le rétablissement après activation du checkpoint de l'ADN en G2 (den Elzen and O'Connell, 2004). La levure *S. pombe* possède deux gènes codant pour des sous-unités catalytiques de la protéine phosphatase de type 1 : les gènes *sds21<sup>+</sup>* et *dis2<sup>+</sup>*. Les checkpoints des levures *S. cerevisiae* et *S. pombe* possèdent de nombreux points communs mais leur point d'arrêt du cycle en G2/M diffère. En effet, suite à des dommages subis en G2, *S. pombe* inhibe l'entrée en mitose, comme

le font les cellules de mammifères, alors que *S. cerevisiae* bloque le cycle plus tardivement, pendant la mitose, à la transition métaphase/anaphase. Le checkpoint de l'ADN chez *S. pombe* empêche l'entrée en mitose en retardant la déphosphorylation de la tyrosine Y15 de la protéine Cdc2, maintenant ainsi cette cycline-dépendante kinase sous une forme inactive. Cette action est contrôlée par Chk1 via la phosphorylation de deux protéines qui régulent l'état de phosphorylation de ce résidu tyrosine Y15, la kinase Wee1 et la phosphatase Cdc25. Une autre différence importante entre les deux levures réside dans les rôles relatifs de « Chk1 » (Chk1 chez les deux levures) et « Chk2 » (Rad53 chez *S. cerevisiae* et Cds1 chez *S. pombe*). Chk1 a un rôle primordial dans le checkpoint en G2 chez *S. pombe*, alors que son implication chez *S. cerevisiae* est plus faible, la réponse aux dommages étant principalement contrôlée par Rad53 chez la levure bourgeonnante.

Aucun défaut dans un cycle normal n'a été observé en cas de surexpression ou de délétion du gène *dis2*<sup>+</sup>. Par contre, la surexpression de *dis2*<sup>+</sup> rend les cellules hypersensibles à une exposition chronique au MMS ou au 4-NQO même si cette sensibilité est moindre que celles des mutants *chk1Δ* et *rad3-136* (Rad3 est l'homologue d'ATR). Lors d'un traitement au MMS, la surexpression de *dis2*<sup>+</sup> induit aussi un phénotype de catastrophe mitotique (caractérisé par une répartition inégale de l'ADN entre les deux cellules filles et souvent par un septum coupant en deux le noyau) et un léger défaut d'arrêt en G2. Les cellules *dis2Δ* sont également hypersensibles au MMS et au 4-NQO. Après une irradiation UV, elles montrent une entrée en mitose plus tardive que la souche sauvage et un retard concomitant de la déphosphorylation de Chk1. L'arrêt en G2 est dépendant du checkpoint puisqu'il est supprimé si *chk1*<sup>+</sup> est disrupté. Par ailleurs, la délétion de *dis2*<sup>+</sup> ne semble pas avoir d'effet sur l'arrêt en G2 induit artificiellement par la surexpression de *chk1*<sup>+</sup>, arrêt indépendant de l'état de phosphorylation de Chk1 et médié par Cdc25 et Wee1. *In vivo*, la phosphorylation de Chk1 et son activité après irradiation UV sont fortement affectées par la surexpression de *dis2*<sup>+</sup>. Des tests de déphosphorylation *in vitro* suggèrent que Dis2 pourrait déphosphoryler directement Chk1 (den Elzen and O'Connell, 2004). Enfin, il a été montré que la déstabilisation de Chk1 via des mutants thermosensibles après établissement du checkpoint engendrait une fin prématurée de l'arrêt en G2 (Latif et al., 2004). Ces résultats suggèrent que Dis2 intervient dans l'inactivation du checkpoint en G2 et qu'elle pourrait être en partie responsable de la déphosphorylation de Chk1 lors du rétablissement (den Elzen and O'Connell, 2004). Cependant, la surexpression de *dis2*<sup>+</sup> est létale chez les cellules surexprimant *chk1*<sup>+</sup>, ce qui semble être en contradiction avec le modèle proposé. Toutefois, cette surexpression ne semble pas entraîner l'entrée en mitose dans ces cellules (den Elzen and O'Connell, 2004).

Nos résultats avec Glc7 diffèrent légèrement de ceux décrits pour la PP1c Dis2, notamment en ce qui concerne l'influence de la PP1 sur la souche sauvage. En effet, la surexpression de *dis2*<sup>+</sup> ou sa délétion altèrent la sensibilité aux agents génotoxiques et l'arrêt en G2 en cas de stress. La surexpression de *GLC7* par contre n'induit pas d'hypersensibilité à la camptothécine ni au 4-NQO (cf figure n°G9B et données non montrées). Toutefois, la surexpression de *GLC7* influence l'adaptation de la souche sauvage après cassure HO : la reprise du cycle et la déphosphorylation de Rad53 sont légèrement plus rapides et la capacité d'adaptation est légèrement améliorée (cf figure n°G6). Son effet sur la reprise du cycle après un traitement à la camptothécine n'a pas été étudiée. Par ailleurs, nous n'avons pu utiliser qu'un système induisant une surexpression modérée de *GLC7*, puisqu'une forte surexpression de *GLC7* est létale, ce qui pourrait expliquer que nous n'observons pas d'effets importants de la surexpression de *GLC7* sur la souche sauvage. Enfin, nous n'avons pu étudier l'impact de la

délétion de *GLC7* puisqu'il s'agit d'un gène essentiel. Nous avons toutefois montré que la déplétion en *Glc7* engendrait un défaut de déphosphorylation de *Rad53* après cassure HO.

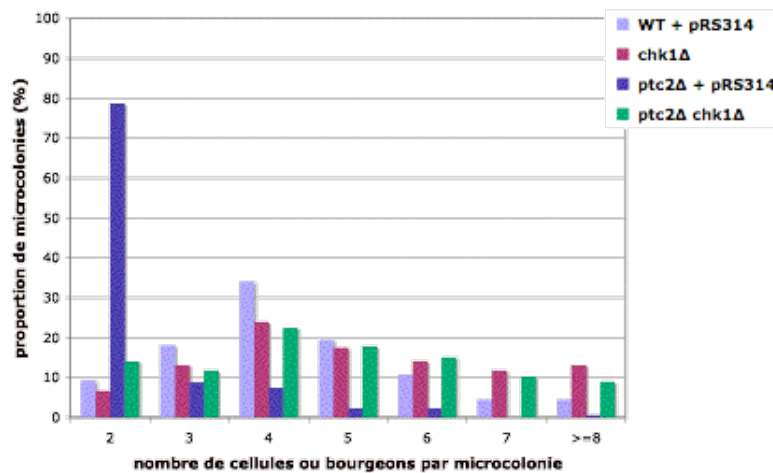
Nous avons donc voulu savoir si l'effet de *Glc7* sur l'inactivation des checkpoints était médié par *Chk1*. Le rôle de *Chk1* dans la réponse aux cassures double-brin et à la camptothécine n'étant pas très bien défini, nous l'avons caractérisé de manière plus précise. Par ailleurs, si *Glc7* agit via *Chk1*, il est envisageable que la délétion de *CHK1* donne des phénotypes plus forts, similaires ou contraires à ceux obtenus avec la surexpression de *GLC7*. Pour ces deux raisons, l'effet de la délétion de *CHK1* sur nos deux systèmes d'étude de l'inactivation des checkpoints a été étudié.

### 2.8.1. Influence de la délétion de *CHK1* sur l'adaptation après une cassure double-brin de l'ADN

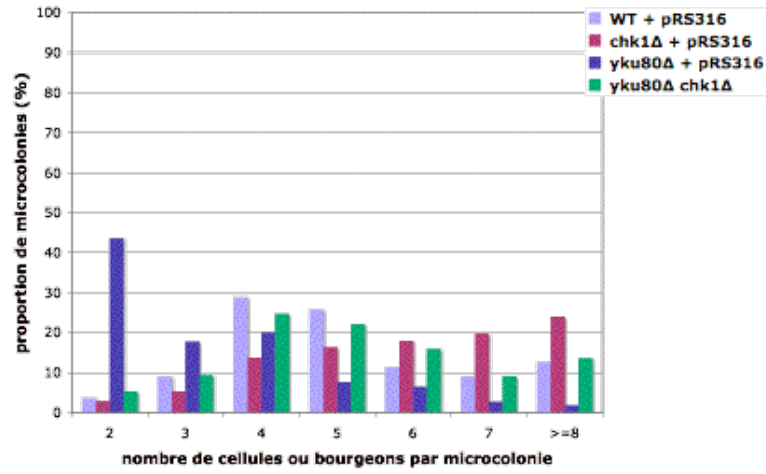
La délétion de *CHK1* supprime clairement les défauts d'adaptation des mutants *ptc2Δ* et *yku80Δ* (cf figures n°G10A et G10B). Les analyses en Western-Blot montrent que *Rad53* est déphosphorylée plus rapidement dans les cellules *ptc2Δ chk1Δ* que dans les cellules *ptc2Δ* (cf figure n°G10C), et l'analyse par FACS confirme que les mutants *ptc2Δ chk1Δ* quittent l'arrêt en G2/M de façon comparable à la souche sauvage alors que les cellules *ptc2Δ* restent bloquées en G2/M (cf figure n°G10D). La délétion de *CHK1* induit aussi une amélioration légère mais reproductible de la capacité d'adaptation de la souche sauvage (cf figures n°G10A et G10B). La cinétique de déphosphorylation de *Rad53* semble identique dans les cellules sauvages et *chk1Δ* (cf figure n°G10C). Cependant, il m'est arrivé plusieurs fois de constater une différence 9h après induction de la coupure, identique à celle que nous avons constatée pour la surexpression de *GLC7* et l'analyse des données obtenues par FACS indique une reprise légèrement plus rapide du cycle chez le délétant *chk1Δ* (cf figure n°G10D).

Figure n°G10

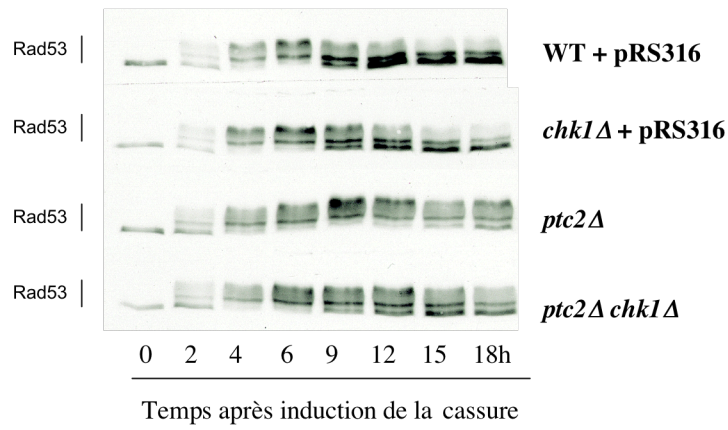
A



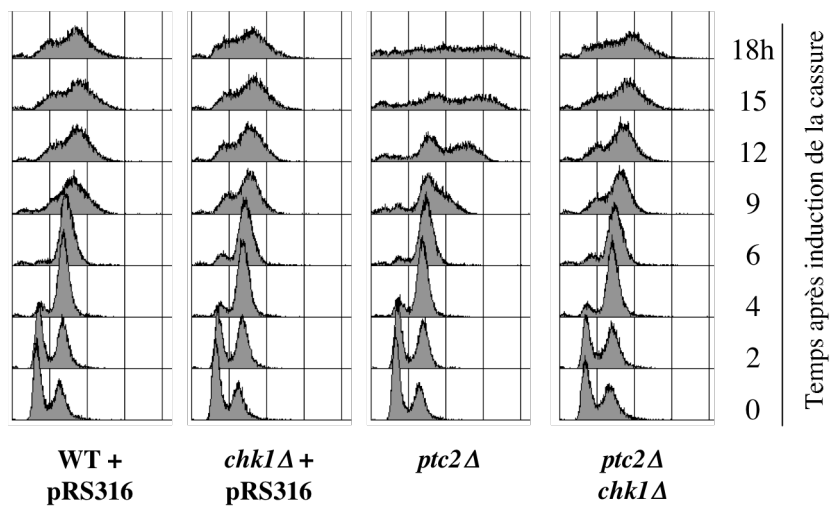
**B**



**C**



**D**





**Influence de la délétion de *CHK1* sur l'adaptation et l'état de phosphorylation de Rad53 après cassure HO.**

- A. Test d'adaptation effectué sur les souches MCM336 (WT, JKM139), L218 (JKM139 *chk1Δ*), L195 (JKM139 *ptc2Δ*) et L220 (JKM139 *ptc2Δ chk1Δ*). Les souches sauvage et *ptc2Δ* portent le plasmide vide pRS314 par souci d'homogénéité des marqueurs d'auxotrophie.
- B. Test d'adaptation effectué sur les souches MCM261 (WT, JKM139 *bar1Δ*), MCM384 (JKM139 *bar1Δ chk1Δ*), MCM263 (JKM139 *bar1Δ yku80Δ*) et L171 (JKM139 *bar1Δ yku80Δ chk1Δ*) portant ou non le plasmide vide pRS316.
- C. Les souches MCM261 (WT, JKM139 *bar1Δ*), MCM384 (JKM139 *bar1Δ chk1Δ*), MCM302 (JKM139 *bar1Δ ptc2Δ*) et L75 (JKM139 *bar1Δ ptc2Δ chk1Δ*) portant ou non le plasmide vide pRS316 sont cultivées en milieu liquide contenant du raffinose. On induit l'expression de *HO* en ajoutant du galactose à  $t=0$ . Des aliquots sont prélevés aux temps indiqués après induction et analysés par Western-Blot avec un anticorps dirigé contre la protéine Rad53.
- D. Analyse par FACS des points de la figure n°C.

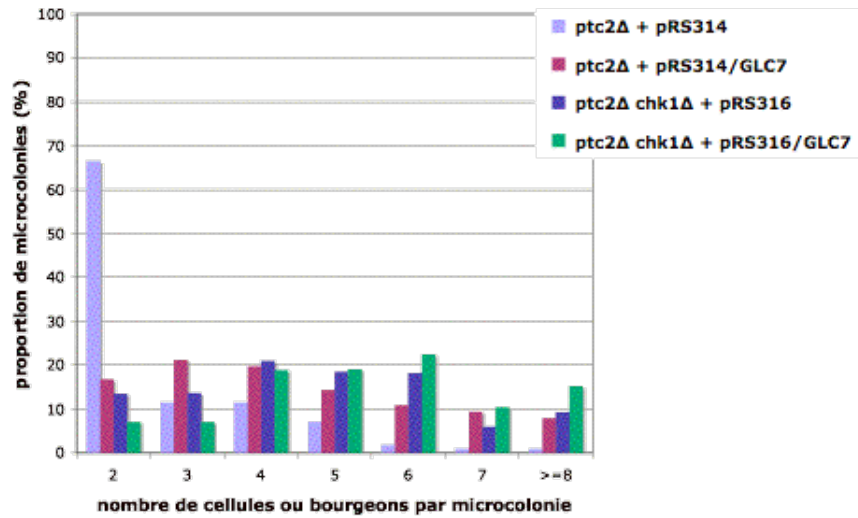
Ainsi, ces données suggèrent que Chk1 est nécessaire au maintien du checkpoint, notamment chez le mutant *ptc2Δ*. Par contre, sa déplétion n'a pas d'incidence sur la mise en place du checkpoint : Rad53 est activée normalement et les cellules se synchronisent bien en G2/M. Ces données diffèrent de celles obtenues chez *Schizosaccharomyces pombe* dans le sens où Chk1 est nécessaire à l'activation du checkpoint dans cet organisme. Cependant, il a aussi été montré chez *S. pombe* que l'inactivation de Chk1, une fois le checkpoint établi, conduisait à la fin prématurée de l'arrêt en G2 et à l'entrée en mitose (Latif et al., 2004). Chk1 semble donc être également nécessaire au maintien du checkpoint chez la levure fissipare. Il faut souligner le fait que chez *S. cerevisiae* la contribution de Chk1 au maintien du checkpoint chez la souche sauvage est faible. Cette fonction a été clairement mise en évidence seulement dans des mutants d'adaptation chez lesquels l'activation du checkpoint persiste anormalement. Ces différences pourraient provenir de l'importance relative de Chk1 dans le mécanisme de surveillance de l'ADN chez les deux levures.

Les phénotypes observés après délétion de *CHK1* ou surexpression de *GLC7* sont similaires. Leurs effets sur la souche sauvage comme sur les mutants d'adaptation sont proches. Nous avons donc testé si l'effet de *Glc7* sur l'inactivation du checkpoint était médié par Chk1, peut-être via une inhibition de Chk1 par *Glc7* lors de l'adaptation.

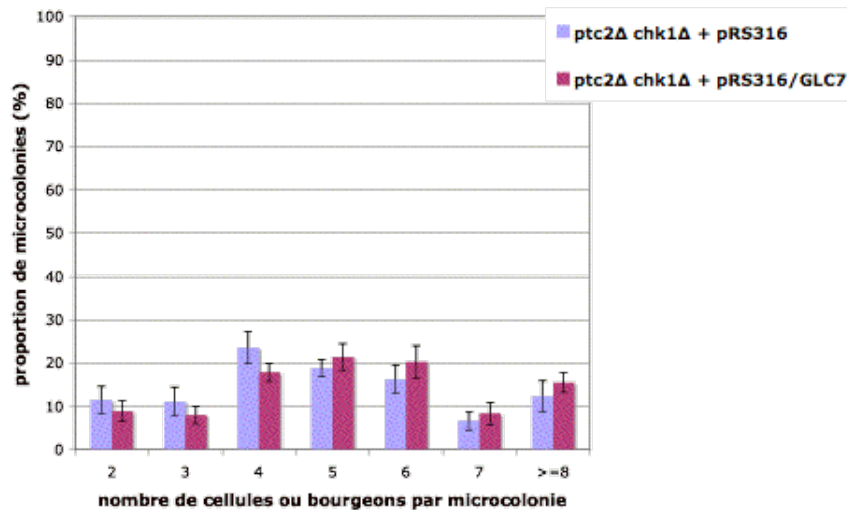
Nous avons tout d'abord essayé de déterminer si les effets observés pour *CHK1* et *GLC7* étaient cumulatifs. L'effet de la délétion de *CHK1* sur le mutant *ptc2Δ* s'est montré de façon reproductible légèrement plus fort que celui de la surexpression de *GLC7* lors des tests d'adaptation, réduisant un peu plus le nombre de cellules restant bloquées de façon permanente en G2/M et permettant aux cellules de faire quelques divisions de plus (cf pour exemple, figure n°G11A). Nous avons donc simplement essayé de comparer la souche *ptc2Δ chk1Δ* portant le plasmide pRS316/*GLC7* à celle portant le plasmide vide. Plusieurs tests ont été effectués, moyennés et sont représentés sur la figure n°G11B. Un léger effet de la surexpression de *GLC7* semble être observé en absence de *CHK1*. Cependant, les barres d'erreur indiquent que l'effet n'est pas très significatif. De toute façon, il est possible que les limites de ce test soient atteintes. L'adaptation ne peut en effet être améliorée indéfiniment. Les conclusions que l'on peut tirer de cet essai reste donc limitées.

Figure n°G11

A



B



**Effets comparés de la surexpression de *GLC7* et de la délétion de *CHK1* sur l'adaptation après cassure HO.**

A. Test d'adaptation effectué sur les souches MCM413 (JKM139 *ptc2Δ*) et L220 (JKM139 *ptc2Δ chk1Δ*) portant un plasmide vide (pRS316 ou pRS314), le plasmide pRS316/GLC7 ou le plasmide pRS314/GLC7. L'histogramme correspond à une expérience représentative.

B. Test d'adaptation effectué sur les souches L220 et L221 (JKM139 *ptc2Δ chk1Δ*) portant le plasmide vide pRS316 ou le plasmide pRS316/GLC7. L'expérience a été faite deux fois sur les deux mutants. La moyenne sur les 4 ensembles de données est représentée sur l'histogramme. Les barres d'erreur correspondent à l'écartype.

### 2.8.2. Influence de la délétion de *CHK1* sur la réponse à la camptothécine

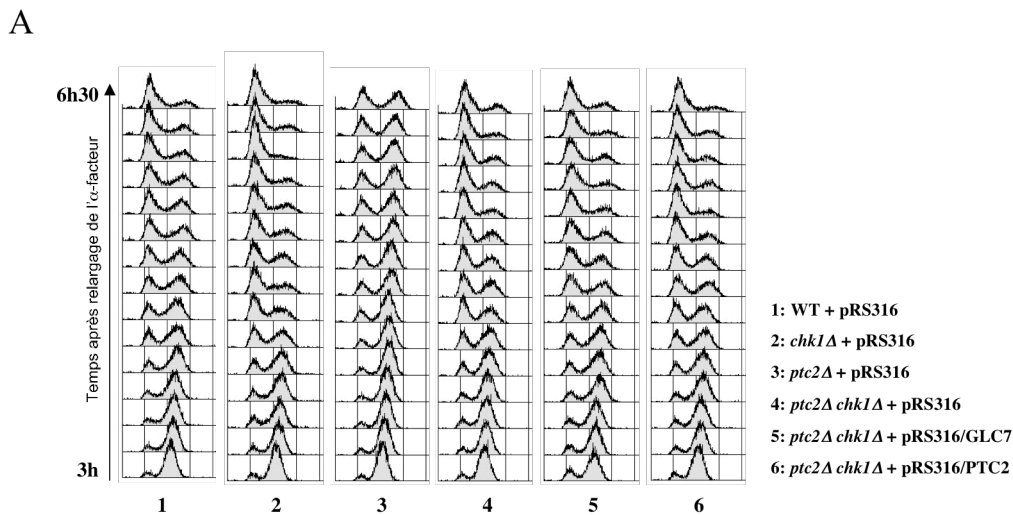
Il a été montré que le mutant *ptc2Δ* présentait une hypersensibilité et un défaut de reprise

du cycle lors d'un traitement à la camptothécine et que ces défauts étaient partiellement supprimés par la surexpression de *GLC7* (cf figure n°G9).

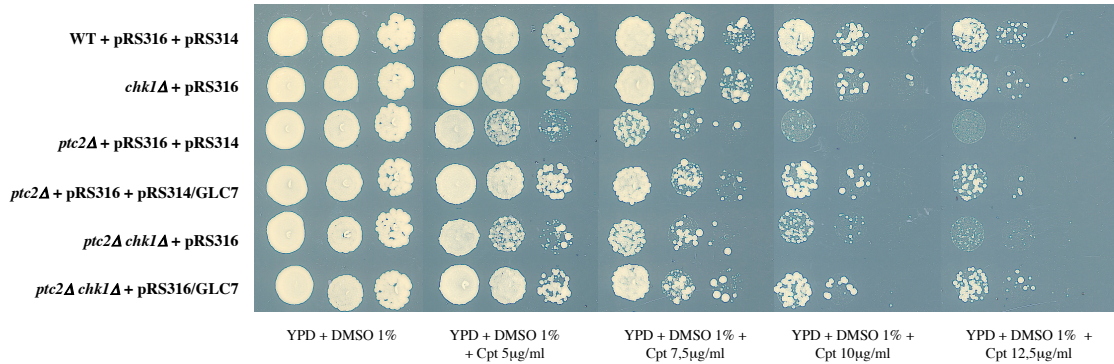
Afin de mieux comprendre les liens éventuels entre *Glc7* et *Chk1*, nous avons en parallèle étudié la réponse à la camptothécine du délétant *chk1Δ*. Au cours d'un traitement à la camptothécine, le mutant *chk1Δ* ne montre pas de défaut d'arrêt du cycle puisque 3 heures après ajout de la drogue dans le milieu de culture, les cellules sont bloquées en G2/M (cf figure n°G12A). La reprise du cycle est toutefois légèrement accélérée chez ce mutant comme on peut le voir entre les temps t=4h30 et t=6h sur la figure n°G12A. La comparaison des profils n°2 et 4 montre que le double mutant *ptc2Δ chk1Δ* se comporte comme le simple mutant *chk1Δ*. L'effet de la délétion de *CHK1* est donc légèrement plus fort que l'effet de la surexpression de *GLC7* sur le mutant *ptc2Δ* puisque la surexpression de *GLC7* ne permettait pas de supprimer totalement le défaut de ce mutant, la réaccumulation des cellules en G1 restant moins rapide que dans la souche sauvage (cf figure n°G9E). La surexpression de *GLC7* ou de *PTC2* chez le mutant *ptc2Δ chk1Δ* n'a pas d'effet visible sur la reprise du cycle au cours d'un traitement à la camptothécine (cf figure n°G12A).

Comme nous l'avons remarqué pour la cassure HO, *Chk1* semble être nécessaire au maintien du checkpoint au cours d'un traitement à la camptothécine. Son implication est encore une fois essentiellement visible chez le mutant *ptc2Δ*. La délétion de *CHK1* montre à nouveau des effets similaires à ceux obtenus après surexpression de *GLC7*. Les effets de *GLC7* et de *CHK1* ne sont pas cumulatifs.

**Figure n°G12**



B


**Effets comparés de la surexpression de *GLC7* et de la délétion de *CHK1* sur la réponse à la camptothécine.**

- A. Les souches L230 (WT, JKM139 *bar1Δ*), L232 (JKM139 *bar1Δ chk1Δ*), L234 (JKM139 *bar1Δ ptc2Δ*) et L236 (JKM139 *bar1Δ ptc2Δ chk1Δ*) portant le plasmide vide pRS316, le plasmide pRS316/GLC7 ou le plasmide pRS316/PTC2 sont synchronisées à l' $\alpha$ -facteur, lavées puis relarguées à t=0 en présence de camptothécine (7,5 $\mu$ g/ml). Des aliquots sont prélevés toutes les 15 minutes entre t=3h et t=6h30 après relargage, et analysés par FACS. De l' $\alpha$ -facteur est ajouté à nouveau à t=3h15.
- B. La sensibilité des souches MCM336 (WT, JKM139), L218 (JKM139 *chk1Δ*), L196 (JKM139 *ptc2Δ*) et L220 (JKM139 *ptc2Δ chk1Δ*) portant un plasmide vide (pRS316 et/ou pRS314), le plasmide pRS316/GLC7 et/ou le plasmide pRS314/GLC7 est testée pour différentes concentrations de camptothécine. Des dilutions sérielles au 1/10 de cultures en phase exponentielle sont «spottées» sur les milieux indiqués puis incubées à 30°C. Elles sont examinées 2 à 3 jours plus tard.

Ces résultats ne sont pas contradictoires avec l'hypothèse d'une inhibition de Chk1 par Glc7 lors de l'inactivation du checkpoint. Cependant, des tests de sensibilité à la camptothécine apportent des éléments d'information différents. Comme nous l'avons déjà souligné, le mutant *ptc2Δ* est hypersensible à la camptothécine et la surexpression de *GLC7* supprime partiellement ce phénotype (cf figures n°G9A et G9B). De façon surprenante, la délétion de *CHK1* ne supprime pas l'hypersensibilité du délétant *ptc2Δ* à la camptothécine (cf figure n°G12B). Le test de sensibilité montre également que la surexpression de la PP1c restaure partiellement la viabilité du double mutant *ptc2Δ chk1Δ* en cas d'exposition prolongée à la camptothécine. Cette suppression est similaire à celle obtenue pour le simple mutant *ptc2Δ* (cf figure n°G12B). Ces résultats montrent que l'effet de *GLC7* sur la sensibilité à la camptothécine du délétant *ptc2Δ* est indépendant de *CHK1*.

Il est surprenant de constater que la suppression du défaut de reprise du cycle chez le mutant *ptc2Δ* par la délétion de *CHK1* ne soit pas accompagné d'une suppression de l'hypersensibilité de ce mutant à une exposition prolongée à la camptothécine en milieu solide. La viabilité est un phénotype assez grossier résultant de la combinaison d'événements multiples. Il est possible que Chk1 ait d'autres fonctions requises pour survivre à ces stress génotoxiques particuliers, ou plus généralement pour survivre à des stress génotoxiques permanents.

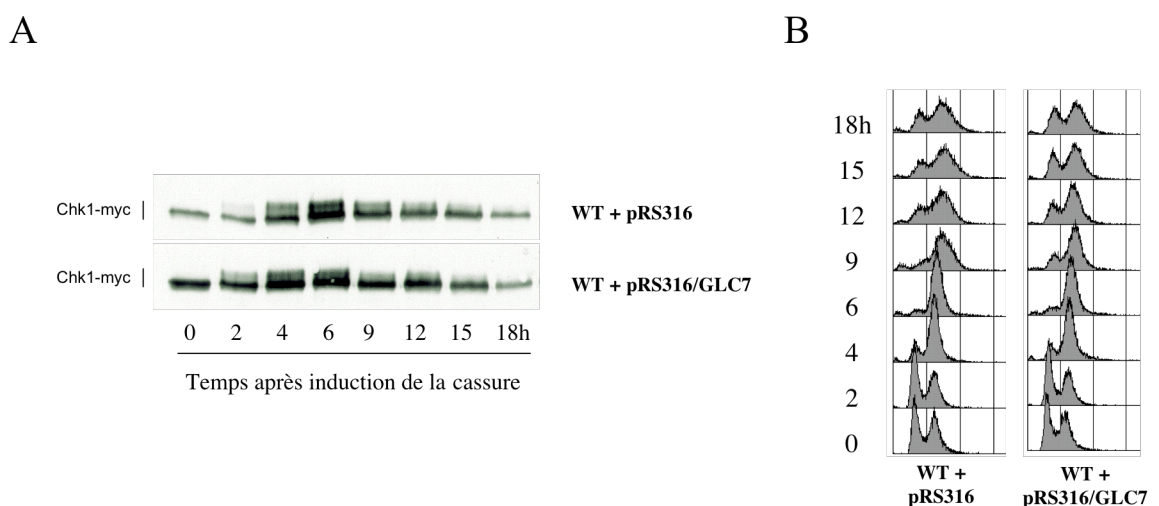
### 2.8.3. *Glc7* et la phosphorylation de *Chk1*

La délétion de *CHK1* semble mimer les effets de la surexpression de *GLC7* après cassure HO et accélère, comme la surexpression de *GLC7*, la reprise du cycle lors d'un traitement à la camptothécine chez le mutant *ptc2Δ ptc3Δ*. Nous avons donc voulu tester plus directement l'hypothèse d'une déphosphorylation de *Chk1* par *Glc7* lors de l'inactivation du checkpoint.

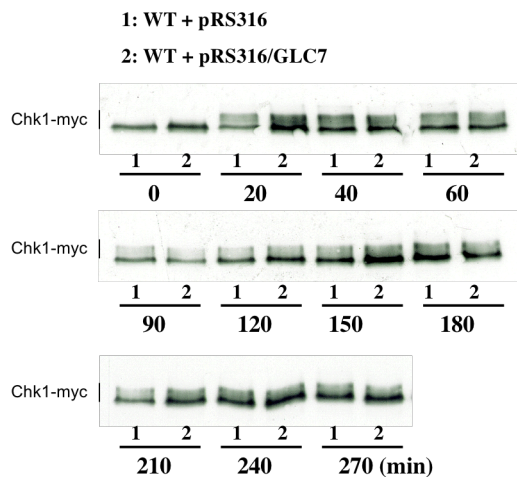
Nous avons ainsi examiné l'influence de la surexpression de *GLC7* sur la phosphorylation de *Chk1* dans une souche sauvage. Nous avons suivi l'état de phosphorylation de la protéine *Chk1-myc* après induction de la cassure HO (cf figure n°G13A). L'ajout du tag ne modifie pas la réponse de la souche au stress génotoxique (cf figure n°G13B et données non montrées). *Chk1-myc* montre une cinétique de phosphorylation similaire à celle de *Rad53* après cassure HO. En effet, des formes phosphorylées de cette protéine sont visibles deux heures après l'induction de la coupure et leur abondance est maximale à  $t=6h$  puis diminue ensuite entre les temps  $t=12h$  et  $t=18h$ . Ces données sont en accord avec celles obtenues par l'équipe de J.Haber (Pelliccioli et al., 2001). La surexpression de *GLC7* ne modifie pas cette cinétique de phosphorylation : les formes phosphorylées de *Chk1* sont toujours aussi abondantes et leur apparition et disparition ne sont pas décalées dans le temps.

Nous avons ensuite testé l'influence de *Glc7* sur la phosphorylation de *Chk1* après une irradiation UV. En effet, comme nous l'avons déjà indiqué, la surexpression de la PP1c *Dis2* de *S. pombe* entraîne une réduction significative de l'abondance des formes phosphorylées de *Chk1* après une irradiation UV (den Elzen and O'Connell, 2004). Nous avons voulu déterminer s'il en était de même chez *S. cerevisiae*. Des cellules en phase exponentielle ont été irradiées avec une dose d'UV égale à  $60 J/m^2$  et l'état de phosphorylation de *Chk1-myc* a été suivi par Western-Blot (cf figure n°G13C). Des formes phosphorylées de *Chk1* sont visibles 20 minutes après irradiation et le sont encore 4 heures plus tard même si elles commencent alors à disparaître. La surexpression de *GLC7* n'induit aucune différence sur cette cinétique de phosphorylation.

Figure n°G13



C



#### Influence de la surexpression de *GLC7* sur l'état de phosphorylation de Chk1.

- A. La souche L72 (WT, JKM139 *CHK1-myc*) portant le plasmide pRS316 ou le plasmide pRS316/GLC7 sont cultivées en milieu liquide contenant du raffinose. On induit l'expression de *HO* en ajoutant du galactose à t=0. Des aliquots sont prélevés aux temps indiqués après induction et analysés par Western-Blot avec un anticorps dirigé contre le tag Myc.
- B. Analyse par FACS des points de la figure n°A.
- C. Des cultures de la souche L73 (WT, JKM139 *CHK1-myc*) portant le plasmide vide pRS316 ou le plasmide pRS316/GLC7, en phase exponentielle, ont été soumises à une irradiation UV (60J/m<sup>2</sup>). Des aliquots sont prélevés aux temps indiqués après irradiation et analysés par Western-Blot avec un anticorps dirigé contre le tag Myc.

Nous avons enfin essayé en vain de mettre en évidence une éventuelle interaction entre Chk1 et Glc7 par trois méthodes différentes (double-hybride, « GST-pulldown », co-immunoprécipitation). Le double-hybride a été étudié sans stress génotoxique. Le « GST-pulldown » a été mené avec des extraits de cellules irradiées ou non aux UV (extraits réalisés sur des cellules 40 min après une irradiation de 60J/m<sup>2</sup>). L'interaction en co-immunoprécipitation a été testée avec des cellules non stressées en phase exponentielle, avec des cellules prélevées 30 minutes après une irradiation UV de 90 J/m<sup>2</sup> et avec des cellules prélevées 4h et 8h après induction de la cassure HO. Il est toutefois possible que nous n'ayons pas trouvé les conditions nécessaires à la détection de cette interaction.

#### 2.8.4. Conclusion

Rien ne nous permet d'affirmer que Glc7 agit sur la désactivation du checkpoint de l'ADN en G2/M via Chk1. Il est vrai que la délétion de *CHK1* mime de nombreux phénotypes obtenus en surexprimant *GLC7*, que ce soit après une cassure HO ou après un traitement à la camptothécine. Cependant, l'absence d'influence de Glc7 sur la cinétique de phosphorylation de Chk1 après un stress génotoxique et l'indépendance des effets de Glc7 par rapport à *CHK1* pour les tests de sensibilité à la camptothécine semblent contredire l'hypothèse d'une déphosphorylation directe de Chk1 par Glc7. La surexpression de *GLC7* et la délétion de *CHK1* entraînant toutes deux une reprise plus rapide du cycle au cours d'un traitement à la

camptothécine chez le mutant *ptc2Δ*, il est surprenant qu'elles n'induisent pas le même phénotype chez ce mutant lors du test de sensibilité à la camptothécine. Pour essayer de mieux comprendre cette différence, nous avons analysé la phosphorylation de Rad53 dans des cellules étalées sur du milieu solide contenant de la camptothécine (à une concentration finale de 7,5 µg/ml) et incubées à 30°C pendant 1, 2 ou 3 jours. On remarque une plus forte abondance des formes phosphorylées de Rad53 chez le mutant *ptc2Δ ptc3Δ* que chez la souche sauvage notamment après 48 heures (données non montrées). Les surexpressions de *GLC7* ou de *PTC2* dans ce mutant n'ont pas les mêmes conséquences : la surexpression de *PTC2* permet de retrouver le phénotype sauvage, alors que les formes phosphorylées de Rad53 sont aussi abondantes après 48 heures chez le mutant *ptc2Δ ptc3Δ*, qu'il surexprime ou non *GLC7*. Cette expérience n'a été effectuée qu'une seule fois et le résultat obtenu doit donc être pris avec précaution. Cela suggère toutefois que les expériences de viabilité sur 2 ou 3 jours et les expériences sur la réponse à la camptothécine sur un cycle cellulaire ne sont pas facilement corrélables.

## 2.9. *Glc7* et *Mad2*

Nous avons vu que la surexpression ou des mutations de *GLC7* entraînent des défauts de ségrégation de chromosomes (perte ou gain de chromosomes). La littérature tend à montrer que *Glc7* antagoniserait les fonctions mitotiques d'Ipl1 et notamment celle concernant la régulation des interactions kinétochores/microtubules, ce qui pourrait expliquer ces phénotypes. Les mutants *glc7* semblent en effet être défectueux pour l'établissement des connexions kinétochores/microtubules *in vitro* et montrent des interactions génétiques avec des mutants de la protéine kinase Aurora et des mutants du complexe DASH. De plus, *Glc7* influe sur la phosphorylation de Dam1 et Ndc10, deux protéines ciblées par Ipl1, probablement dans le cadre de sa fonction dans la régulation de la liaison kinétochore/microtubule.

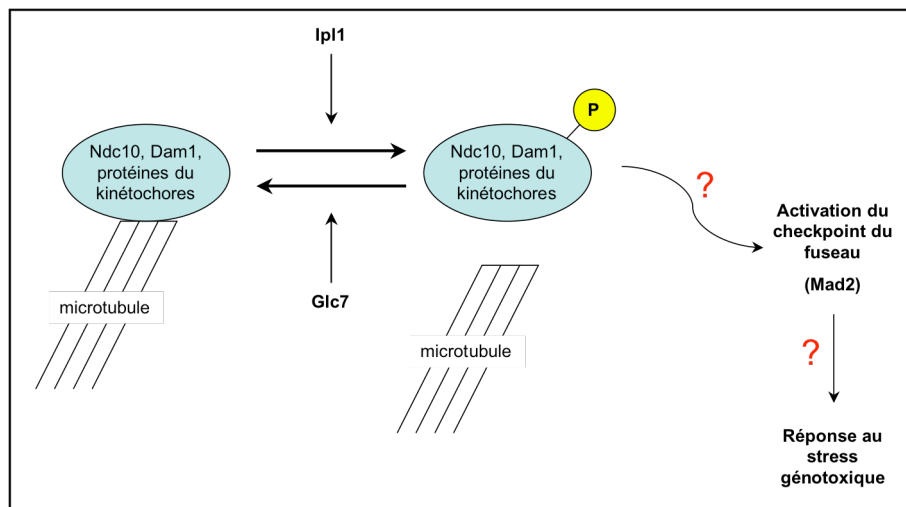
Les données de la littérature suggèrent qu'Ipl1 est sensible à la présence d'un manque de tension au niveau du kinétochore, que ce défaut provienne d'un attachement monopolaire ou pas. En cas de manque de tension, Ipl1 phosphorylerait des cibles au niveau du kinétochore, promouvant ainsi le décrochage du microtubule du kinétochore, afin de favoriser un nouvel attachement correct. La persistance de kinétochores non attachés en mitose conduirait à l'activation du checkpoint du fuseau. Ceci pourrait expliquer pourquoi Ipl1 est nécessaire à la stabilisation de Pds1 dans les souches déplétées en Cdc6 ou chez les mutants de la cohésine *mcd1-1*. Une implication plus directe d'Ipl1 dans le checkpoint du fuseau ne peut être pour autant exclue. Inversement, de nombreuses mutations de *GLC7* induisent un arrêt en G2/M. Il a été démontré que cet arrêt était dépendant du checkpoint du fuseau pour deux de ces allèles. Il est envisageable que ces arrêts en G2/M soient causés par la présence de kinétochores mal ou non attachés.

Il est possible que la surexpression de *GLC7* affaiblisse le checkpoint du fuseau et empêche son activation, notamment en cas de manque de tension au niveau du kinétochore. Les déphosphorylations engendrées par la surexpression de *GLC7* au niveau du kinétochore pourraient de façon plus générale gêner l'activation du mécanisme de surveillance du fuseau. Or, il a été montré que le checkpoint du fuseau participait à l'arrêt résiduel induit par un traitement au MMS à la transition métaphase/anaphase chez le double mutant *rad9Δ rad24Δ* (Garber and Rine, 2002) et à l'arrêt en G2/M induit par une irradiation UV dans un mutant *mec1Δ* (Clerici et al., 2004). En fait, la délétion de *MAD2* affaiblit ces arrêts en G2/M. L'implication des protéines du checkpoint du fuseau dans la réponse aux stress génotoxiques n'a été observée que dans des

cellules possédant un checkpoint de l'ADN défectueux. L'implication du checkpoint du fuseau semble donc indépendante du checkpoint de l'ADN et est possiblement masquée lorsque le checkpoint de l'ADN est fonctionnel.

Nous avons testé l'hypothèse que la surexpression de *GLC7* affaiblisse l'arrêt en G2/M après un stress génotoxique via un effet sur le checkpoint du fuseau. Cette hypothèse est schématisée sur la figure n°G14. Pour cela, nous avons tenté de voir d'une part si la surexpression de *GLC7* influence l'activation ou le maintien du checkpoint du fuseau, et d'autre part si le checkpoint du fuseau est impliqué dans la réponse aux stress génotoxiques dans nos conditions.

Figure n°G14



Hypothèse sur la voie permettant à Glc7 d'influencer l'inactivation des checkpoints de l'ADN.

### 2.9.1. Influence de la délétion de *MAD2* sur la réponse aux stress génotoxiques

#### 2.9.1.1. Influence de la délétion de *MAD2* sur l'adaptation après cassure HO

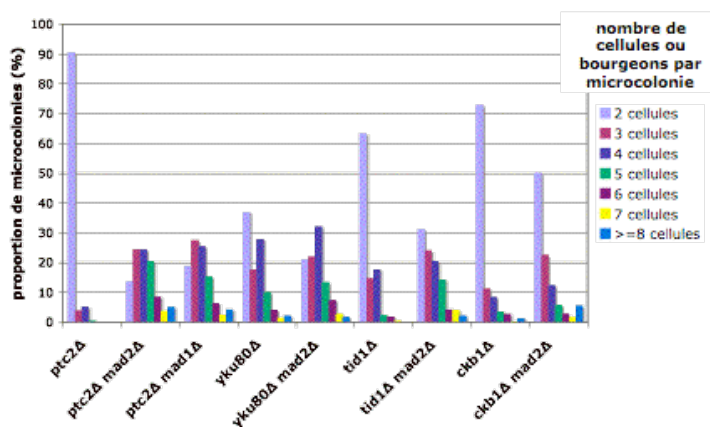
L'arrêt en G2/M après irradiation UV dans un mutant *mec1Δ* et l'arrêt résiduel en G2/M après un traitement au MMS dans un mutant *rad9Δ rad24Δ* sont dépendants de *MAD2* puisqu'ils sont affaiblis si ce gène est délété (Clerici et al., 2004; Garber and Rine, 2002). Pour mettre en évidence une implication éventuelle du checkpoint du fuseau dans la réponse à une coupure double-brin, nous avons testé l'effet de la délétion de *MAD2* sur l'adaptation après une cassure HO. Nous avons commencé par analyser le comportement de mutants d'adaptation, à savoir les mutants *ptc2Δ*, *yku80Δ*, *tid1Δ* et *ckb1Δ*. Comme on peut le voir sur la figure n°G15A, l'invalidation de *MAD2* améliore l'adaptation de ces souches puisqu'elle entraîne une réduction significative du nombre de cellules restées bloquées en G2/M. Pour vérifier que cet effet est bien dû au checkpoint du fuseau et qu'il n'est pas spécifique de *MAD2*, l'expérience a été reconduite



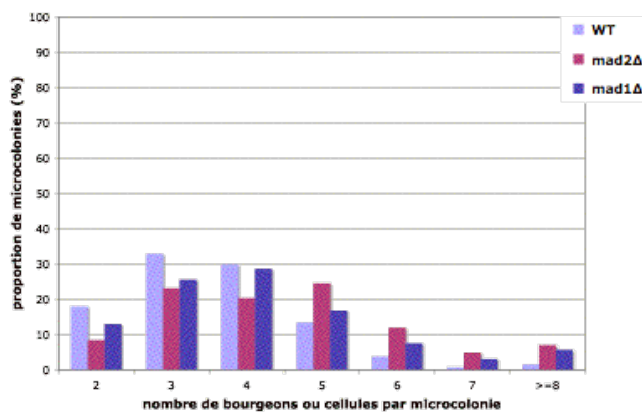
avec une délétion de *MAD1*. Celle-ci supprime le défaut d'adaptation du mutant *ptc2Δ* de manière identique à la délétion de *MAD2*. Les profils des doubles mutants *ptc2Δ mad2Δ* et *ptc2Δ mad1Δ* sont en effet très similaires (cf figure n°G15A). Les simples délétants *mad1Δ* et *mad2Δ* ont aussi des profils d'adaptation comparables, proches de celui de la souche sauvage (cf figure n°G15B). Une faible amélioration de l'adaptation induite par la délétion de *MAD1* ou de *MAD2* dans la souche sauvage a toutefois souvent été constatée. Les phénotypes obtenus après délétion de *MAD1* ou *MAD2* sont très semblables à ceux obtenus avec une surexpression modérée de *GLC7*. On observe dans les deux cas un faible effet sur la souche sauvage et une amélioration conséquente du phénotype des mutants d'adaptation. Afin de savoir si ces deux effets sont cumulatifs, nous avons établi le profil d'adaptation d'une souche *ptc2Δ mad2Δ* portant le plasmide pRS314/*GLC7* (cf figure n°G15C). La capacité d'adaptation de cette souche est similaire à celle obtenue après la disruption de *MAD2* ou la surexpression de *GLC7* seule. Un test analogue semble indiquer qu'il n'y a pas non plus d'effet cumulatif de la surexpression de *GLC7* et de la délétion de *MAD2* dans un contexte sauvage (données non montrées). Ces données ne sont pas contradictoires avec l'idée d'un effet indirect de Glc7 sur l'adaptation via le checkpoint du fuseau. Toutefois, les interprétations de ces deux derniers tests sont à prendre avec précaution comme nous l'avons déjà souligné lors de l'étude des mutants *chk1Δ*.

Figure n°G15

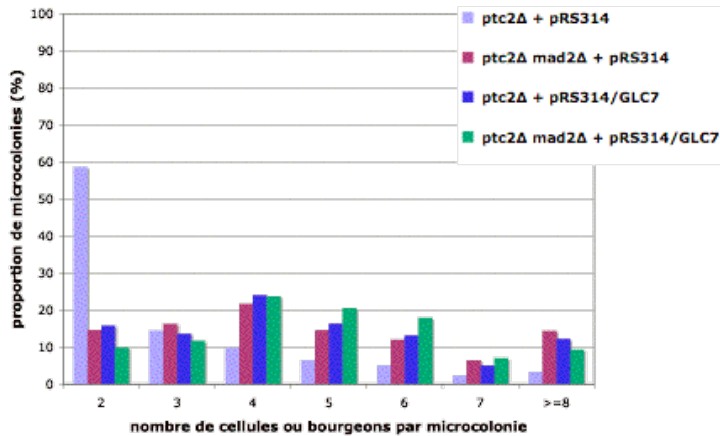
A



B



C


**Influence de la délétion de *MAD2* sur l'adaptation après cassure HO.**

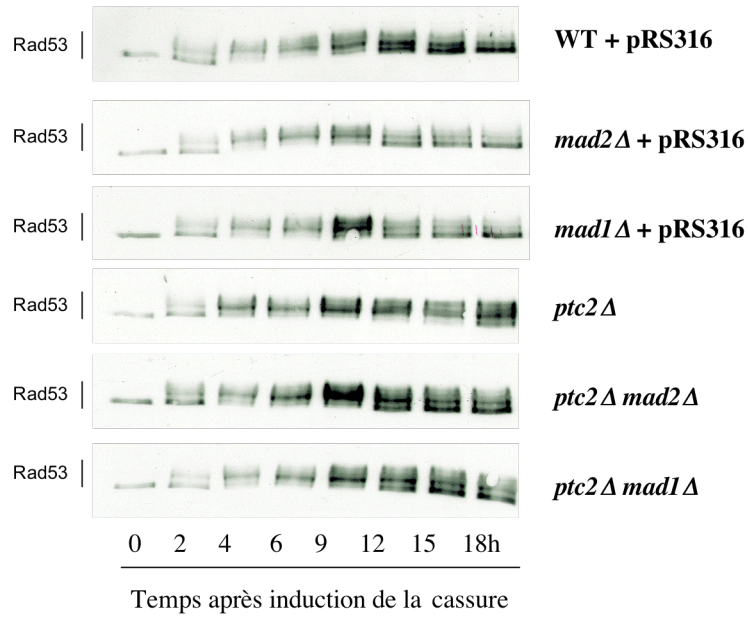
- A. Test d'adaptation effectué sur les souches MCM413 (JKM139 *ptc2Δ*), L275 (JKM139 *ptc2Δ mad2Δ*), L279 (JKM139 *ptc2Δ mad1Δ*), MCM694 (JKM139 *bar1Δ yku80Δ*), L31 (JKM139 *bar1Δ yku80Δ mad2Δ*), MCM347 (JKM179 *tid1Δ*), L34 (JKM179 *tid1Δ mad2Δ*), MCM449 (JKM139 *ckb1Δ*) et L36 (JKM139 *ckb1Δ mad2Δ*).
- B. Test d'adaptation effectué sur les souches MCM336 (WT, JKM139), L25 (JKM139 *mad2Δ*) et L20 (JKM139 *mad1Δ*).
- C. Test d'adaptation effectué sur les souches MCM413 (JKM139 *ptc2Δ*) et L275 (JKM139 *ptc2Δ mad2Δ*) portant le plasmide vide pRS314 ou le plasmide pRS314/GLC7.

Pour compléter notre étude sur l'adaptation, nous avons, comme précédemment, suivi la cinétique de phosphorylation de Rad53, ainsi que la progression dans le cycle après cassure HO de souches invalidées pour les gènes *MAD1* ou *MAD2* (cf figure n°G16). Les résultats obtenus sont en accord avec les données des tests d'adaptation. Les protéines Mad1 et Mad2 n'apparaissent pas nécessaires à l'activation du checkpoint de l'ADN suite à une cassure double-brin. En effet, les mutants *mad1Δ* et *mad2Δ* s'arrêtent en G2/M avec une cinétique similaire à celle de la souche sauvage et sont synchronisés en G2/M 6 heures après l'induction de la coupure (cf figure n°G16C). De plus, Rad53 est phosphorylée dans les mêmes délais et avec la même intensité chez les mutants *mad1Δ* et *mad2Δ* et dans la souche sauvage (cf figure n°G16A). La délétion des protéines du checkpoint du fuseau n'a pas non plus d'influence sur l'activation du checkpoint de l'ADN dans un mutant *ptc2Δ* (cf figures n°G16A et G16C) mais accélère significativement la déphosphorylation de Rad53 et la reprise du cycle : aux temps  $t=12h$ ,  $15h$  et  $18h$ , les formes phosphorylées de Rad53 sont prépondérantes chez le mutant *ptc2Δ* alors qu'elles sont minoritaires chez les doubles délétants *ptc2Δ mad2Δ* et *ptc2Δ mad1Δ*, et une proportion significative de cellules *ptc2Δ mad1Δ* et *ptc2Δ mad2Δ* sortent de mitose et retournent en phase G1, comme l'indiquent les profils de FACS aux mêmes temps (cf figures n°G16A et G16C). Ce résultat n'est pas spécifique du mutant *ptc2Δ*, puisque la disruption de *MAD2* accélère la déphosphorylation de Rad53 (cf temps  $t=12h$  et  $15h$  sur la figure n°G16B) chez un autre mutant d'adaptation, le mutant *tid1Δ*. Les délétions de *MAD1* ou de *MAD2* n'ont par contre pas d'influence sur la déphosphorylation de Rad53 et la reprise du cycle chez la souche sauvage, ce qui est en accord avec les données obtenues pour les tests d'adaptation (cf figures n°G16A et

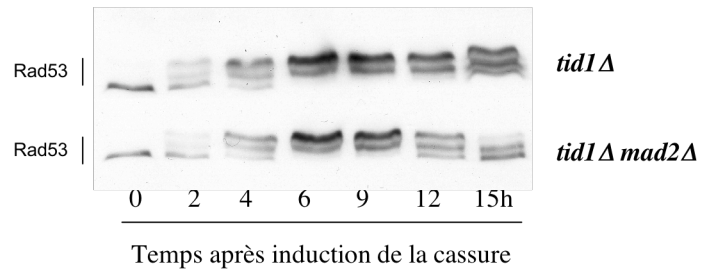
G16C).

Figure n°G16

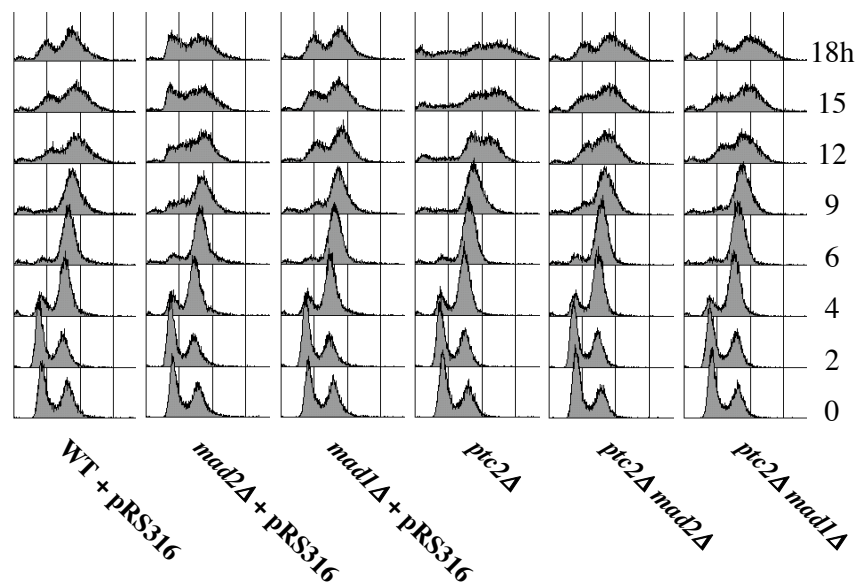
A



B



C



**Influence de la délétion de *MAD2* sur l'état de phosphorylation de Rad53 et la reprise du cycle après cassure HO.**

A. Les souches MCM336 (WT, JKM139), L26 (JKM139 *mad2Δ*), L21 (JKM139 *mad1Δ*), MCM413 (JKM139 *ptc2Δ*), L276 (JKM139 *ptc2Δ mad2Δ*) et L280 (JKM139 *ptc2Δ mad1Δ*) portant ou non le plasmide vide pRS316 sont cultivées en raffinose. On induit l'expression de *HO* en ajoutant du galactose à t=0. Des aliquots sont prélevés aux temps indiqués après induction et analysés par Western-Blot avec un anticorps dirigé contre la protéine Rad53.

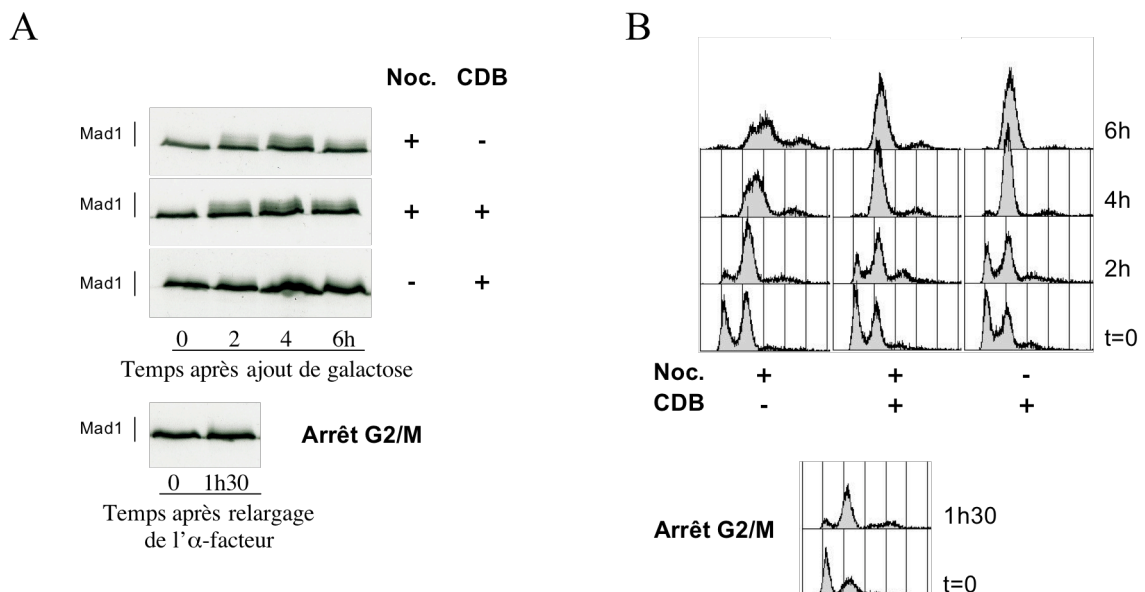
B. Les souches MCM347 (JKM179 *tid1Δ*) et L34 (JKM179 *tid1Δ mad2Δ*) sont cultivées en milieu liquide contenant du raffinose. On induit l'expression de *HO* en ajoutant du galactose à t=0. Des aliquots sont prélevés aux temps indiqués après induction et analysés par Western-Blot avec un anticorps dirigé contre la protéine Rad53.

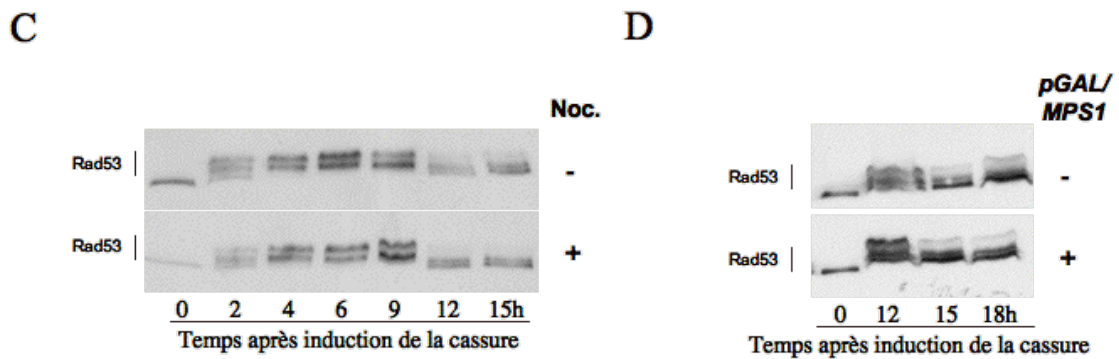
C. Analyse par FACS des points de la figure n°A.

Il avait été montré chez *Saccharomyces cerevisiae* que les protéines du checkpoint du fuseau étaient impliquées dans l'arrêt résiduel induit par un stress génotoxique dans des souches déficientes pour les checkpoints de l'ADN (Clerici et al., 2004; Garber and Rine, 2002). Nous montrons ici que le maintien d'un checkpoint de l'ADN suractivé dépend aussi de ces protéines.

Nous avons voulu savoir si la présence de la cassure HO activait le checkpoint du fuseau. Pour cela, nous avons analysé l'état de phosphorylation de Mad1. Mad1 est en effet légèrement phosphorylée en G2/M au cours d'un cycle normal, et est hyperphosphorylée lorsque le checkpoint du fuseau est activé. Six heures après l'induction de la coupure HO, Mad1 ne montre en Western-Blot qu'une phosphorylation comparable à celle observée en G2/M au cours d'un cycle non perturbé, alors que des bandes correspondant aux formes hyperphosphorylées de Mad1 induites par un traitement au nocodazole sont observables avec nos conditions de migration (cf figures n°G17A et G17B). Mad1 n'est pas non plus hyperphosphorylée aux temps t=9h, 12h et 15h après cassure HO (données non montrées).

**Figure n°G17**





#### Checkpoint du fuseau et checkpoint de l'ADN.

- A. (*partie haute*) Les souches L59 (JKM139 *MAD1-myc*) et L62 (JKM139 *HO inc MAD1-myc*) sont cultivées en milieu liquide contenant du raffinose. On induit l'expression de *HO* en ajoutant du galactose, et on ajoute ou non du nocodazole dans le milieu de culture à  $t=0$ . Des aliquots sont prélevés aux temps indiqués après induction et analysés par Western-Blot avec un anticorps dirigé contre le tag Myc. La souche L62 a un site *HO* incoupable (*HO inc*), l'ajout de galactose n'engendre donc pas la formation d'une cassure double-brin dans cette souche. (*partie basse*) Une culture en phase exponentielle de la souche L62 (JKM139 *HO inc MAD1-myc*) est synchronisée en G1 avec de l' $\alpha$ -facteur, lavée deux fois et relarguée dans un milieu contenant du galactose. Des aliquots sont prélevés aux temps indiqués après relargage et analysés par Western-Blot avec un anticorps dirigé contre le tag Myc.
- B. Analyse par FACS des points de la figure n°A.
- C. La souche MCM336 (JKM139) est cultivée en milieu liquide contenant du raffinose. On induit l'expression de *HO* en ajoutant du galactose et on ajoute ou non du nocodazole dans le milieu de culture à  $t=0$ . Des aliquots sont prélevés aux temps indiqués après induction et analysés par Western-Blot avec un anticorps dirigé contre la protéine Rad53.
- D. La souche MCM336 (JKM139) portant le plasmide vide p415GAL1 ou le plasmide p415GAL1/MPS1 est cultivée en milieu liquide contenant du raffinose. On induit l'expression de *HO* en ajoutant du galactose à  $t=0$ . Des aliquots sont prélevés aux temps indiqués après induction et analysés par Western-Blot avec un anticorps dirigé contre la protéine Rad53.

Par ailleurs, nous avons testé l'influence de l'activation du checkpoint du fuseau sur la réponse d'une souche sauvage à une coupure *HO* en ajoutant du nocodazole dans le milieu de culture en même temps que le galactose (qui induit l'expression de *HO*). La figure n°G17C montre que le nocodazole n'a aucune influence sur la cinétique de phosphorylation de Rad53 après cassure *HO*. De plus, le profil d'adaptation de la souche sauvage n'est pas modifié en présence de nocodazole (données non montrées). Peut-être aurait-il fallu refaire l'expérience en ajoutant du nocodazole quelques heures après induction de la cassure pour éliminer les hypothèses d'une dégradation éventuelle de la drogue ou d'une adaptation des cellules à cette drogue. Comme il a été précisé en introduction, la surexpression de *MPS1* est considérée comme un moyen artificiel d'activation du checkpoint du fuseau. Nous avons par ailleurs vu que le mutant *ipl1-321* était déficient pour le maintien de l'arrêt induit par la surexpression de *MPS1* alors qu'il ne l'est pas pour l'arrêt induit par un traitement au nocodazole (Biggins and Murray, 2001) et que *Glc7* semble antagoniser les fonctions mitotiques de la kinase *Ipl1*. Comme la surexpression de *GLC7* accélère la désactivation d'un checkpoint de l'ADN suractivé, on pouvait s'attendre à ce que la surexpression de *MPS1* retarde l'inactivation du checkpoint de l'ADN. Cependant, comme l'indique la figure n°G17D, la surexpression de *MPS1* ne modifie pas la cinétique de déphosphorylation de Rad53.

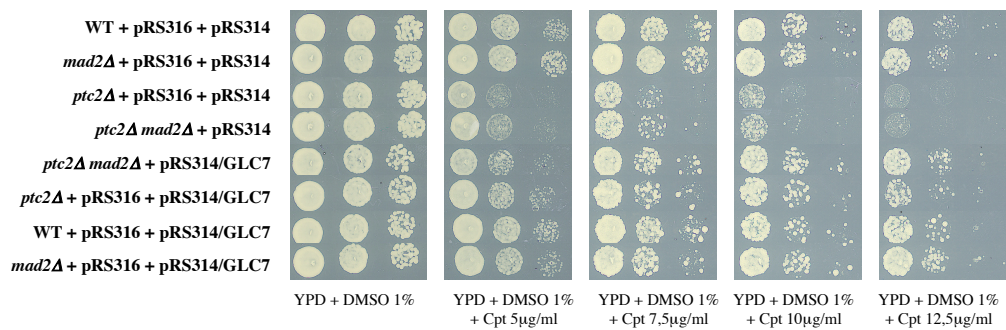
Les relations entre checkpoint du fuseau et checkpoint de l'ADN ne sont donc pas claires. L'idée simple selon laquelle l'activation du checkpoint du fuseau renforcerait l'arrêt en G2/M après un stress génotoxique et que son inactivation accélérerait la reprise du cycle après des lésions de l'ADN n'est pas confirmée. On peut toutefois imaginer que la cellule a sélectionné des mécanismes empêchant de « cumuler » les arrêts en G2/M engendrés par l'activation des deux checkpoints.

### 2.9.1.2. Influence de la délétion de *MAD2* sur la réponse à la camptothécine

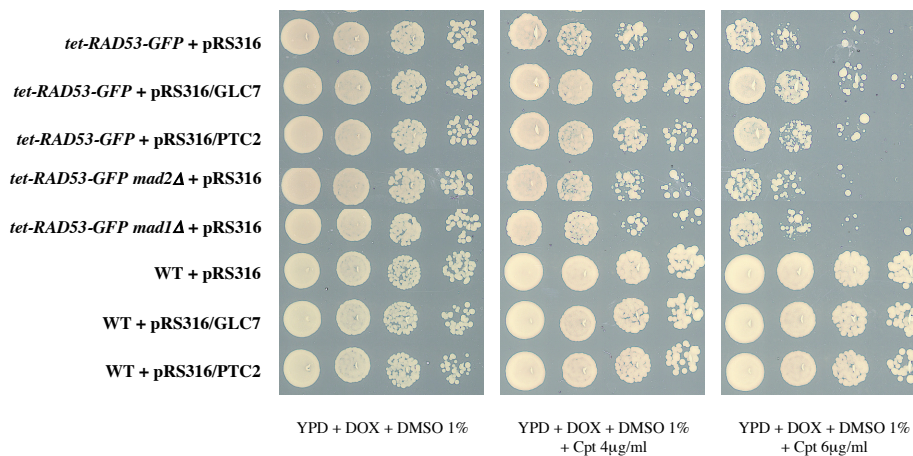
Des tests de sensibilité ont été réalisés pour étudier l'effet de l'inactivation de *MAD2* sur la réponse à la camptothécine. Les mutants du checkpoint du fuseau ne montrent pas d'hypersensibilité aux stress génotoxiques, comme les rayonnements UV et  $\gamma$ , la phléomycine, la camptothécine et le 4-NQO (cf figure n°G18A, données non montrées et (Hoyt et al., 1991)). La sensibilité des mutants *ptc2Δ* à la camptothécine est à nouveau visible sur la figure n°G18A. Par contre, contrairement à la surexpression de *GLC7*, la délétion de *MAD2* ne supprime pas l'hypersensibilité de ces mutants à la camptothécine. De plus, l'effet de *Glc7* sur l'hypersensibilité à la camptothécine est toujours visible chez le double mutant *ptc2Δ mad2Δ* et est comparable à celui induit chez le simple mutant *ptc2Δ*, suggérant que cet effet est indépendant de *MAD2* (cf figure n°G18A).

Figure n°G18

A



B



**Effets comparés de la surexpression de *GLC7* et de la délétion de *MAD2* sur la réponse à la camptothécine et à l'allèle *tetO-RAD53-GFP*.**

- A. La sensibilité des souches MCM336 (WT, JKM139), L25 (JKM139 *mad2Δ*), L196 (JKM139 *ptc2Δ*) et L275 (JKM139 *ptc2Δ mad2Δ*) portant un plasmide vide (pRS316 et/ou pRS314) et/ou le plasmide pRS314/*GLC7* est testée pour différentes concentrations de camptothécine. Des dilutions sérielles au 1/10 de cultures en phase exponentielle sont «spottées» sur les milieux indiqués puis incubées à 30°C. Elles sont examinées 2 à 3 jours plus tard.
- B. La sensibilité des souches L49 (YPH499 *tetO-RAD53-GFP*), L52 (YPH499 *tetO-RAD53-GFP mad2Δ*), L51 (YPH499 *tetO-RAD53-GFP mad2Δ*) et MCM001 (WT, YPH499) portant le plasmide vide pRS316, le plasmide pRS316/*GLC7* ou le plasmide pRS316/*PTC2* est testée sur des milieux contenant de la doxycycline et différentes concentrations de camptothécine. Des dilutions sérielles au 1/10 de cultures en phase exponentielle faites en milieu sélectif contenant de la doxycycline sont «spottées» sur les milieux indiqués puis incubées à 30°C. Elles sont examinées 2 à 3 jours plus tard.

Nous avons également testé l'influence de *MAD2* sur la survie en présence de l'allèle dominant létal *tetO-RAD53-GFP*. Cet allèle contient la séquence codant Rad53 fusionnée à la séquence codant pour la GFP (« Green Fluorescent Protein »). Cette fusion est placée sous le contrôle de l'opérateur *tetO* qui est réprimé en présence de tétracycline ou de ses dérivés comme la doxycycline (Marsolier et al., 2000). Cet allèle se comporte comme une forme hyperactive de *RAD53*, capable d'activer des cibles de Rad53, et est délétère chez une souche sauvage (Marsolier et al., 2000). Pour notre étude, nous avons utilisé une souche construite par Anne Peyroche dans laquelle cet allèle est intégré au niveau du locus *TRP1* (souche CHKY001-5). L'intégration de cette construction conduit à un phénotype plus fort que sa présence sur un plasmide et empêche totalement la croissance en absence de doxycycline. La fusion Rad53-GFP, comme la protéine Rad53 endogène, sont alors hyperphosphorylées (Anne Peyroche, communication personnelle). Comme le montre la figure n°G18B, même en présence de doxycycline, cette souche est hypersensible à la camptothécine, certainement à cause d'une fuite de l'opérateur *tetO*. La surexpression de *PTC2* supprime partiellement cette hypersensibilité. Ptc2 déphosphoryle probablement les formes hyperactives et hyperphosphorylées de Rad53, rendant l'allèle moins toxique. La figure n°G18B indique aussi que la surexpression de *GLC7* supprime partiellement l'hypersensibilité de cette souche à la camptothécine. Ceci est en accord avec l'idée d'un rôle de *Glc7* dans l'inactivation des checkpoints de l'ADN.

Par contre, les délétions de *MAD1* ou *MAD2* ne suppriment pas l'hypersensibilité de la souche CHKY001-5 à la camptothécine (cf figure n°G18B). Nous avons aussi testé l'influence de la délétion de *MAD1* ou de *MAD2* sur la croissance d'une souche sauvage portant un plasmide contenant la fusion *tetO-RAD53-GFP* en absence de doxycycline (Marsolier et al., 2000). Aucune différence n'a été observée entre la souche sauvage et les délétants *mad1Δ* et *mad2Δ* (données non montrées). Ainsi, l'inactivation du checkpoint du fuseau ne restaure pas systématiquement la viabilité de cellules dont les checkpoints de l'ADN sont anormalement hyperactifs.

Nous avons observé une déphosphorylation plus rapide de Rad53 chez les doubles mutants *ptc2Δ mad1Δ* et *ptc2Δ mad2Δ* après cassure HO. Nous avons donc analysé la phosphorylation de Rad53 et de Rad53-GFP en absence de doxycycline dans les souches sauvage et *mad2Δ* portant le plasmide contenant la fusion *tetO-RAD53-GFP*. Aucune différence n'a été observée en Western-Blot entre les deux souches (données non montrées). Cependant, en absence de doxycycline, les formes Rad53-GFP sont beaucoup plus abondantes lorsque la construction est intégrée que lorsqu'elle est portée par un plasmide. Nous pourrions donc utiliser la souche

CHKY001-5 pour cette étude. De plus, l'état de phosphorylation de Rad53 n'a été étudié qu'aux temps  $t=2h$ , 4h et 6 heures après relargage dans un milieu sans doxycycline. Nous pourrions analyser des points plus tardifs.

### 2.9.1.3. Conclusion

L'étude de la construction *tetO-RAD53-GFP* constitue un élément de plus en faveur d'un rôle de Glc7 dans l'inactivation des mécanismes de surveillance de l'ADN. La surexpression de *GLC7* semble en effet diminuer la toxicité de cet allèle dominant létal qui induit de façon artificielle une hyperactivation de Rad53. Les tests de sensibilité ne semblent pas être en accord avec l'idée d'un effet indirect de Glc7 sur l'inactivation des checkpoints de l'ADN via Mad1 et Mad2. Pourtant, il est possible que la surexpression de *GLC7* ait d'autres effets (en plus d'un éventuel impact sur le checkpoint du fuseau) permettant d'améliorer la viabilité en présence d'une activation permanente des checkpoints de l'ADN.

Les résultats obtenus avec la délétion de *MAD2* sont analogues à ceux obtenus avec la délétion de *CHK1*. Les conclusions que l'on peut en tirer sont limitées. Cependant, il serait intéressant de tester la progression dans le cycle du double mutant *ptc2Δ mad2Δ* lors d'un traitement à la camptothécine, comme nous l'avons fait pour le mutant *chk1Δ mad2Δ*. De même, la sensibilité du mutant *chk1Δ* à l'allèle *tetO-RAD53-GFP* pourrait être étudiée. La comparaison entre les effets de la délétion de *CHK1* et ceux de la délétion de *MAD2* serait intéressante et aboutirait peut-être à l'hypothèse d'une voie commune, comprenant Mad2 et Chk1, nécessaire au maintien du checkpoint de l'ADN en G2/M.

### 2.9.2. Glc7 et le checkpoint du fuseau

En parallèle de l'étude de la réponse des mutants *mad2Δ* aux stress génotoxiques, nous avons testé si la surexpression de *GLC7* a une influence sur l'activation ou le maintien du checkpoint du fuseau. Notre hypothèse de travail repose en effet sur la supposition que la surexpression de la PP1c affaiblit ce checkpoint, ce qui accélère l'inactivation du checkpoint de l'ADN.

La surexpression de *GLC7* ne modifie pas la sensibilité des cellules au benomyle (données non montrées). De plus, nous n'avons observé aucune différence par comptage dans l'arrêt induit par le nocodazole entre une souche sauvage et une souche surexprimant *GLC7* (données non montrées). Comme Ipl1 est nécessaire au maintien de l'arrêt induit par la surexpression de *MPS1* (Biggins and Murray, 2001), une analyse par FACS a été menée pour tester si la surexpression de *GLC7* affaiblissait cet arrêt. Deux plasmides permettant de surexprimer *MPS1* ont été utilisés : un plasmide envoyé par le laboratoire de M. Winey (E325 – pN-myc-Gal-MPS1 2 $\mu$  *LEU2*) et un plasmide que j'ai construit en clonant la séquence codante de *MPS1* dans le vecteur p415GAL1 (*CEN*, *LEU2*). J'ai eu beaucoup de mal à vraiment voir un arrêt du cycle avec les deux constructions, notamment avec le fond génétique YPH499. Une accumulation des cellules en G2/M était plus visible dans le fond Y300 (W303). Les rares fois où les données étaient interprétables (c'est-à-dire lorsque l'on observait une différence entre la souche sauvage et le mutant *mad2Δ*), la souche portant le plasmide pRS316/*GLC7* montrait un profil en FACS similaire à la souche sauvage. Pour améliorer le test, j'ai ensuite essayé de reproduire les expériences décrites dans (Hardwick et al., 1996). Les différences entre les souches sauvage et *mad2Δ* n'étaient pas significatives. Des conditions dans lesquelles l'arrêt dû à la surexpression de



*MPS1* est net et dépendant de *MAD2* de façon claire, ou une expérience plus spécifique analysant l'abondance de la protéine Pds1 après relargage d'un arrêt en  $\alpha$ -facteur permettraient peut-être de mettre en évidence un effet de Glc7 sur l'arrêt induit par la surexpression de *MPS1*. C'est d'ailleurs de cette manière que les tests sur *ipl1-321* ont été menés (Biggins and Murray, 2001). Par ailleurs, la protéine Mad1 est phosphorylée lorsque le checkpoint du fuseau est activé. Nous pourrions essayer de suivre l'état de phosphorylation de Mad1 dans une souche surexprimant *GLC7* lors d'un traitement au nocodazole ou d'une surexpression de *MPS1* afin de voir si la phosphorylation de Mad1 est atténuée.

### 3. Discussion

#### 3.1. Glc7 et l'inactivation des checkpoints de l'ADN

##### 3.1.1. La déphosphorylation de Rad53 est requise pour la reprise du cycle après une cassure HO ou un traitement à la camptothécine.

Nos résultats suggèrent que la phosphatase Ptc2 est requise pour l'inactivation des checkpoints de l'ADN après cassure HO ou traitement à la camptothécine. Suite à l'un de ces deux stress, le mutant *ptc2 $\Delta$*  montre en effet un défaut de déphosphorylation de Rad53 et un défaut de reprise du cycle. Cette activation trop longue du checkpoint pourrait être à l'origine de la sensibilité de ce mutant à la camptothécine comme elle l'est pour son défaut d'adaptation et de rétablissement après cassure HO. Plus précisément, l'étude de l'allèle *ptc2-T376A* suggère que le rôle de Ptc2 dans ces processus cellulaires est au moins en partie de déphosphoryler Rad53. Ainsi, cette déphosphorylation constitue un élément clé du processus conduisant à l'adaptation ou au rétablissement. À ce jour, les mécanismes permettant l'inactivation des checkpoints de l'ADN sont encore mal connus. Il a été montré que l'inactivation de Rad53 ou Mec1, via l'utilisation d'allèles thermosensibles, 10 heures après l'induction de la cassure HO dans le mutant d'adaptation *cdc5-ad* induisait une reprise du cycle cellulaire. De plus, dans le cas de l'inactivation de Mec1, les auteurs montrent conjointement une déphosphorylation prononcée de Rad53 (Pelliccioli et al., 2001). L'arrêt permanent des mutants d'adaptation nécessite donc une activité continue des kinases du checkpoint. Ces kinases, notamment Rad53 et Chk1, sont d'ailleurs désactivées au moment où les cellules adaptent (Pelliccioli et al., 2001). Ces données et les nôtres suggèrent que l'inactivation de la cascade en amont du checkpoint est un élément nécessaire et suffisant au rétablissement et à l'adaptation.

Le rôle de Ptc2 a été mis en évidence dans le cas de la cassure HO par (Leroy et al., 2003). Nos résultats montrent ici que la même fonction de Ptc2, à savoir la déphosphorylation de Rad53, est probablement requise pour la reprise du cycle lors d'un traitement à la camptothécine. La camptothécine est considérée comme une drogue induisant des cassures double-brin de l'ADN. Il semble donc normal que la réponse à cette drogue nécessite les mêmes mécanismes que ceux mis en place pour la réponse à la cassure HO. Pourtant, le mutant *ptc2 $\Delta$*  n'est pas hypersensible aux stress comme les rayons  $\gamma$  ou la phléomycine qui sont également décrits comme induisant des cassures double-brin de l'ADN. Le nombre de cassures double-brin produites dans une cellule est un élément déterminant pour l'adaptation. Il a en effet été montré que les cellules sauvages n'adaptent pas en présence de deux cassures HO. Comme nous l'avons déjà souligné, il est possible que, contrairement à la camptothécine et à la cassure HO, la phléomycine et les rayons  $\gamma$  induisent un nombre plus variable de cassures double-brin dans les

cellules ou des dommages plus hétérogènes, ce qui diminuerait le nombre de cellules dont la survie serait conditionnée par l'activité de Ptc2.

Le mutant *ptc2Δ* est également sensible au 4-NQO (données non montrées). Cependant, la complémentation de ce mutant par le plasmide pRS316/PTC2-T376A ne supprime que partiellement son hypersensibilité au 4-NQO (données non montrées). Ceci pourrait suggérer que Ptc2 a d'autres fonctions en plus de son rôle vis-à-vis de Rad53 dans la réponse au 4-NQO.

### 3.1.2. *Glc7 est impliquée dans une voie modulant l'inactivation des checkpoints de l'ADN après une cassure HO ou un traitement à la camptothécine.*

Nos résultats montrent que Glc7 est également impliquée dans l'inactivation des checkpoints de l'ADN. Cependant son rôle n'a réellement pu être caractérisé qu'en présence d'un checkpoint « suractivé ». Ainsi, une influence de Glc7 a été mise en évidence chez plusieurs mutants défectueux pour l'adaptation ou le rétablissement après cassure HO, chez le mutant *ptc2Δ* après un traitement à la camptothécine et en présence de l'allèle *tetO-RAD53-GFP*. Glc7 pourrait avoir un rôle mineur dans l'adaptation et le rétablissement en cas de stress génotoxique. Mais il est aussi possible que nos moyens d'investigation, limités par la létalité de la forte surexpression ou de la délétion de *GLC7*, ne nous aient pas permis de démontrer une implication plus forte de Glc7 dans la désactivation du checkpoint. Le fait que la surexpression modérée de *PTC2* via le plasmide pRS316/PTC2 ne modifie pas de façon drastique le comportement de la souche sauvage (cf figure n°G6, G9B et G18) alors que Ptc2 est nécessaire à l'inactivation du checkpoint après une cassure HO ou lors d'un traitement à la camptothécine, et que la surexpression modérée de *GLC7* via le plasmide pRS316/GLC7 ait les mêmes effets que celle de *PTC2* chez cette même souche sauvage conforte cette idée. Par ailleurs, la multiplicité des contextes dans lesquels un effet de Glc7 a pu être mis en évidence (plusieurs mutants d'adaptation différents, plusieurs stress génotoxiques différents, l'activation artificielle via *tetO-RAD53-GFP*) affaiblit l'hypothèse d'un effet indirect.

Nous pensons que l'inactivation du checkpoint après une cassure double-brin de l'ADN nécessite la désactivation des protéines en amont du checkpoint et notamment la désactivation de Rad53 par sa déphosphorylation. Les effets de Glc7 que nous observons mènent donc à deux hypothèses :

- soit Glc7 est impliquée dans une voie qui module directement l'état de phosphorylation de Rad53,
- soit Glc7 agit sur une ou des voies permettant à la cellule de se passer de la désactivation des protéines en amont du checkpoint et force la reprise du cycle en jouant sur des éléments en aval ou en parallèle du checkpoint. La déphosphorylation de Rad53 observée pourrait alors être le résultat d'une boucle de régulation ou plus indirectement de la progression dans le cycle, puisqu'il a été montré que Rad53 n'était pas activée en G1 en cas de cassure double-brin (Ira et al., 2004; Pellicioli et al., 2001).

Le fait que la surexpression de *GLC7* ne montre que des effets similaires à ceux de la surexpression de *PTC2* conforte la première hypothèse, même si la seconde ne peut être totalement exclue. Cette hypothèse conduit à penser que Glc7 agit dans une voie permettant de réguler l'état de phosphorylation de Rad53 au cours de la désactivation du checkpoint, voie distincte de celle de Ptc2.

La surexpression de *GLC7* complémente les défauts de déphosphorylation de Rad53 et de reprise du cycle du mutant *ptc2Δ* en cas de cassure HO et du mutant *ptc2Δ ptc3Δ* lors d'un traitement à la camptothécine. Cependant cette complémentation n'apparaît que partielle lors des tests d'adaptation à la cassure HO et des tests de sensibilité à la camptothécine (cf figures n°G3, n°G9 et données non montrées). Cela pourrait être dû au fait que nous ne pouvons surexprimer *GLC7* que de façon modérée. Mais il est également possible que la surexpression de *GLC7* ait des effets délétères sur la croissance ou sur la réparation indépendamment de son rôle dans le checkpoint. Si tel était le cas, cet effet délétère devrait toutefois être visible sur la souche sauvage dans ces tests. Rien de tel n'a été observé. Ptc2 pourrait avoir d'autres cibles et ainsi inactiver plus efficacement d'autres voies du checkpoint. Il a été montré par exemple que Wip1, l'homologue fonctionnel de Ptc2 chez les mammifères, inactivait Chk1 (Lu et al., 2005). L'analyse de l'allèle *PTC2-T376A* semblerait alors suggérer que la phosphorylation de Ptc2 serait nécessaire à ces autres rôles. D'autres explications sont tout à fait envisageables.

L'hypothèse d'une voie distincte de celle nécessitant Ptc2 permettant la déphosphorylation de Rad53 et dans laquelle serait impliquée Glc7 conduit à se demander quelle serait la signification physiologique de l'existence de plusieurs voies. En Western-Blot, Rad53 montre des profils de phosphorylation différents en fonction du stress génotoxique. C'est le cas par exemple pour ceux obtenus après une cassure HO ou un traitement à la camptothécine. Les formes phosphorylées de Rad53 après ces deux stress ne sont donc sûrement pas exactement les mêmes. Les études des sites de Rad53 phosphorylés en cas de traitement au MMS ou au 4-NQO montrent que ces deux stress génotoxiques n'engendrent pas la phosphorylation du même ensemble de sites (Smolka et al., 2005; Sweeney et al., 2005). Les événements de phosphorylation pourraient également dépendre de la phase du cycle et/ou de la quantité de dommages. L'existence de plusieurs voies impliquées dans la déphosphorylation de Rad53 pourrait ainsi permettre une désactivation adaptée de Rad53 quelles que soient les conditions de son activation. Il est intéressant de noter que la surexpression de *GLC7* ne corrige que partiellement l'absence de déphosphorylation de Rad53 du mutant *ptc2Δ ptc3Δ* en cas de cassure HO (cf figure n°G5A) alors qu'elle permet de retrouver un phénotype sauvage lors d'un traitement à la camptothécine (cf figure n°G9D). L'existence de plusieurs voies de déphosphorylation de Rad53 pourrait résulter de la réponse spécialisée que la cellule met en place pour chaque stress.

Certains sites de phosphorylation de Rad53 pourraient être communs aux différents stress et d'autres plus spécifiques. L'idée d'un jeu de phosphatases ciblant directement ces différents sites avec potentiellement une certaine redondance est séduisante. Nous avons essayé de mettre en évidence une éventuelle interaction entre Glc7 et Rad53 par les techniques de double-hybride, de « GST-pulldown » et de co-immunoprécipitation. L'échec de ces investigations nous a amenés à chercher par quel autre mécanisme Glc7 pouvait influencer sur l'inactivation des checkpoints de l'ADN.

### 3.2. *Chk1 et le maintien des checkpoints de l'ADN*

#### 3.2.1. *Quel est le rôle de Chk1 au sein du checkpoint de l'ADN chez Saccharomyces cerevisiae ?*

Chez *Schizosaccharomyces pombe* et les cellules de mammifères, Chk1 est impliquée dans l'arrêt en G2. Suite à un stress génotoxique, elle inhibe, via la phosphorylation de différentes

protéines, l'activation de Cdk1 requise pour l'entrée en mitose. Chez *S. pombe*, la délétion de *CHK1* entraîne une forte sensibilité aux UV et aux rayons  $\gamma$ . Ainsi, on arrive très facilement à mettre en évidence le rôle de Chk1 dans la réponse aux dommages de l'ADN chez cette levure comme chez les eucaryotes supérieurs. Comme nous l'avons déjà souligné, chez *Saccharomyces cerevisiae*, le rôle de Chk1 est considéré comme mineur puisque sa délétion ne montre pas de phénotype fort. Ainsi, le mutant *chk1Δ* n'est sensible ni au MMS, ni aux rayonnements UV et  $\gamma$  (Liu et al., 2000; Sanchez et al., 1999). Cette absence de phénotype marqué est spécifique de la délétion de *CHK1*, puisqu'elle ne caractérise pas la délétion des autres gènes connus du checkpoint de l'ADN chez la levure bourgeonnante.

Malgré l'absence apparente d'importance de cette protéine chez *S. cerevisiae*, il a été montré que Chk1 contrôlait une voie parallèle à celle contrôlée par Rad53. Ceci a été clairement mis en évidence uniquement à l'aide de la mutation *cdc13-1*. Cdc13 est une protéine qui protège les extrémités télomériques. La mutation *cdc13-1* est thermosensible : les mutants ont une croissance normale à 23°C ; par contre, à température restrictive, ils accumulent de l'ADN simple-brin aux télomères et s'arrêtent en G2/M (Garvik et al., 1995). Cet arrêt est dépendant du checkpoint de l'ADN qui semble détecter la présence de cet ADN simple-brin et le traiter comme un dommage. Si les mutants *cdc13-1* sont placés quelques heures à température restrictive, le retour à température permissive va permettre la formation de colonies viables. Par contre, s'ils restent à température restrictive, les cellules vont mourir sous forme de microcolonies (Maringele and Lydall, 2002; Sanchez et al., 1999). On peut parler dans ce dernier cas d'adaptation puisque les cellules arrivent tout de même à faire quelques divisions et donc à reprendre le cycle malgré la présence persistante de dommages. Cependant, les microcolonies après 16 heures à température restrictive sont petites : 90% d'entre elles ne comportent pas plus de 4 cellules (Sanchez et al., 1999). Ceci indique que la quantité de dommages dans ces cellules doit être importante limitant la possibilité d'adaptation. Ainsi, l'adaptation semble plus aisée dans le cas d'une cassure HO qu'en présence de la mutation *cdc13-1*.

La délétion de *CHK1* supprime partiellement cet arrêt, tout comme la délétion de *RAD53*. En effet, le suivi de la progression dans le cycle de cellules *cdc13-1 chk1Δ* et *cdc13-1 rad53Δ* relarguées à température restrictive après un arrêt à l' $\alpha$ -facteur montre que ces mutants ne maintiennent pas l'arrêt en G2/M et reprennent le cycle de façon précoce. La délétion concomitante de *CHK1* et *RAD53* supprime complètement l'arrêt en G2/M du mutant *cdc13-1* (Sanchez et al., 1999). L'effet de la disruption de *CHK1* sur l'adaptation du mutant *cdc13-1* est important puisque l'on passe de 10% dans une souche sauvage à 90% de cellules pouvant former des microcolonies de plus de 4 cellules après 16 heures (Sanchez et al., 1999). Ceci est en accord avec nos résultats, puisque nous retrouvons nous aussi que la délétion de *CHK1* entraîne une reprise précoce du cycle lors d'un arrêt prolongé imposé par le checkpoint de l'ADN suite à une cassure HO (dans les contextes *ptc2Δ* et *yku80Δ*) ou lors d'un traitement à la camptothécine (contexte *ptc2Δ*).

Chk1 ne semble pas avoir un rôle primordial dans la mise en œuvre ou le maintien de l'arrêt dans un contexte sauvage. Quelques effets mineurs sont toutefois observés. Ainsi, la reprise du cycle semble légèrement plus précoce chez le mutant *chk1Δ* que chez la souche sauvage après cassure HO ou traitement à la camptothécine (cf figures n°G10 et G12). De même, une autre étude sur des populations de cellules *chk1Δ* synchronisées montre un léger défaut du *maintien* de l'arrêt en mitose 6 heures après une irradiation  $\gamma$ , notamment lorsque les cellules ont été préalablement arrêtées avec du nocodazole. Dans cette étude, les auteurs soulignent le fait que l'établissement de l'arrêt en G2/M suite à l'irradiation est clairement détecté dans les cellules

*chk1Δ* contrairement à ce que l'on observe par exemple chez les mutants *rad17Δ* et que la délétion de *CHK1* n'affecte donc que le maintien de l'arrêt (Liu et al., 2000). Ceci est encore une fois en accord avec nos résultats puisque nous n'observons pas non plus de défaut pour les cellules *chk1Δ* dans l'établissement de l'arrêt mais plutôt dans le maintien, que ce soit après cassure HO ou après traitement à la camptothécine.

Il est intéressant de noter que seuls des défauts dans l'arrêt du cycle après un stress génotoxique ont été mis en évidence chez les délétants *chk1Δ*. Aucun défaut de viabilité n'a été observé que ce soit après des dommages induits par des radiations UV,  $\gamma$ , ou des traitements au MMS, à la camptothécine ou au 4-NQO (cf figure n°G12B, données non montrées et (Liu et al., 2000; Sanchez et al., 1999)). De même, la délétion de *CHK1* n'influe pas sur le rétablissement du mutant *cdc13-1*, ou plus exactement sur sa viabilité après retour à température permissive (Sanchez et al., 1999). Il a naturellement été proposé que Chk1, au sein du checkpoint, n'intervienne qu'au niveau des mécanismes contrôlant l'arrêt du cycle (Liu et al., 2000; Sanchez et al., 1999). Ces mécanismes font bien sûr partie de la réponse cellulaire aux lésions de l'ADN mais n'en sont pas le constituant exclusif. L'intégralité des processus mis en œuvre suite à l'activation du checkpoint est loin d'être connue, mais l'on pense que le checkpoint agit par exemple aussi sur les voies de réparation. Cette idée permettrait de donner une explication à l'hypersensibilité aux stress génotoxiques des autres mutants du checkpoint : des voies autres que celles contrôlant la progression dans le cycle seraient affectées chez ces mutants (Liu et al., 2000; Sanchez et al., 1999). Le fait que la délétion de *CHK1* ait une incidence sur la déphosphorylation de Rad53 (cf figure n°G10C) suggère que le problème est plus complexe. Même si l'on pense que Chk1 ne sert qu'à consolider l'arrêt en G2/M en cas de dommages, il semble qu'elle soit plus globalement nécessaire au maintien de l'activité du checkpoint. La déphosphorylation précoce de Rad53 observée chez le mutant *chk1Δ ptc2Δ* pourrait résulter du retour des cellules en G1 et ne pas remettre en cause l'hypothèse concernant le rôle de Chk1 au sein du checkpoint. En effet, Rad53 n'est pas activée en cas de cassure double-brin induite en G1, ce qui suggère que la sortie de mitose après une cassure HO pourrait favoriser l'apparition de conditions dans lesquelles Rad53 ne peut pas être phosphorylée (Ira et al., 2004; Pellicioli et al., 2001). Cependant, le fait que la phosphorylation de Rad53 après une irradiation UV soit identique chez le mutant *mec1Δ* qui est bloqué en G2/M et chez le mutant *mec1Δ mad2Δ* qui est sorti de mitose et repassé en G1 (Clerici et al., 2004), indique que le retour en G1 n'est pas suffisant dans certaines conditions pour inactiver Rad53. Ceci pourrait en partie dépendre du type de stress génotoxique et le cas particulier de la camptothécine n'a pas été étudié.

Malgré le fait que Rad53 et Chk1 semblent régir des voies fonctionnant en parallèle, nos données indiquent que ces dernières ne sont pas complètement déconnectées et pourraient influencer l'une sur l'autre. Il serait d'ailleurs intéressant d'étudier la phosphorylation de Chk1 chez le mutant *ptc2Δ* ou dans une souche portant le plasmide pGAL-PTC2 (Leroy et al., 2003). Ainsi, même si le modèle actuel incite à penser que Ptc2 agit directement et uniquement sur Rad53, je pense que la cinétique de phosphorylation de Chk1 suivrait celle de Rad53. Nous avons suggéré en début de discussion que l'inactivation en amont du checkpoint était nécessaire et suffisante pour enclencher les phénomènes d'adaptation et de rétablissement et donc la reprise du cycle. Le fait que la délétion de *CHK1* ne joue pas seulement sur la progression du cycle mais aussi sur la cinétique de déphosphorylation de Rad53 reste en accord avec cette hypothèse.

### 3.2.2. Pds1, la cible de Chk1 pour le contrôle de la progression cellulaire

La sécurine Pds1 a été identifiée comme cible de Chk1 pour le contrôle de la progression dans le cycle après une irradiation  $\gamma$  ou chez le mutant *cdc13-1*. Pds1 est phosphorylée par Chk1, ce qui inhibe son ubiquitinylation par le complexe APC et sa dégradation par le protéasome (Agarwal et al., 2003; Wang et al., 2001). Ce mécanisme moléculaire contribue à empêcher l'entrée en anaphase en cas de dommages de l'ADN. Ainsi, une dégradation précoce de Pds1 a été observée chez les doubles mutants *cdc13-1 chk1Δ* à température restrictive (Wang et al., 2001). Cette dégradation est concomitante avec le début précoce de l'anaphase observé dans ces cellules et le retour en G1 que nous avons déjà discuté. Il a aussi été montré que les mutants *chk1Δ* entraînent de façon précoce en anaphase après une irradiation UV faisant suite à une synchronisation préalable au nocodazole (Sanchez et al., 1999). Il semble que la voie contrôlée par Rad53 joue aussi un rôle dans l'inhibition de l'anaphase via un autre mécanisme moléculaire influant sur la dégradation de Pds1 (Agarwal et al., 2003). Toutefois, les 3 mutants *chk1Δ*, *pds1Δ* et *chk1Δ pds1Δ* se comportent souvent de façon très semblable en ce qui concerne l'entrée en anaphase et la reprise du cycle du mutant *cdc13-1* (Sanchez et al., 1999; Wang et al., 2001), ce qui suggère que la dégradation de Pds1 est contrôlée principalement par Chk1.

Pour confirmer nos données, nous pourrions suivre l'abondance de la sécurine Pds1 après cassure HO ou traitement à la camptothécine, notamment pour voir si la reprise du cycle précoce que nous observons chez les doubles mutants *ptc2Δ chk1Δ* est concomitante avec la dégradation de Pds1. Cela nous permettrait peut-être également de savoir si le rôle de Chk1 dans l'inhibition de la dégradation de Pds1 est prépondérant par rapport à celui de Rad53 en cas de cassure double-brin et de traitement à la camptothécine, comme cela a été observé chez le mutant *cdc13-1* (Sanchez et al., 1999; Wang et al., 2001), et donc de confirmer ou d'affiner les hypothèses quant au rôle de Chk1 dans la réponse aux stress génotoxiques.

### 3.2.3. Comment expliquer le peu d'effet de la délétion de *CHK1* sur la sensibilité aux stress génotoxiques ?

L'effet de la délétion de *CHK1* sur la progression du cycle après un stress génotoxique est faible, ce qui pourrait expliquer l'absence de sensibilité des mutants *chk1Δ* à la camptothécine, aux rayons UV et  $\gamma$ . Cependant, il est surprenant que la délétion de *CHK1* n'ait pas d'effet sur la viabilité des mutants *cdc13-1* lors de leur retour à température permissive (Sanchez et al., 1999). D'autant plus que ceci semble être le cas même lorsque le retour à température permissive a lieu après que les mutants *cdc13-1 chk1Δ* ont eu le temps de reprendre le cycle, contrairement aux mutants *cdc13-1*. Cela pourrait suggérer que le retard résiduel avant l'entrée en anaphase est suffisant pour que les lésions soient maturées et qu'elles ne soient plus délétères pour la cellule.

Nos résultats montrent aussi un manque de corrélation entre la reprise du cycle après un stress génotoxique et la viabilité à long terme pour ce même stress. Le mutant *ptc2Δ ptc3Δ chk1Δ* sort de mitose bien avant le mutant *ptc2Δ ptc3Δ* lors d'un traitement à la camptothécine, et pourtant la sensibilité des mutants *ptc2Δ chk1Δ* et *ptc2Δ* à cette drogue sont identiques (cf figure n°G12). Nous avons émis l'hypothèse selon laquelle l'activation trop longue du checkpoint pourrait être à l'origine de la sensibilité du mutant *ptc2Δ* à la camptothécine. Il serait intéressant de suivre la cinétique de déphosphorylation de Rad53 en parallèle de la reprise du cycle chez le mutant *ptc2Δ chk1Δ* pour confirmer le fait que l'amont du checkpoint est désactivé plus précocément lorsque *CHK1* est délété. Le cas échéant, cela pourrait suggérer que la sensibilité

des cellules *ptc2Δ* à la camptothécine soit le résultat de l'imbrication de plusieurs phénomènes ou que le rôle de Chk1 ne se limite pas au contrôle de la progression dans le cycle.

### 3.3. *Mad2 et la réponse aux stress génotoxiques*

#### 3.3.1. *Checkpoint de l'ADN et checkpoint du fuseau*

Deux études ont déjà mis en évidence une influence de gènes codant pour les protéines du checkpoint du fuseau sur la réponse aux dommages de l'ADN :

- la délétion de *MAD2* ou *MAD1* affaiblit l'arrêt résiduel en G2/M observé chez le mutant *rad9Δ rad24Δ* traité au MMS. Les triples mutants passent l'anaphase et montrent alors des cellules binuclées contrairement au double mutant (Garber and Rine, 2002),
- la délétion de *MAD2* supprime l'arrêt en G2/M induit par des radiations UV chez le mutant *mec1Δ*. Par contre, elle ne modifie pas la phosphorylation de Rad53 dans ces mêmes conditions : Rad53 reste phosphorylée alors que les cellules ont passé la mitose et sont retournées en phase G1. La délétion de *MAD2* accélère aussi légèrement l'apparition de cellules binuclées chez le mutant *rad53Δ chk1Δ* après relargage de l' $\alpha$ -facteur et irradiation aux UV (Clerici et al., 2004).

Dans ces deux cas, il a été supposé que le checkpoint du fuseau était activé de façon indirecte par les dommages. Le MMS et les UV peuvent en effet créer des dommages au niveau des centromères et empêcher par conséquent un attachement correct des chromatides au fuseau. Il a effectivement été montré que des mutations de l'ADN centromérique conduisent à l'activation du checkpoint du fuseau (Pangilinan and Spencer, 1996). L'arrêt en G2/M d'une sous-population de cellules endommagées pourrait alors être entièrement dépendant du checkpoint du fuseau.

Au cours de notre étude, un rôle de Mad1 et Mad2 dans la réponse aux stress génotoxiques a été mis en évidence suite à une coupure double-brin. Mad1 et Mad2 sont en effet nécessaires au maintien de l'arrêt en G2/M et de la phosphorylation de Rad53 induite par la cassure HO chez des mutants défectueux pour l'adaptation. Les données de la littérature et nos résultats montrent un même effet sur le contrôle de la progression du cycle en cas de dommages : la présence de Mad1 ou Mad2 permet un meilleur arrêt en G2/M. Cependant, dans l'étude de la réponse aux UV du mutant *mec1Δ*, l'effet de la délétion de *MAD2* sur le cycle n'est pas corrélé à un effet sur la phosphorylation de Rad53, contrairement à ce que l'on observe avec la cassure HO. Il faut toutefois souligner que Rad53 ne subit pas de phosphorylation lorsque la cassure HO est induite sur des cellules arrêtées en G1 avec de l' $\alpha$ -facteur ((Ira et al., 2004) et données non montrées) alors que Rad53 est phosphorylée lorsque des cellules arrêtées à l' $\alpha$ -facteur sont irradiées avec des UV (Vialard et al., 1998). Il est possible que la cassure HO et les dommages induits par des UV soient traités de manière différente et que le passage en G1 inhibe le signal émis par la cassure HO. La déphosphorylation de Rad53 que l'on observe pourrait résulter de l'effet sur le cycle.

Nos résultats contrastent toutefois avec les données de la littérature dans le sens où une influence de Mad1 et Mad2 sur la reprise du cycle est visible dans le cas d'un checkpoint de l'ADN « suractivé », alors que pour l'instant leurs influences n'avaient été observées qu'en présence d'un checkpoint de l'ADN non fonctionnel. Les effets de Mad1 et Mad2 sur la reprise du cycle étaient donc indépendants des checkpoints de l'ADN dans ces études. L'implication du

checkpoint du fuseau dans la réponse aux stress génotoxiques en cas de checkpoint de l'ADN fonctionnel n'a jamais été mise en évidence. Ainsi, la délétion de *MAD1* ou *MAD2* n'induit pas d'hypersensibilité aux UV, ni au 4-NQO, ni à la camptothécine, ni à la phléomycine (cf figure n°G18A et données non montrées). Aucune influence de la délétion de *MAD2* sur l'arrêt en mitose n'a été observée que ce soit suite à une irradiation aux UV (Clerici et al., 2004) ou après un traitement au MMS (Garber and Rine, 2002). La cinétique de phosphorylation de Rad53 n'est pas non plus modifiée par cette délétion après une irradiation UV (cf figures n°5A, M10 et M11B, chapitre suivant). L'effet des délétions de *MAD1* ou *MAD2* sur la réponse à la cassure HO est très faible chez la souche sauvage (cf figures n°G15 et G16). Enfin, les délétions de *MAD1*, *MAD2* ou *MAD3* n'ont pas d'impact sur la viabilité des mutants *cdc13-1* après un passage à température restrictive, comme nous l'avons mentionné pour la disruption de *CHK1* (Maringele and Lydall, 2002). L'implication de *MAD1* et *MAD2* dans la réponse aux stress génotoxiques peut bien entendu être mineure et se retrouver masquée par la présence d'un checkpoint de l'ADN complètement fonctionnel.

Le phénotype des mutants *ptc2Δ mad1Δ* et *ptc2Δ mad2Δ* suite à l'induction de la cassure HO est donc singulier dans le sens où il met en évidence un rôle de *MAD2* dans des cellules dont le checkpoint de l'ADN est fonctionnel. Il est difficile de comprendre comment le checkpoint du fuseau participerait au maintien de l'arrêt en G2/M dans ce contexte. En effet, on considère que chez *S. cerevisiae* le checkpoint du fuseau n'est pas activé lors d'une mitose normale. Par ailleurs, la coupure HO est induite à un site unique du génome, situé à environ 85 kb du centromère. Comme la vitesse de résection des extrémités de la coupure est évaluée à 4 kb/heure (Vaze et al., 2002), il est peu probable que le centromère soit dégradé dans les douze heures suivant l'induction de la coupure, avant le redémarrage des cellules dans leur cycle. La cassure HO ne devrait donc pas activer le checkpoint du fuseau dans ces conditions. Cette hypothèse est renforcée par le fait qu'aucune modification de la migration électrophorétique de Mad1 n'est détectée après induction de la coupure HO (cf figure n°G17A). Les effets de Mad1 et Mad2 sur le maintien de l'arrêt en G2/M de mutants d'adaptation après coupure HO semblent donc indépendants de l'activation du checkpoint du fuseau, et pourraient résulter de rôles encore inconnus de ces protéines. Il faut aussi noter que l'implication du checkpoint du fuseau dans la réponse aux stress génotoxiques mise en évidence dans des mutants des checkpoints de l'ADN est expliquée par l'activation du checkpoint du fuseau via des lésions de l'ADN centromérique, mais qu'aucune donnée n'a jamais démontré l'activation du checkpoint du fuseau dans ces conditions. Notre observation que l'activation du checkpoint du fuseau par addition de nocodazole ou par surexpression de *MPS1* ne modifie pas la réponse de la souche sauvage (arrêt du cycle, phosphorylation de Rad53) à une cassure HO (cf figures n°G17C et G17D, et données non montrées) renforce l'idée que l'activation du checkpoint du fuseau n'expliquerait pas forcément les effets de Mad1 et Mad2 que nous observons sur l'inactivation du checkpoint de l'ADN après cassure HO dans des mutants d'adaptation.

Une seule donnée met en évidence une influence de l'activation du checkpoint du fuseau sur la réponse aux stress génotoxiques. Lors de notre étude sur les interactions entre checkpoint du fuseau et checkpoint de l'ADN, nous avons constaté que les phosphorylations de Rad53 et Rad9 induites par des radiations UV étaient modifiées par l'ajout de nocodazole dans le milieu de culture (Clemenson and Marsolier-Kergoat, 2006). Plus précisément, Rad53 est déphosphorylée plus rapidement après une irradiation UV ou un traitement à la phléomycine lorsque le checkpoint du fuseau est activé (Clemenson and Marsolier-Kergoat, 2006). Ces résultats sont différents de ceux obtenus pour la cassure HO, mais dans ce cas-là, nous sommes sûrs que le checkpoint du fuseau est activé. De plus, la délétion de *MAD2* n'a aucune influence sur la



cinétique de phosphorylation de Rad53 après irradiation UV en absence de nocodazole (Clemenson and Marsolier-Kergoat, 2006). Il pourrait donc s'agir de deux mécanismes distincts impliquant les mêmes protéines.

### 3.3.2. *Chk1 et Mad2, une voie commune ?*

Comme les phénotypes que nous observons avec les délétions des gènes *CHK1* et *MAD2* sont identiques, que ce soit en réponse à la cassure HO ou à un traitement à la camptothécine, dans un contexte sauvage, chez le mutant *ptc2Δ* ou chez d'autres mutants d'adaptation, il est tentant d'imaginer que ces effets passent par la même voie.

Chez *S.pombe*, les mutants *mad2Δ* ne sont pas non plus sensibles à l'hydroxyurée, ni au MMS ni aux radiations UV. Par contre, comme Chk1 mais contrairement à Mad1, Bub1 et Mad3, Mad2 est nécessaire à l'arrêt transitoire du cycle observé chez les mutants *cds1* (homologue de *RAD53*) traités avec de l'hydroxyurée (Sugimoto et al., 2004). Par ailleurs, il a été montré que Chk1 possédait deux rôles distincts dans la réponse à la camptothécine. Un premier rôle nécessite sa phosphorylation sur la sérine 345 et est responsable de son implication dans l'arrêt en G2. Le second rôle est mis en évidence par le fait que le mutant *chk1S345A* n'est pas aussi sensible à la camptothécine que le mutant *chk1Δ* et qu'il montre un retard à la transition métaphase/anaphase qui n'est pas observé chez le mutant *chk1Δ* (Collura et al., 2005). Cette résistance à la camptothécine et ce retard résiduels dépendent de *MAD2*. Les mutants *chk1S345A mad2Δ*, *chk1Δ* et *chk1Δ mad2Δ* ont exactement le même phénotype, que ce soit au niveau de la sensibilité à la camptothécine ou de la progression dans le cycle en présence de cette drogue. Ce phénotype est plus sévère que celui des mutants *chk1S345A* et *mad2Δ*. Des arguments génétiques semblent montrer que Mad2 est nécessaire à une partie de la réponse à la camptothécine et qu'elle appartient à la voie dans laquelle agit Chk1 de façon indépendante de sa phosphorylation sur S345 (le second rôle de Chk1) (Collura et al., 2005). Des résultats analogues ont été obtenus avec un mutant *mph1* (Mph1 est l'homologue de Mps1 de *S. cerevisiae*) (Collura et al., 2005). Cette étude suggère que l'effet de la délétion de *MAD2* dépend de la fonctionnalité d'une partie du checkpoint de l'ADN.

Ainsi, il est possible que seul le rôle de S.p.Chk1 indépendant de sa phosphorylation sur S345 soit présent chez S.c.Chk1 puisque l'arrêt en G2 n'existe pas chez *S. cerevisiae*. Mad1 et Mad2 pourraient intervenir dans cette voie et être nécessaires pour empêcher la dégradation de Pds1 ou d'autres cibles clés bloquant le cycle. Ainsi, l'interaction entre Mad2 et Slp1 (Slp1 est l'homologue de Cdc20) chez *S. pombe* semble être plus faible chez le mutant *rad3* (Rad3 est l'homologue de Mec1/Tel1) (Sugimoto et al., 2004). Il serait intéressant de suivre l'abondance et l'état de phosphorylation de Pds1 suite à une cassure HO ou à un traitement à la camptothécine lorsque *MAD2* est délété. Je pense qu'une voie commune à Chk1 et Mad2 est une piste intéressante à étudier. D'autant plus que le rôle de Chk1 dans la réponse aux stress génotoxiques est parfois plus visible après une synchronisation au nocodazole (Liu et al., 2000; Sanchez et al., 1999), et que le mutant *chk1Δ* est légèrement plus sensible que la souche sauvage aux radiations  $\gamma$  seulement si les souches sont préalablement traitées au nocodazole (Liu et al., 2000).

### 3.4. *Le mécanisme d'action de Glc7 ?*

L'effet de la surexpression de *GLC7* sur l'inactivation des checkpoints de l'ADN n'est

visible que dans un contexte de checkpoint « suractivé ». Cela peut être dû, comme nous l'avons souligné, au fait que seule une surexpression modérée a pu être étudiée, la délétion et une forte surexpression de *GLC7* étant létales. Mais cela peut aussi être révélateur d'une implication mineure ou indirecte de Glc7 dans les mécanismes de surveillance de l'ADN. Or, Glc7 est impliquée dans de nombreux processus cellulaires. Nous avons donc cherché par le biais de quelle voie connue Glc7 pourrait agir. Deux pistes ont été explorées.

### 3.4.1. *Glc7 et Mad2*

Au cours de la mitose, Glc7 antagonise la protéine kinase Ipl1 qui est impliquée dans la régulation de plusieurs processus cellulaires comme la ségrégation des chromatides sœurs et la condensation des chromosomes. Glc7 apparaît comme la phosphatase capable de déphosphoryler les cibles d'Ipl1, et ce couple kinase/phosphatase régule ainsi l'état de phosphorylation de protéines du kinétochore (comme Ndc10) ou de protéines impliquées dans la ségrégation des chromosomes (comme Dam1). Le checkpoint du fuseau bloque certains mutants *glc7* en mitose, probablement parce qu'il détecte dans ces mutants des défauts de liaison kinétochores/microtubules.

Nous avons fait l'hypothèse que la surexpression de *GLC7* affaiblit le checkpoint du fuseau et que ce dernier est nécessaire dans une certaine mesure à la réponse aux stress génotoxiques. Cependant, aucune donnée expérimentale ne nous permet de penser que la surexpression de *GLC7* via le plasmide centromérique a un effet sur le checkpoint du fuseau. Des tests plus précis permettraient peut-être d'obtenir des résultats. Mais l'effet de Glc7 que nous observons chez le mutant *ptc2Δ* après cassure HO est du même ordre que celui que nous observons avec les délétions de *MAD1* ou *MAD2*. Ceci me fait penser qu'un impact de Glc7 sur l'inactivation du checkpoint de l'ADN médié par le checkpoint du fuseau ne serait concevable que si la surexpression de *GLC7* influençait de manière significative l'activation du checkpoint du fuseau. Par ailleurs, comme nous l'avons souligné, il n'est pas évident que le checkpoint du fuseau soit activé après induction de la cassure HO. Il reste l'hypothèse, difficile à tester pour le moment, que Glc7 influencerait une fonction de Mad2 indépendante du checkpoint du fuseau qui serait responsable de l'implication de Mad2 dans l'hyperactivation du checkpoint de l'ADN après cassure HO chez les mutants d'adaptation.

L'étude du mutant *ipl1-321* pour mimer la surexpression de *GLC7* ou des mutants *glc7* qui s'arrêtent en mitose de manière dépendante du checkpoint du fuseau (par exemple les mutants *glc7-10* et *glc7-129*) pourrait permettre de compléter cette analyse.

### 3.4.2. *Glc7 et Chk1*

L'article de N.R. den Elzen et M.J. O'Connell publié en 2004 montrant l'implication d'une des sous-unités catalytiques de la PP1 chez *S. pombe* dans la réponse aux stress génotoxiques (den Elzen and O'Connell, 2004) nous a amenés à nous demander si l'effet de Glc7 sur l'inactivation des checkpoints de l'ADN ne résultait pas d'un effet de Glc7 sur Chk1. Ainsi, des éléments indiquant que la PP1c de *S. pombe* déphosphoryle directement Chk1 nous ont conduits à tester si ce mécanisme pouvait être conservé chez *Saccharomyces cerevisiae*.

Cependant, aucune interaction physique n'a pu être mise en évidence entre Chk1 et Glc7. De plus, aucune incidence forte de la surexpression de *GLC7* sur l'état de phosphorylation de Chk1 n'a été constatée, contrairement à ce qu'il en est chez *S. pombe*. L'étude de différents mutants *glc7* nous permettrait peut-être de savoir si Glc7 est vraiment nécessaire à la

déphosphorylation de Chk1 au cours des mécanismes d'adaptation et de rétablissement. Nous pourrions aussi peut-être confirmer un impact de la désactivation de Chk1 sur le checkpoint de l'ADN, et notamment sur l'état de phosphorylation de Rad53, en testant l'influence de la délétion de *CHK1* sur la létalité induite par l'allèle *tetO-RAD53-GFP*.

### 3.4.3. Perspectives pour l'étude de Glc7 dans la régulation du checkpoint de l'ADN

L'hypothèse que Glc7 pourrait exercer ses effets sur l'inactivation du checkpoint de l'ADN ou la sensibilité à la camptothécine en déphosphorylant directement Rad53 demeure plausible. Nous avons tenté de la tester en analysant la sensibilité à la camptothécine de mutants *rad53Δ* et *ptc2Δ rad53Δ* surexprimant *GLC7*. Cependant, les résultats n'étaient pas exploitables car non reproductibles. Les transformations effectuées pour obtenir ces souches étaient caractérisées par la présence de clones hétérogènes qui montraient de surcroît des phénotypes distincts. Nous ne pourrions obtenir un résultat clair qu'en construisant les souches par croisement. L'étude de la phosphorylation de Rad53 en présence de l'allèle *tetO-RAD53-GFP* pourrait aussi nous apporter des éléments d'information.

Glc7 pourrait également intervenir en amont du checkpoint et être par exemple nécessaire à la déphosphorylation de Rad9 au cours des processus d'adaptation et de rétablissement. Il a en effet été montré chez les mammifères que PP1 $\alpha$  interagit avec et est capable de déphosphoryler Brca1 *in vitro* (Brca1 est un des homologues putatifs de Rad9 chez les mammifères) et que la surexpression de PP1 $\alpha$  inhibe partiellement l'hyperphosphorylation de Brca1 induite par des radiations ionisantes *in vivo* (Liu et al., 2002). Par ailleurs, chez *Schizosaccharomyces pombe*, la déphosphorylation de la thréonine 215 de Crb2 est indispensable au rétablissement suite à une irradiation UV, alors que sa phosphorylation n'est pas requise pour l'activation du checkpoint (Esashi and Yanagida, 1999). Or, il a été montré que la phosphorylation de Crb2 induite par une irradiation UV était légèrement atténuée lorsque Dis2 est surexprimée (l'état de phosphorylation de la thréonine 215 n'a toutefois pas été précisément analysé) (den Elzen and O'Connell, 2004). Par ailleurs, des éléments indiquent que Glc7 est impliquée dans l'adaptation suite à l'activation du checkpoint du pachytène en méiose. Notamment, la surexpression de *GLC7* semble affaiblir l'arrêt en G2/prophase observé chez les mutants de la recombinaison (Bailis and Roeder, 2000). Or, au cours de ce processus, Glc7 pourrait déphosphoryler Red1, une protéine impliquée dans le checkpoint du pachytène et qui semble jouer le rôle d'adaptateur entre Mec1 et Mek1 (homologue de Rad53). En effet, il a, entre autres, été montré que Glc7 interagissait avec Red1 et qu'elle déphosphorylait Red1 *in vitro* (Bailis and Roeder, 2000). L'hypothèse selon laquelle Glc7 déphosphorylerait Rad9 au cours des phénomènes d'adaptation et de rétablissement permettrait d'expliquer l'effet de Glc7 sur la cinétique de phosphorylation de Rad53 et la désactivation globale du checkpoint de l'ADN.

Il est possible que l'effet de la surexpression de *GLC7* sur la reprise du cycle et la phosphorylation de Rad53 lors d'un traitement à la camptothécine ou d'une cassure HO et l'effet de Glc7 sur la sensibilité à la camptothécine soient le résultat de deux mécanismes distincts. En tout cas, il est clair que le premier n'implique pas le second puisque la délétion de *CHK1* ne supprime pas l'hypersensibilité du mutant *ptc2Δ* à la camptothécine alors qu'elle accélère la reprise du cycle chez ce même mutant lors d'un traitement à la camptothécine. Je pense que des tests d'épistasie sur milieu solide contenant de la camptothécine avec des mutants du checkpoint de l'ADN seraient un moyen efficace pour orienter notre étude et mieux comprendre le moyen

d'action de Glc7 sur l'inactivation de ce mécanisme de surveillance. Ceci devrait être complété par une caractérisation plus exhaustive de l'influence de la surexpression de *GLC7* sur la réponse aux dommages de l'ADN. L'étude des interactions entre *GLC7* et le mutant *cdc13-1* pourrait par exemple permettre de confirmer l'implication de Glc7 dans les processus d'adaptation et de rétablissement et de comparer les effets de Glc7 et Chk1 pour ce stress bien particulier. Par ailleurs, la surexpression de *GLC7* restaure la viabilité du mutant *ptc2Δ* sur milieu contenant du 4-NQO (données non montrées). L'étude de la progression du cycle après un traitement au 4-NQO serait ainsi intéressante. La recherche d'autres mutants sensibles à la camptothécine et chez lesquels une restauration de la viabilité via la surexpression de *GLC7* n'est pas observée pourrait également être informative. La caractérisation de la réponse de différents mutants *glc7* aux dommages de l'ADN pourrait également être très instructive. Enfin, nous ne pouvons exclure que la surexpression de *GLC7* favorise la sortie de mitose et que la déphosphorylation précoce de Rad53 qu'elle induit chez le mutant *ptc2Δ* après une cassure HO soit indirectement due à un retour des cellules en G1. Nous pourrions utiliser le système Gal-Pds1-mdb (O.Cohen-Fix) pour bloquer le cycle et tester si la déphosphorylation de Rad53 est une simple conséquence de la progression dans le cycle.

L'étude de la régulation de Glc7 en cas de dommages de l'ADN pourrait constituer un autre champ d'investigation. Il a été montré chez *S. pombe* et chez les mammifères que Dis2 et les isoformes PP1 $\alpha$  et PP1 $\delta$  étaient des phosphoprotéines et que leur phosphorylation inhibait leur activité (Guo et al., 2002; Yamano et al., 1994). De plus, une déphosphorylation de PP1 $\alpha$  et PP1 $\delta$  dépendante d'ATM a été observée suite à des radiations ionisantes (Guo et al., 2002). Cependant, le site de phosphorylation plus particulièrement mis en cause ne semble pas être présent chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* (Yamano et al., 1994).

Nous avons souligné en introduction le fait que l'existence de nombreuses sous-unités régulatrices pourrait être à l'origine du caractère pléiotrope de la PP1c. Il serait intéressant de savoir quelle(s) sous-unité(s) régulatrice(s) participe(nt) à la fonction de Glc7 dans l'inactivation des checkpoints de l'ADN. Plusieurs sous-unités déjà connues sont intéressantes, parce qu'elles régulent l'activité de Glc7 au cours de la mitose ou au cours de l'adaptation en méiose :

- *GLC8* : Glc8 est comme Glc7 nécessaire à une accumulation normale de glycogène et est un inhibiteur de Glc7 *in vitro* (Tung et al., 1995). Le fait que *GLC8* montre des interactions génétiques avec le mutant *ipl1-1* est intéressant : la délétion et la surexpression de *GLC8* suppriment le défaut de croissance de ce mutant à température restrictive (Tung et al., 1995) suggérant un ou plusieurs rôle(s) de Glc8 au cours de la mitose.
- *SDS22* : la surexpression de *SDS22* supprime la thermosensibilité et l'accumulation en G2/M à température restrictive du mutant *glc7-12* (MacKelvie et al., 1995). L'étude d'allèles thermosensibles de *SDS22* suggère une contribution de Sds22 aux fonctions mitotiques de Glc7. Les mutants *sds22* thermosensibles montrent un fort taux de perte de chromosomes. Ces mutations *sds22*, tout comme les mutations *glc7-127* et *glc7-129*, suppriment partiellement le caractère thermosensible du mutant *ipl1-2* (Hsu et al., 2000; Peggie et al., 2002). La surexpression de *GLC7* supprime partiellement la thermosensibilité de ces mutants *sds22* (Peggie et al., 2002). De plus, ces mutants *sds22* montrent une localisation

de Glc7 sous forme de foci intenses mais pas forcément situés dans le noyau à température restrictive, contrairement à la localisation diffuse nucléaire observée chez la souche sauvage (Peggie et al., 2002). La surexpression de *SDS22* restaure aussi la viabilité du mutant *ipl1-321* à température restrictive (Pinsky et al., 2006). *Sds22* pourrait affecter l'activité, la localisation, voire être une chaperone de Glc7.

- *BUD14* : Bud14 semble être responsable du recrutement de Glc7 au niveau du cortex du bourgeon où la phosphatase pourrait réguler les interactions microtubules/cortex nécessaires au positionnement du fuseau en mitose (Knaus et al., 2005). Il a par ailleurs été montré que la surexpression de *BUD14* supprimait la thermosensibilité du mutant *ipl1-321*, ce qui pourrait suggérer que Bud14 est également impliquée dans la régulation des interactions kinétochores/microtubules (Pinsky et al., 2006).
- *FPR3* : la délétion de *FPR3* et la surexpression de *GLC7*, affaiblissent l'arrêt dépendant du checkpoint du pachytène observé chez les mutants de la recombinaison, et ne montrent pas d'effet additif. La surexpression de *FPR3* exacerbe l'arrêt de ces mutants et supprime l'effet de la surexpression de *GLC7*. Ainsi, *Fpr3* semble permettre le maintien du checkpoint du pachytène, probablement en inhibant Glc7 (Hochwagen et al., 2005). Il serait intéressant de tester si *Fpr3* a un rôle analogue dans le checkpoint de l'ADN en mitose.

J'ai testé la sensibilité à la camptothécine de plusieurs souches délétées pour des sous-unités régulatrices connues de Glc7. Parmi les délétants *bud14Δ*, *gac1Δ*, *gip1Δ*, *gip2Δ*, *gip3Δ*, *gip4Δ*, *glc8Δ*, *pig1Δ*, *pig2Δ*, *red1Δ*, *reg1Δ*, *reg2Δ*, *shp1Δ* issus de la banque EUROSCARF, seul le mutant *bud14Δ* exhibe une hypersensibilité à la camptothécine et au 4-NQO sans montrer un défaut de croissance majeur en absence de stress génotoxique. Il est intéressant de noter qu'une interaction physique a été détectée entre Bud14 et Rad53 (Smolka et al., 2006). Cependant, la surexpression de *GLC7* n'a aucune influence sur l'hypersensibilité des cellules *bud14Δ* à la camptothécine et le mutant *bud14Δ* ne montre pas de défaut d'adaptation après cassure HO (données non montrées). Par ailleurs, l'interaction entre Bud14 et Rad53 pourrait être liée aux rôles de ces protéines dans la croissance polarisée (Cullen and Sprague, 2002; Smolka et al., 2006).

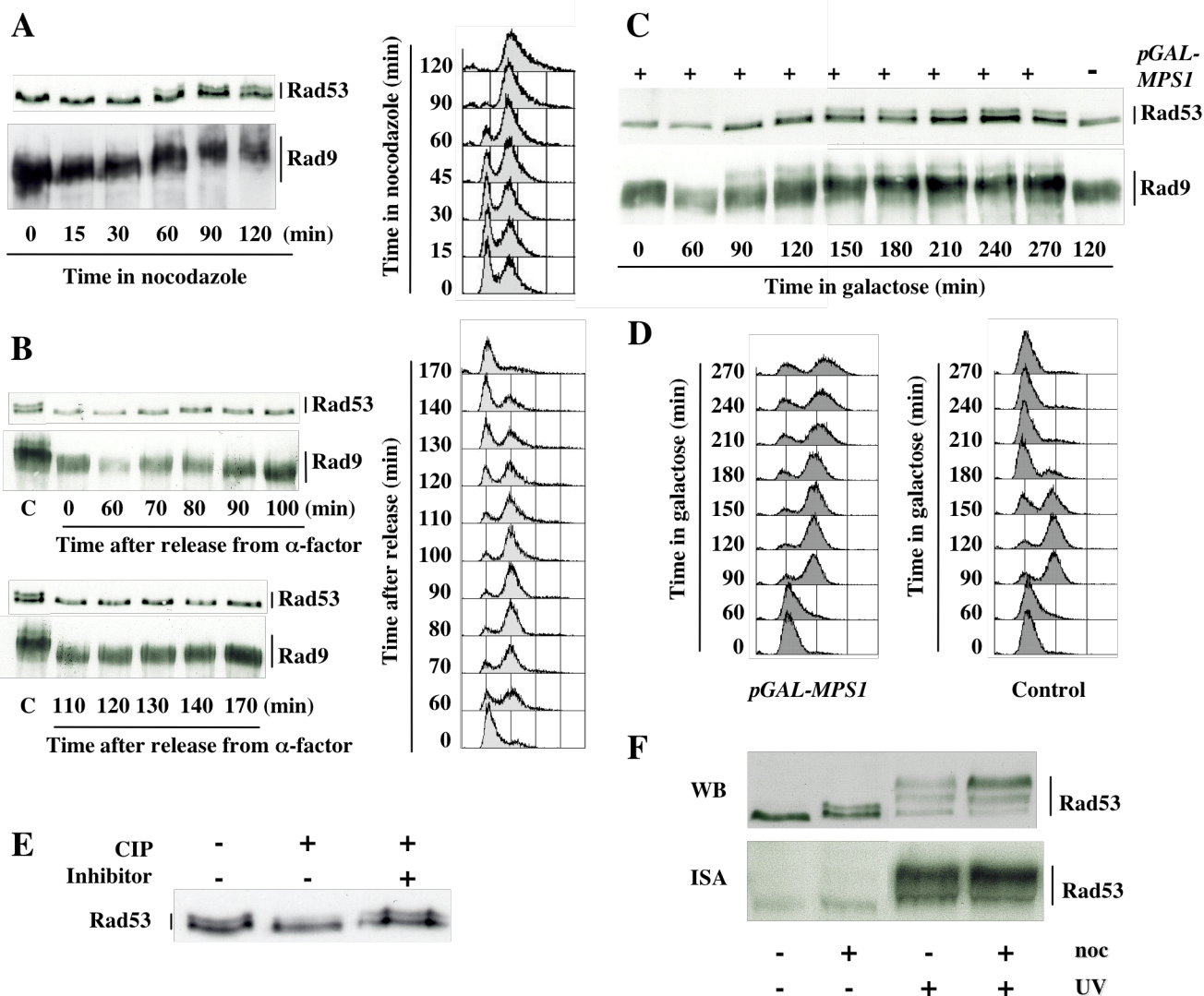
# **Les phosphorylations de Rad53 et Rad9 induites par le checkpoint du fuseau**

## **1. Contexte**

Pour que le matériel génétique soit transmis de façon correcte au cours du cycle mitotique, l'ADN doit d'abord être correctement répliqué avant d'être ségrégué de façon équitable dans les deux cellules-filles. Au cours du cycle, l'intégrité de la double hélice peut être altérée par de nombreux dommages spontanés. On estime ainsi que la perte de base suite à une hydrolyse spontanée d'une liaison N-glycosidique est de l'ordre de 10 000 événements par jour et par cellule chez les mammifères (Rouse and Jackson, 2002a). Des dommages de l'ADN peuvent aussi être induits par des agents extérieurs comme les rayonnements ultraviolets, les produits chimiques mutagènes ou les espèces oxydantes générées par des rayonnements ionisants (rayons gamma ou particules élémentaires). Ainsi, la transmission d'un patrimoine génétique intact aux cellules-filles repose en partie sur des mécanismes de surveillance qui sont activés en réponse à des problèmes au niveau de la réplication, de la ségrégation ou de l'intégrité même de l'ADN. Les checkpoints de l'ADN sont activés en cas de lésions de l'ADN ou suite à un stress réplicatif, alors que le checkpoint du fuseau est activé en cas de problèmes au niveau de l'attachement kinétochore/microtubule. L'activation de ces systèmes de contrôle conduit entre autres à un arrêt ou une pause dans la progression du cycle. Chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*, la transition métaphase/anaphase est un point d'arrêt commun au checkpoint de l'ADN et au checkpoint du fuseau. Ceci n'est pas le cas chez la levure fissipare et chez les cellules de mammifères où le checkpoint de l'ADN bloque le cycle de façon plus précoce, puisqu'il empêche l'entrée en mitose. Chez *S. cerevisiae*, il a été montré que les deux mécanismes de surveillance agissaient sur des cibles communes pour freiner la progression du cycle, à savoir la sécurine Pds1 et le réseau MEN.

À ce jour, les deux checkpoints sont globalement étudiés de façon distincte. Toutefois, on peut trouver dans la littérature quelques données qui suggèrent que des interconnexions existent entre les deux (cf discussion). Par ailleurs, nous avons vu au cours de l'étude sur la phosphatase Glc7 que la délétion de *MAD1* ou *MAD2* accélérerait la reprise du cycle et la déphosphorylation de Rad53 chez plusieurs mutants d'adaptation. En parallèle des travaux effectués sur Glc7, j'ai pu mettre en évidence un autre lien entre checkpoint de l'ADN et checkpoint du fuseau au cours de ma thèse. J'ai en effet montré que les protéines Rad9 et Rad53, deux composants centraux des mécanismes de surveillance de l'ADN, sont modifiées suite à l'activation du checkpoint du fuseau. La caractérisation de ces modifications et la discussion de leurs significations physiologiques ont fait l'objet d'une publication insérée en annexe (Clemenson and Marsolier-Kergoat, 2006). Dans la suite du manuscrit, je récapitule brièvement les données présentées dans l'article, et j'apporte quelques éléments d'information complémentaires. La plupart de ces résultats complémentaires n'ont été observés qu'une seule fois et sont donc à prendre avec précaution. De plus, certaines de ces expériences méritent d'être améliorées pour avoir un résultat plus clair et tranché. Je joins également à cette partie les figures qui correspondent à certaines données non montrées mentionnées dans l'article. Les renvois aux figures concernent les figures nouvellement intégrées (« figures n°MX ») et les figures de l'article (« figures n°X »). Pour faciliter la lecture, j'ai réintégré ci-dessous les figures de l'article (Clemenson and Marsolier-Kergoat, 2006).

Figure 1 (Clémenson et al., 2006)



**Figure 1. Activation of the spindle assembly checkpoint triggers changes in the phosphorylation states of Rad53 and Rad9.**

(A) Nocodazole (15  $\mu$ g/ml) was added at t = 0 min to an asynchronous culture of wild-type cells containing a *RAD9::myc* allele (MCM403). Aliquots were taken at the indicated times after addition of nocodazole and analyzed by FACS and by western blotting using anti-Rad53 and anti-myc antibodies.

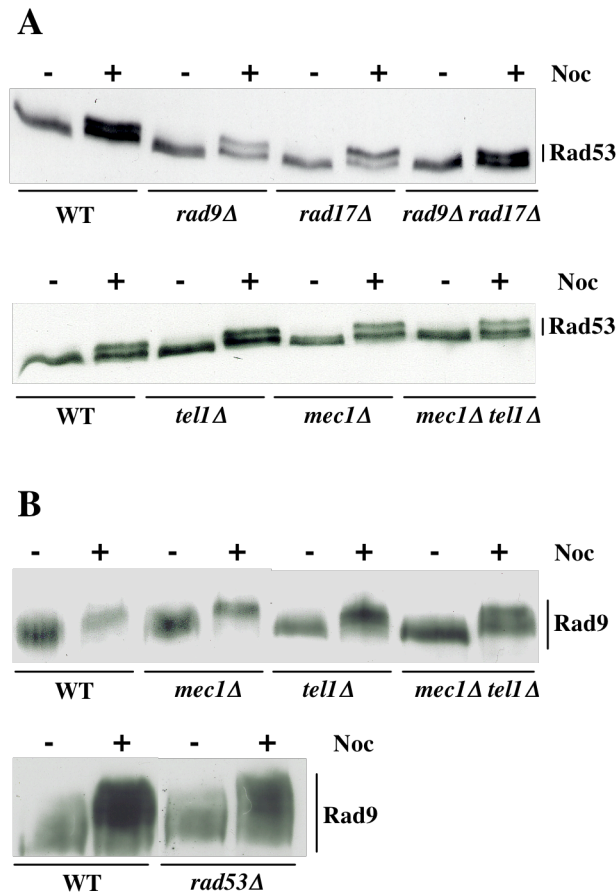
(B) Exponentially growing wild-type cells harboring a *RAD9::myc* allele (MCM403) were synchronized in G1 phase with  $\alpha$ -factor, washed thrice and released into fresh medium. When the majority of the cells have rebudded after release,  $\alpha$ -factor was added back to the culture to prevent a second cell cycle. Samples were collected at the indicated times after release from  $\alpha$ -factor block and analyzed as above by FACS and by western blotting. C, extracts from MCM403 cells after a two-hour nocodazole treatment.

(C, D) Wild-type cells harboring a *RAD9::myc* allele (MCM403) and containing either the empty vector p416GAL1 (Control) or the p416GAL1/*MPS1* plasmid expressing *MPS1* under the control of a galactose-inducible promoter were grown to the exponential phase in raffinose medium, synchronized in G1 with  $\alpha$ -factor, washed thrice and resuspended at t = 0 min in galactose medium so as to induce *MPS1* expression. At t = 135 min,  $\alpha$ -factor was added back to the culture to prevent extra cell cycling. Aliquots were taken at the indicated times after galactose induction and analyzed by western blotting (C) and by FACS (D) as above.

(E) Western blot analysis of total protein extracts from nocodazole-treated wild-type cells (MCM336) incubated in the presence (+) or absence (-) of Calf Intestine Phosphatase (CIP), and in the presence (+) or absence (-) of phosphatase inhibitors.

(F) Wild-type cells (MCM185) either treated with nocodazole (noc, 15  $\mu$ g/ml) during 90 min or left untreated were either immediately collected or UV-irradiated (40 J/m<sup>2</sup>) and subsequently harvested. Whole cell extracts were then analyzed by Western blot (WB) and Rad53 autophosphorylation activity was assessed by an *in situ* renaturation assay (ISA).

Figure 2 (Clémenson et al., 2006)

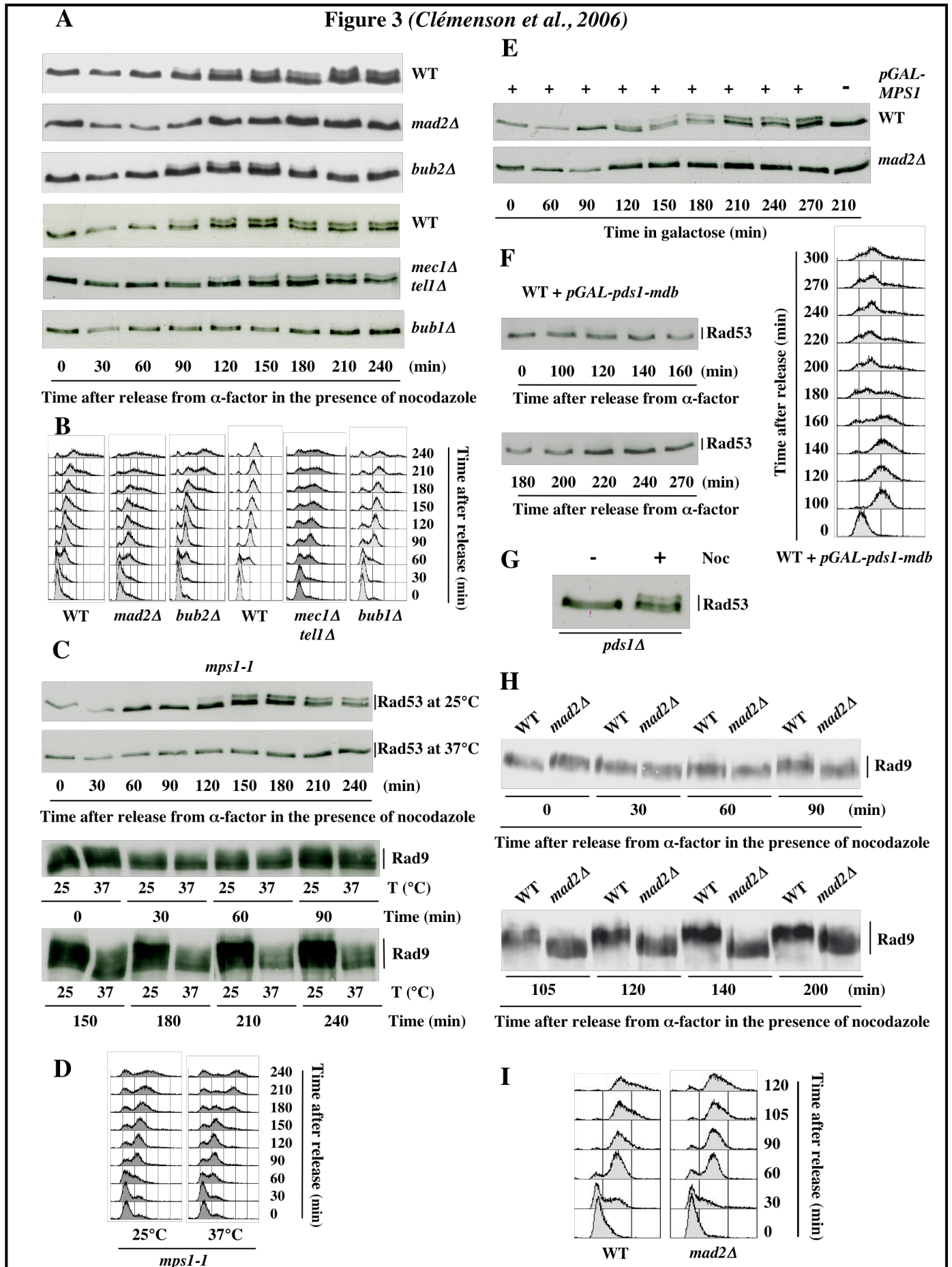


**Figure 2. Nocodazole-induced phosphorylations of Rad53 and Rad9 are independent of other components of the DNA checkpoints.**

(A) Asynchronous cultures of wild-type (MCM001) and mutant *rad9Δ* (MCM215), *rad17Δ* (MCM181), *rad9Δ rad17Δ* (MCM275), *mec1Δ* (L141), *tell1Δ* (L149) and *mec1Δ tell1Δ* (L140) strains were collected before (-) or after (+) a 2 hour-treatment with nocodazole (noc, 15 mg/ml). Total protein extracts were analyzed by western blotting using anti-Rad53 antibodies.

(B) Asynchronous cultures of wild-type (MCM403) and mutant *mec1Δ* (L141), *tell1Δ* (L149), *mec1Δ tell1Δ* (L138) and *rad53Δ* (L145) strains harboring the *RAD9::myc* allele were harvested before (-) or after (+) a 2 hour-treatment with nocodazole (noc, 15 mg/ml). Total protein extracts were analyzed by western blotting using anti-myc antibodies.





**Figure 3 (Clémenson et al., 2006)****Figure 3. Nocodazole-induced phosphorylations of Rad53 and Rad9 depend on the components of the spindle assembly checkpoint.**

(A, B) Wild-type (MCM185) and *mad2Δ* (L78), *bub1Δ* (L241), *bub2Δ* (L108) and *mec1Δ tel1Δ* (L286) mutant cells were arrested in G1 with  $\alpha$ -factor, washed thrice and released into nocodazole-containing medium. Cell aliquots were taken at the indicated times after release from  $\alpha$ -factor block and analyzed by western blotting using anti-Rad53 antibodies (A) and by FACS (B).

(C, D) *mps1-1* (L300) cells were synchronized in G1 with  $\alpha$ -factor at permissive temperature (25°C), washed thrice and released into nocodazole-containing medium either at permissive (25°C) or restrictive temperature (37°C). Cell aliquots were taken at the indicated times after release from  $\alpha$ -factor block and analyzed by western blotting (C) and by FACS (D).

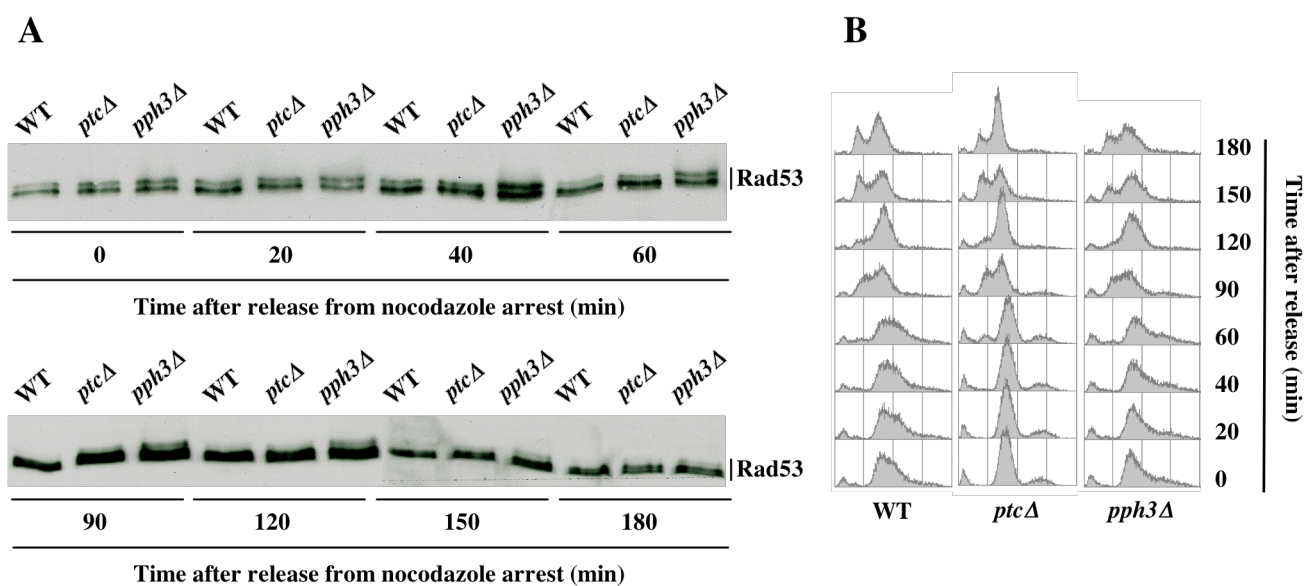
(E) Wild-type (MCM403) and *mad2Δ* (L78) cells containing the p416GAL1/*MPS1* plasmid expressing *MPS1* under the control of a galactose-inducible promoter were grown to the exponential phase in raffinose medium, synchronized in G1 with  $\alpha$ -factor, washed thrice and resuspended at t = 0 min in galactose medium so as to induce *MPS1* expression. At t = 135 min,  $\alpha$ -factor was added back to the culture to prevent extra cell cycling. Rad53 phosphorylation was analyzed by western blotting using anti-Rad53 antibodies.

(F) Wild-type (L208) cells containing the pOC57-HA plasmid expressing *pds1-mdb* under the control of a galactose-inducible promoter were grown to the exponential phase in raffinose medium, synchronized in G1 with  $\alpha$ -factor, washed thrice and resuspended at t = 0 min in galactose medium so as to induce *pds1-mdb* expression. At t = 100 min,  $\alpha$ -factor was added back to the culture to prevent extra cell cycling. Rad53 phosphorylation was analyzed by western blotting using anti-Rad53 antibodies.

(G) An asynchronous culture of *pds1Δ* (L199) cells was collected before (-) or after (+) a 3 hour-treatment with nocodazole (noc, 15 mg/ml). Total protein extracts were analyzed by western blotting using anti-Rad53 antibodies.

(H, I) Wild-type (MCM403) and *mad2Δ* (L78) mutant cells carrying the *RAD9::myc* allele were arrested in G1 with  $\alpha$ -factor, washed thrice and released into nocodazole-containing medium. Samples were retrieved at the indicated times after release from  $\alpha$ -factor block and analyzed by western blotting using anti-myc antibodies (H) and by FACS (I).

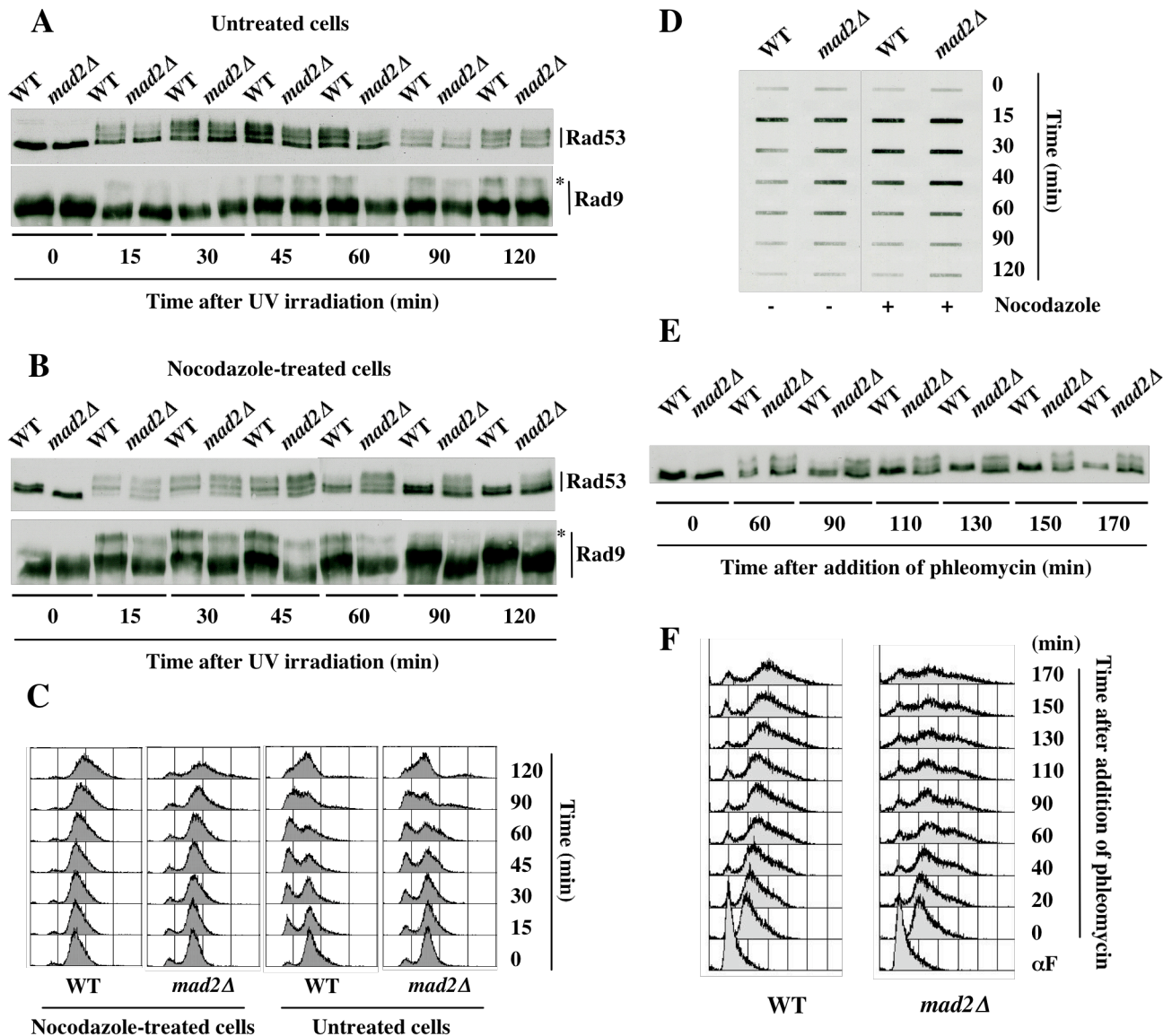
Figure 4 (Clémenson et al., 2006)



**Figure 4. Rad53 dephosphorylation upon nocodazole treatment is delayed in *pph3Δ* cells.**

Asynchronous cultures of wild-type (MCM185) and mutant *ptc2Δ ptc3Δ* (*ptcΔ*, L281) and *pph3Δ* (L289) strains were treated with nocodazole for 2.5 hours and subsequently released from nocodazole arrest at  $t = 0$  min. Aliquots were harvested at the indicated time points and analyzed by western blotting using anti-Rad53 antibodies (A) and by FACS (B).

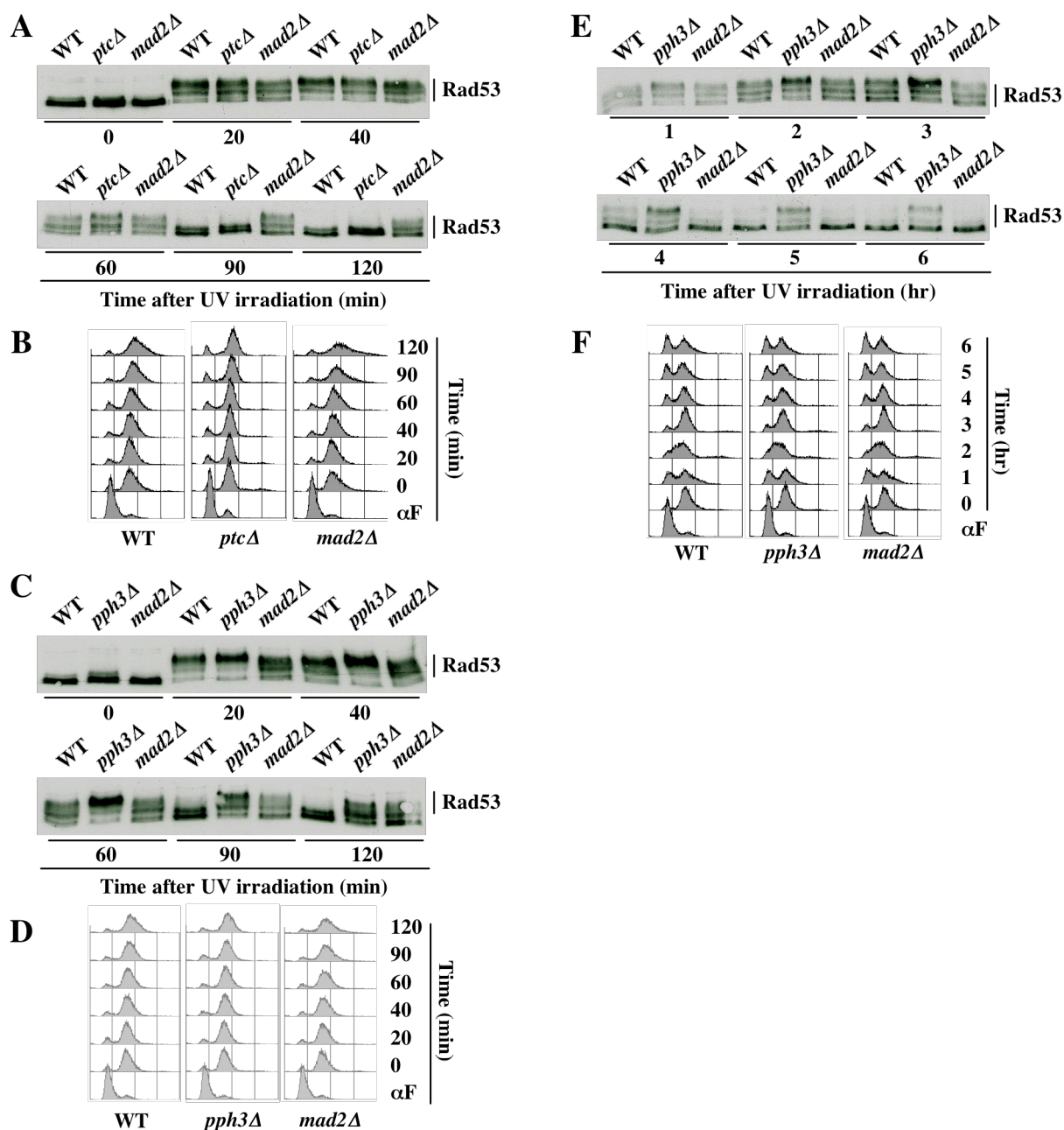
Figure 5 (Clémenson et al., 2006)


**Figure 5. Nocodazole treatment accelerates Rad53 inactivation after DNA damage.**

(A-D) Wild-type (MCM403) and *mad2Δ* (L78) mutant cells were arrested in G1 with  $\alpha$ -factor, washed thrice and released into fresh medium in the absence (untreated cells) or in the presence of nocodazole (15 mg/ml, nocodazole-treated cells). After 90 min both nocodazole-treated and untreated cells were synchronized in G2/M. They were then UV-irradiated ( $40 \text{ J/m}^2$ ) at  $t = 0$  min and further grown in fresh medium in the presence or absence of nocodazole as before. Aliquots were taken at the indicated times after UV irradiation and analyzed by western blotting (A, B) and by FACS (C). The asterisk marks the presence of Rad9 hyperphosphorylated forms. For each time point the extent of DNA repair was monitored by immunoblotting genomic DNA with the TDM-2 antibody against cyclobutane pyrimidine dimers (D).

(E, F) Wild-type (MCM185) and *mad2Δ* (L48) mutant cells were arrested in G1 with  $\alpha$ -factor, washed thrice and released into fresh medium in the presence of nocodazole. After 2 hrs of nocodazole treatment, whereas the cells were synchronized in G2/M, phleomycin (10 mg/ml) was added to the culture (this defined  $t = 0$  min). At  $t = 60$  min, the cells were washed again and resuspended into fresh medium with nocodazole but without phleomycin. Samples were analyzed by western blotting using anti-Rad53 antibodies (E) and by FACS (F).

Figure 6 (Clémenson et al., 2006)



**Figure 6. PPH3 deletion strongly affects Rad53 dephosphorylation after UV irradiation.**

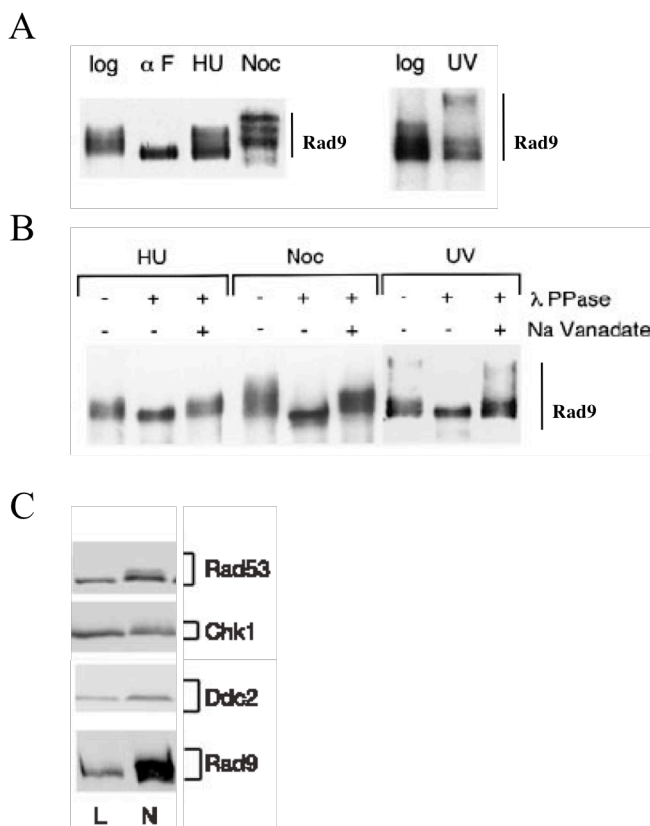
(A-D) Asynchronous cultures of wild-type (MCM185), *mad2Δ* (L48), *ptc2Δ ptc3Δ* (*ptcΔ*, L281) and *pph3Δ* (L289) cells were synchronized in G1 with  $\alpha$ -factor, washed thrice and released into fresh medium in the presence of nocodazole. After 90 min G2/M-arrested cells were UV-irradiated ( $40 \text{ J/m}^2$ ) at  $t = 0$  min and further grown in fresh medium in the presence of nocodazole. Aliquots were taken at the indicated times after UV irradiation and analyzed by western blotting using anti-Rad53 antibodies (A, C) and by FACS (B, D).

(E, F) Asynchronous cultures of wild-type (MCM185), *mad2Δ* (L48) and *pph3Δ* (L289) cells were synchronized in G1 with  $\alpha$ -factor, washed thrice and released into fresh medium (without nocodazole). After 90 min the G2/M-synchronized cells were UV-irradiated ( $40 \text{ J/m}^2$ ) at  $t = 0$  min. Samples were retrieved at the indicated times after UV irradiation and analyzed by western blotting using anti-Rad53 antibodies (E) and by FACS (F).

## 2. Résultats

Si l'on traite au nocodazole des cellules en phase exponentielle, on peut observer en Western-Blot l'apparition de modifications pour les protéines Rad9 et Rad53 (cf figure n° 1A). Ces modifications sont visibles mais souvent non mentionnées explicitement dans d'autres articles (Ira et al., 2004; Vialard et al., 1998). Ainsi, la modification de Rad53 que l'on peut voir sur la figure n°M1C n'est pas commentée dans l'article correspondant. Quant à celle de Rad9 (cf figures n°M1A et M1B), elle est considérée comme une modification inhérente à la phase G2/M. Ces modifications correspondent à des phosphorylations, puisqu'elles ne sont plus présentes si l'on traite les extraits protéiques avec de la CIP (« Calf Intestine Phosphatase ») ou de la phosphatase  $\lambda$  (cf figures n°M1B et 1E). Les phosphorylations induites par le nocodazole entraînent des changements de migration électrophorétique différents de ceux qui sont induits par les phosphorylations engendrées par des radiations ultraviolettes (cf figures n°1F, M1A et M1B). J'ai également pu remarquer que la phosphorylation de Rad53 induite par le nocodazole est différente de celle induite par un traitement au 4-NQO, à la camptothécine, à l'hydroxyurée ou par une cassure HO (données non montrées). La phosphorylation de Rad9 induite par le nocodazole est également différente de celle induite par un traitement au MMS ou une irradiation  $\gamma$  (Vialard et al., 1998). Ces modifications sont donc différentes, pour Rad53 comme pour Rad9, de celles obtenues après un stress génotoxique.

Figure n°M1



**Les modifications de Rad9 et Rad53 induites par le nocodazole dans la littérature.**

- A. Figure n°1A de (Vialard et al., 1998). Analyse par Western-Blot d'extraits totaux de protéines de cellules d'une souche sauvage en phase exponentielle (log), synchronisées avec de l' $\alpha$ -facteur ( $\alpha$ F), de l'hydroxyurée (HU) ou du nocodazole (Noc), ou irradiées aux UV 40 J/m<sup>2</sup> (UV).
- B. Figure n°1C de (Vialard et al., 1998). Analyse par Western-Blot d'extraits totaux de protéines de cellules d'une souche sauvage synchronisées avec de l'hydroxyurée (HU) ou du nocodazole (Noc), ou irradiées aux UV (UV). Ces extraits ont été incubés en présence ou en absence de phosphatase  $\lambda$  et en présence ou en absence d'inhibiteur de phosphatase.
- C. D'après la figure n°1 de (Ira et al., 2004). Analyse par Western-Blot des protéines Rad53, Chk1, Ddc2 et Rad9 pour des cultures de cellules en phase exponentielle (L) ou synchronisées au nocodazole (N).

La protéine Rad53 présentes dans les extraits de cellules traitées au nocodazole migre dans un gel de polyacrylamide sous la forme de deux bandes : la forme migrant le plus rapidement correspond à la forme de Rad53 présente dans les cellules non stressées, la forme migrant le moins rapidement correspond à la forme phosphorylée de Rad53 induite par la présence de nocodazole dans le milieu de culture. Pour simplifier, nous nommerons « doublet » l'ensemble formé par ces deux bandes observées en Western-Blot dans la suite du manuscrit.

## ***2.1. Les modifications de Rad9 et Rad53 induites par le nocodazole sont dépendantes du checkpoint du fuseau.***

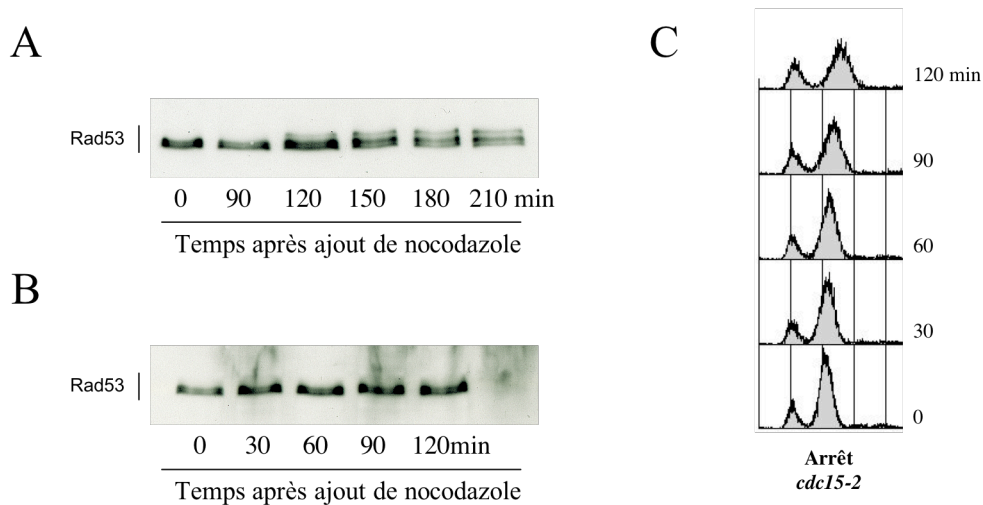
### ***2.1.1. La présence des phosphorylations de Rad9 et Rad53 induites par le nocodazole est restreinte à une partie de la mitose.***

Les phosphorylations de Rad9 et Rad53 induites par le nocodazole ne deviennent visibles que lorsque les cellules s'accumulent en G2/M (cf figures n°1A, 3A, 3C et 3H). Le laps de temps entre le moment où l'on ajoute la drogue et le moment où les modifications sont visibles en Western-Blot ne correspond pas au temps mis par le nocodazole pour pénétrer dans la cellule puisque ces phosphorylations sont visibles une heure après ajout de la drogue si l'on traite des cellules en phase exponentielle de croissance, alors qu'elles sont visibles une heure et demi, voire deux heures après ajout de nocodazole, si l'on traite des cellules préalablement synchronisées à l' $\alpha$ -facteur (cf figures n°1A, 3A et 3H). Il semble donc que ces phosphorylations n'aient lieu que dans une phase précise du cycle : en phase G2/M. Nous avons voulu savoir si ces phosphorylations étaient inhérentes à cette phase du cycle. Nous avons donc regardé si elles apparaissaient lors du passage des cellules en G2/M ou lors d'un blocage à la transition métaphase/anaphase. Ces modifications ne sont pas visibles lors d'un cycle non perturbé comme l'indique la figure n°1B, et le doublet de Rad53 n'est pas présent lors d'un arrêt induit par la surexpression d'une forme non dégradable de Pds1 (cf figure n°3F). Nous pensons donc que ces phosphorylations ont lieu uniquement en phase G2/M, mais seulement lors d'un traitement au nocodazole, contrairement à l'hypothèse de J.Vialard et ses collaborateurs (Vialard et al., 1998).

Le nocodazole arrête les cellules à la transition métaphase/anaphase. Cependant, le blocage des cellules à ce point précis du cycle n'est pas nécessaire à la formation du doublet puisque le doublet est visible chez le mutant *pds1 $\Delta$*  traité au nocodazole (cf figure n°1G). Nous avons voulu savoir si le doublet de Rad53 pouvait être observé tout au long de la mitose. Pour cela, nous avons utilisé le mutant thermosensible *cdc15-2*. Cdc15 fait partie du réseau MEN. À

température restrictive (37°C), le mutant *cdc15-2* s'arrête en télophase puisque l'on peut distinguer au microscope, après une coloration au DAPI, des cellules qui possèdent un bourgeon presque aussi gros que la cellule-mère et deux quantités égales d'ADN présentes dans chacune des cellules-filles (données non montrées). Si l'on synchronise des cellules *cdc15-2* à l' $\alpha$ -facteur à 23°C et qu'on les relargue à 37°C, la quasi-totalité des cellules sont en télophase 2h30 après relargage comme on peut en juger par observation au microscope et via une analyse par FACS (données non montrées). Ces cellules restent bloquées au moins jusqu'à 5h30 après relargage de l' $\alpha$ -facteur (données non montrées). Le doublet de Rad53 est visible dans des cellules *cdc15-2* si l'on ajoute le nocodazole directement après le relargage à température restrictive (cf figure n°M2A). Ceci indique que Cdc15 n'est pas nécessaire à la phosphorylation de Rad53 induite par le nocodazole. Par contre, si l'on ajoute le nocodazole seulement lorsque les cellules sont synchronisées en télophase, Rad53 n'est pas modifiée (cf figure n°M2B). L'ensemble de ces données suggèrent que Rad53 ne peut être phosphorylée suite à un traitement au nocodazole que dans une phase restreinte de la mitose. Ceci est confirmé par le fait que le doublet apparaisse de façon transitoire chez le mutant *bub2Δ* qui ne reste pas bloqué à la transition métaphase/anaphase lors d'un traitement au nocodazole (cf figure n°3A). Il aurait été intéressant de suivre la cinétique de formation et probablement de disparition du doublet chez le mutant *pds1Δ*.

Figure n°M2



**Le doublet de Rad53 n'est pas visible dans des cellules arrêtées en télophase.**

- A. La souche L226 (DLY *cdc15-2*) est synchronisée à l' $\alpha$ -facteur à 23°C. Elle est ensuite relarguée dans un milieu frais contenant du nocodazole (15  $\mu$ g/ml) à 37°C à t=0. Des aliquots sont prélevés aux temps indiqués après relargage et analysés par Western-Blot avec un anticorps dirigé contre la protéine Rad53.
- B. La souche L226 (DLY *cdc15-2*) est synchronisée à l' $\alpha$ -facteur à 23°C. Elle est ensuite relarguée dans un milieu frais à 37°C. 2h30 après relargage, on ajoute du nocodazole et de l' $\alpha$ -facteur dans la culture. Des aliquots sont prélevés aux temps indiqués après ajout de nocodazole et analysés par Western-Blot avec un anticorps dirigé contre la protéine Rad53.
- C. Analyse par FACS des points de la figure n°B.



### 2.1.2. Les phosphorylations de Rad9 et Rad53 induites par le nocodazole dépendent des gènes codant pour les protéines du checkpoint du fuseau, mais pas des gènes codant pour les protéines des checkpoints de l'ADN.

Comme l'indique la figure n°2, les phosphorylations de Rad9 et Rad53 induites par le nocodazole ne dépendent pas des gènes normalement requis pour leurs modifications après un stress génotoxique. À ma connaissance, ce sont les premières modifications de Rad9 et Rad53 indépendantes des protéines des checkpoints de l'ADN qui ont été identifiées. Ce sont également les premières qui ne sont pas induites par un stress génotoxique ou réplicatif. La phosphorylation de Rad9 induite par le nocodazole ne dépend pas non plus de *RAD53* (cf figure n°2B) et celle de Rad53 ne dépend pas de *CHK1* (données non montrées). Par contre, ces modifications dépendent de *MAD2* et *MPS1* (cf figures n°3A, 3C et 3H). Il a été vérifié que Rad9 et Rad53 ne subissaient pas de modifications dans une souche *mad2Δ* en absence de nocodazole (données non montrées). La formation du doublet dépend également de *BUB1* et *MAD1* (cf figure n°3A et donnée non montrée).

### 2.1.3. Conclusion

Les phosphorylations de Rad9 et Rad53 induites par le nocodazole apparaissent au moment où l'on pense que le checkpoint du fuseau est activé. Elles dépendent des protéines du checkpoint du fuseau. Elles sont également visibles en cas de surexpression de *MPS1*, qui est censée mimer une activation du checkpoint du fuseau (Hardwick et al., 1996) (cf figure n°1C). Le doublet n'est pas visible lors d'un blocage des cellules à la transition métaphase/anaphase (point d'arrêt de ce checkpoint pendant la mitose) en absence d'activation du checkpoint du fuseau. Par ailleurs, il disparaît si l'on relargue des cellules sauvages préalablement traitées au nocodazole dans un milieu frais (cf figure n°4A), ce qui semble indiquer que le doublet disparaît lorsque le checkpoint est inactivé. L'ensemble de ces données suggèrent fortement que ces phosphorylations sont bien induites par l'activation de ce checkpoint et qu'elles disparaissent lorsque le checkpoint est désactivé. Une étude suggère que le checkpoint du fuseau n'est pas actif en fin de mitose. En effet, Pds1 n'est pas stabilisée dans des cellules arrêtées en télophase via la mutation *cdc15-2* malgré la présence de nocodazole (Palframan et al., 2006). Ceci expliquerait pourquoi le doublet de Rad53 n'est pas induit par le nocodazole dans des cellules *cdc15-2* préalablement arrêtées en télophase (cf figure n°M2B).

Même s'il n'a pas été montré de façon formelle que le checkpoint du fuseau était inactivé chez le mutant *bub2Δ* après une incubation prolongée dans un milieu contenant du nocodazole, le fait que ces cellules arrivent à sortir de mitose et que Clb2 soit à terme dégradée en cas de dommages du fuseau le suggère fortement. Ces cellules sont toutefois bloquées de façon transitoire à la transition métaphase/anaphase puisque la séparation des chromatides sœurs est retardée (Alexandru et al., 1999; Fraschini et al., 1999; Hoyt et al., 1991). Il est très probable que le checkpoint soit actif pendant le laps de temps où ces cellules sont maintenues à la transition métaphase/anaphase et qu'il soit ensuite inactivé, peut-être via la dégradation de Mps1 médiée par un complexe APC devenu actif (Palframan et al., 2006). Cette hypothèse est en accord avec l'apparition transitoire du doublet que l'on observe chez le mutant *bub2Δ* lors d'un traitement au nocodazole (cf figure n°3A). Le laps de temps où le doublet est visible correspondrait au laps de temps où les cellules sont retenues à la transition métaphase/anaphase. Il aurait été intéressant de voir si la surexpression de *MPS1*, qui est supposée engendrer une « réactivation artificielle » du checkpoint du fuseau dans des cellules *cdc15-2* (les cellules ne sont plus capables de

rebourgeonner et Mad1 est phosphorylée (Palframan et al., 2006)), permettrait d'induire la formation du doublet chez ce mutant, alors qu'en son absence, il n'est pas présent (cf figure n°M2B). Nous ne savons pas exactement à partir de quel moment dans le cycle les phosphorylations de Rad9 et Rad53 induites par le nocodazole apparaissent, mais il s'agit probablement d'un moment où l'activité du checkpoint est suffisante.

Notre hypothèse est contraire à l'idée d'un checkpoint activé à chaque cycle puisque les phosphorylations de Rad9 et Rad53 ne sont pas visibles lors d'un cycle non perturbé (cf figure n°1B). Cependant, il est possible que cette activation, et la désactivation qui la suit, soient très rapides et que l'on puisse difficilement détecter cette activation succincte avec le protocole suivi lors de nos expériences.

## 2.2. Les caractéristiques du doublet

### 2.2.1. Le doublet ne semble pas correspondre à une forme active de Rad53.

Lors d'un stress génotoxique ou réplicatif, on pense que Rad53 est phosphorylée par Mec1/Tell1 lors d'une interaction favorisée par un adaptateur (Rad9 ou Mrc1). Elle s'autophosphoryle ensuite *en trans* avant d'agir sur les éventuels effecteurs loin des sites de dommages. Un test d'autophosphorylation sur membrane mis au point par A. Pelliccioli et ses collaborateurs (Pelliccioli et al., 1999) permet d'évaluer l'activité d'autophosphorylation de Rad53. Ainsi, le signal obtenu lors de ce test est important lorsque les extraits protéiques ont été faits à partir de cellules ayant subi un stress génotoxique ou réplicatif (traitement à l'hydroxyurée, au MMS, aux UV) (cf figure n°1F et (Pelliccioli et al., 1999)). Comme le montre la figure n°1F, ce test semble indiquer que le traitement au nocodazole ne modifie pas l'activité d'autophosphorylation de Rad53 en présence ou en absence d'un stress génotoxique.

Les gènes codant pour les sous-unités de la ribonucléotide réductase *RNR2* et *RNR3* subissent une induction transcriptionnelle dépendante de *RAD53* lors d'un stress génotoxique ou réplicatif (Allen et al., 1994; Zhou and Elledge, 1993). Cette induction est considérée comme un marqueur de l'activation de la voie Rad53 et peut être testée en suivant l'expression des gènes rapporteurs *RNR2-lacZ* et *RNR3-lacZ* construits en juxtaposant le promoteur de *RNR2* ou de *RNR3* et le gène *lacZ* (Zhou and Elledge, 1992). Le gène *lacZ* code pour la  $\beta$ -galactosidase. Le fait que cette enzyme soit capable d'hydrolyser un substrat incolore, l'ONPG, en galactose et en un produit jaune, l'ONP, qui absorbe à 420 nm, permet de mesurer son activité *in vitro*. L'absorption à cette longueur d'onde permet donc d'estimer l'activité transcriptionnelle des gènes *RNR2-lacZ* et *RNR3-lacZ*. Des tests préliminaires semblent indiquer que l'activité transcriptionnelle de *RNR2-lacZ* et *RNR3-lacZ* n'augmente pas après un traitement au nocodazole.

Ces deux données suggèrent que la bande supérieure du doublet ne correspond pas à une forme active de Rad53 au sens d'une activation engendrée par un stress génotoxique. Ainsi, le traitement au nocodazole ne semble pas activer la voie Rad53 des checkpoints de l'ADN.

### 2.2.2. La ou les kinases responsables de la phosphorylation de Rad53 induite par le nocodazole

#### 2.2.2.1. Bubl et Mps1

La formation du doublet dépend de *BUB1* et *MPS1* qui codent pour les deux kinases

connues du checkpoint du fuseau (cf figures n°3A et 3C). Par ailleurs, il a été montré chez l'homme que Mps1 interagissait avec Chk2 en co-immunoprécipitation et que Mps1 phosphorylait Chk2 *in vitro* (Wei et al., 2005). Nous avons donc essayé de détecter une interaction en co-immunoprécipitation entre Bub1 et Rad53 et entre Mps1 et Rad53. Les expériences menées n'ont pas permis de montrer une telle interaction.

On observe une accumulation de formes phosphorylées de Mad1 dépendante de *MAD2*, *BUB1* et *BUB3* en cas de traitement au bénomyle ou au nocodazole (Hardwick and Murray, 1995). Le fait que la surexpression de *MPS1* induise une accumulation de ces formes phosphorylées de façon indépendante de *MAD2*, *BUB1* et *BUB3* a conduit à l'hypothèse que Mps1 serait la kinase responsable de la phosphorylation de Mad1 en cas de dommages du fuseau (Hardwick et al., 1996). La surexpression de *MPS1* donne lieu, comme l'ajout de nocodazole dans le milieu de culture, à la formation du doublet, mais, contrairement à la phosphorylation de Mad1, celle de Rad53 est dépendante de *MAD2* dans les deux cas (cf figures n°3A et 3E). Il est donc peu probable que Mps1 soit la kinase responsable de la phosphorylation de Rad53 en cas de dommages du fuseau, même si l'on ne peut exclure le fait que Mad2 puisse jouer un rôle, par exemple d'adaptateur, dans ce mécanisme. Ainsi, aucune donnée ne nous permet de penser que Bub1 ou Mps1 sont la ou les kinases responsables de la formation du doublet.

#### 2.2.2.2. *Cdc5*

Comme nous l'avons déjà souligné, *Cdc5* est une « polo-like » kinase qui intervient dans de nombreux processus mitotiques. Elle est notamment impliquée dans les voies FEAR et MEN et est également responsable d'une phosphorylation de *Scc1* qui promeut le clivage de la cohésine par la séparase à la transition métaphase/anaphase. Le taux de *Cdc5* varie au cours du cycle, augmente en phase S avant d'atteindre un maximum en mitose. En phase G1, *Cdc5* est dégradée de façon dépendante d'APC/Cdh1 (Cheng et al., 1998).

*Bfa1* et *Bub2* subissent des événements de phosphorylation en mitose dont certains sont probablement responsables de l'inactivation de la GAP et de la sortie mitotique. Ces phosphorylations supprimeraient l'inhibition de *Tem1* par *Bub2/Bfa1* (Hu and Elledge, 2002; Hu et al., 2001). L'activation du checkpoint du fuseau induite par un traitement au nocodazole semble empêcher l'apparition de ces phosphorylations (Hu and Elledge, 2002; Hu et al., 2001). Ces phosphorylations dépendent au moins partiellement de *CDC5* (Hu and Elledge, 2002; Hu et al., 2001), ce qui suggère que le checkpoint pourrait agir sur la kinase *Cdc5* pour freiner la progression du cycle. Par ailleurs, il a été montré que *Mad3* était phosphorylée en mitose de façon dépendante de *CDC5* et que ces formes phosphorylées s'accumulaient après activation du checkpoint du fuseau (Rancati et al., 2005). *Cdc5* pourrait donc être une cible du checkpoint du fuseau et/ou une protéine nécessaire à son fonctionnement.

*Cdc5* est phosphorylée de façon dépendante de *RAD53* dans les cellules *cdc13-1* lorsque celles-ci sont placées à température restrictive (Cheng et al., 1998). La surexpression de *CDC5* à l'aide du promoteur *GAL*, induit une élongation du fuseau chez le mutant *cdc13-1* à température restrictive, ce qui suggère que cette surexpression permet de supprimer l'inhibition de l'anaphase induite par le checkpoint (Sanchez et al., 1999). Par ailleurs, la délétion de *RAD53* permet aux cellules *cdc13-1* de séparer leurs chromatides sœurs. La mutation *cdc5-1* supprime partiellement cet effet, alors que ce mutant n'est pas défectueux pour l'entrée en anaphase en absence de stress. En effet, le mutant simple *cdc5-1* s'arrête à température restrictive à un stade de la mitose où l'activité *Cdc28/Clb* est forte, après la dégradation de *Pds1* et l'allongement du fuseau (Sanchez et al., 1999). Ainsi, *Rad53* pourrait inhiber *Cdc5* pour bloquer l'entrée en anaphase et la sortie de

mitose. Enfin, nous avons vu que le mutant *cdc5-ad* est défectueux pour l'adaptation après cassure HO (Toczyski et al., 1997). Ce mutant est par ailleurs sensible au 4-NQO (données non montrées). L'ensemble de ces données suggèrent que Cdc5 pourrait être une cible des checkpoints de l'ADN impliquée dans le blocage de la progression du cycle en cas de dommages de l'ADN et qu'elle pourrait également être nécessaire à la reprise du cycle en cas de persistance de ces dommages.

À cause de ses liens étroits avec la mitose et les checkpoints, nous avons voulu savoir si la kinase Cdc5 pouvait être responsable de la phosphorylation de Rad53 induite par le nocodazole. Des tests préliminaires semblent indiquer que le doublet pourrait être légèrement atténué dans les cellules *cdc5-ad* après 1h30 et 3h de traitement au nocodazole. Cependant, ce résultat est à confirmer. De plus, il serait absolument nécessaire de suivre précisément la progression de la mitose en même temps que la cinétique d'apparition du doublet pour éliminer un éventuel biais lié à un mauvais arrêt du cycle chez ce mutant. Si Cdc5 est la kinase responsable de la formation du doublet, il est possible que la surexpression de *CDC5* induise sa formation en absence de dommages du fuseau. Ainsi, nous avons suivi l'état de phosphorylation de Rad53 dans des cellules portant un plasmide pGAL-*CDC5* plaçant l'expression de *CDC5* sous le contrôle du promoteur *GAL* inductible par le galactose. Ces cellules ont été préalablement synchronisées à l' $\alpha$ -facteur en raffinose avant d'être relarguées dans un milieu contenant du galactose. Comme contrôle, une culture analogue a été relarguée dans un milieu contenant du galactose et du nocodazole. Le doublet est moins bien visible lors d'expériences avec des transitions raffinose/galactose, peut-être à cause du ralentissement du cycle que cela engendre et de la mauvaise synchronisation qui en résulte. Toutefois, en présence de nocodazole, le doublet est clairement présent 3 heures après le relargage. Par contre, la seule surexpression de *CDC5* ne permet pas de le voir à ce moment-là. Pour empêcher la progression dans le cycle malgré la présence de nocodazole qui pourrait induire la surexpression de *CDC5* et qui pourrait éventuellement empêcher de voir le doublet, nous avons réitéré l'expérience avec des cellules portant le vecteur pGAL-*Pds1-mdb*<sup>1</sup>. La présence de ce vecteur induit un blocage des cellules à la transition métaphase/anaphase puisqu'il permet la surexpression d'une forme non dégradable de Pds1. Nous avons vu que la présence de ce plasmide n'induit pas la formation du doublet (cf figure n°3F). Après une synchronisation à l' $\alpha$ -facteur dans un milieu sélectif contenant du raffinose, une souche sauvage portant les plasmides pGAL-*PDS1-mdb* et pGAL-*CDC5* est relarguée dans un milieu contenant du galactose. L'étude de l'état de phosphorylation de Rad53 toutes les demi-heures pendant 4h30 après relargage indique clairement que la surexpression de *CDC5* n'engendre pas la formation du doublet dans ces conditions. Il est toutefois possible que Cdc5 doive être modifiée après activation du checkpoint du fuseau pour pouvoir agir sur Rad53.

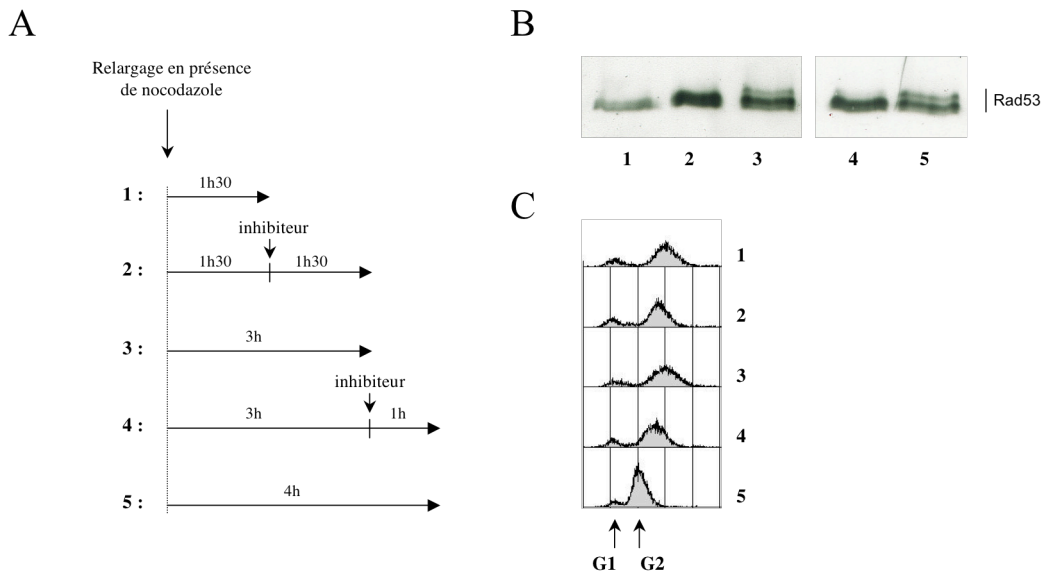
### 2.2.2.3. *Cdc28*

Cdc28 est une protéine clé de la régulation du cycle cellulaire. Nous avons voulu savoir si cette kinase était nécessaire à la phosphorylation de Rad53 induite par le nocodazole. Pour cela, nous avons utilisé la souche *cdc28-as* qui nous a été gracieusement envoyée par K.Shokat. La kinase Cdc28-as correspond à la kinase Cdc28 dont la poche de liaison à l'ATP a été légèrement modifiée pour que puisse s'insérer spécifiquement (et uniquement dans cette kinase) un analogue

<sup>1</sup> Il s'agit du vecteur p415GAL1/PDS1-mdb-HA correspondant au vecteur pOC57-HA, gracieusement fourni par Orna Cohen-Fix, dont le marqueur d'auxotrophie a été changé.

de l'ATP, par exemple le 1-NAPP1, qui agit alors comme un inhibiteur pour la kinase « as » (« analog-sensitive »). Une fois ajouté dans le milieu de culture, l'inhibiteur semble pénétrer dans la cellule et être efficace en seulement quelques minutes (Bishop et al., 2000). En absence d'inhibiteur, le mutant *cdc28-as* montre une viabilité normale, mais les cellules sont légèrement plus grosses que les cellules sauvages et ont des bourgeons très allongés. Leur temps de génération est également augmenté de 20% (Bishop et al., 2000). J'ai tout d'abord vérifié que le traitement au nocodazole de la souche *cdc28-as* en absence d'inhibiteur induisait bien la formation du doublet comme c'est le cas dans la souche sauvage. Après une synchronisation à l' $\alpha$ -facteur et un relargage en présence de nocodazole, j'ai pu constater que l'intensité de la phosphorylation de Rad53 était identique à celle observée dans une souche sauvage. La cinétique d'apparition du doublet en Western-Blot était toutefois retardée d'une demi-heure dans la souche *cdc28-as* par rapport à la souche sauvage, probablement à cause du cycle ralenti de cette souche, que j'ai d'ailleurs pu constater via une analyse par FACS. Ainsi, le doublet de Rad53 apparaît après une heure et demie dans la souche sauvage et après deux heures dans la souche *cdc28-as*. Il est ensuite maintenu de façon correcte chez le mutant (données non montrées). J'ai ensuite testé l'effet de l'inhibiteur 1-NAPP1 sur la formation du doublet de Rad53. Pour cela, j'ai synchronisé la souche *cdc28-as* avec de l' $\alpha$ -facteur avant de la relarguer dans un milieu contenant du nocodazole. J'ai effectué plusieurs tests en parallèle (cf schéma de la figure n°M3A). Le test n°1 correspond à un contrôle : la souche *cdc28-as* a été incubée 1h30 en présence de nocodazole. Pour le test n°2, la souche *cdc28-as* est incubée 3 heures en présence de nocodazole dont 1h30 en présence de l'inhibiteur. Le test n°4 correspond à une incubation de 4 heures de la souche *cdc28-as* en présence de nocodazole avec ajout de l'inhibiteur une heure avant la fin du test. Les tests n°3 et 5 correspondent à une incubation de 3 heures et 4 heures respectivement en présence de nocodazole et sont les expériences contrôles des tests n°2 et 4 respectivement. L'analyse par FACS (cf figure n°M3C) permet de vérifier que les cellules sont bien restées bloquées en phase G2/M et n'ont pas progressé dans le cycle au cours de l'expérience. L'analyse par Western-Blot de Rad53 révèle que le doublet est présent seulement dans les tests n°3 et 5 (cf figure n°M3B). Ce résultat indique que Cdc28 est nécessaire à la formation, mais également au maintien de la phosphorylation de Rad53 induite par le nocodazole.

Figure n°M3



**Influence de l'inhibition de Cdc28 sur la phosphorylation de Rad53 induite par le nocodazole.**  
 La souche L197 (W303 *cdc28-as*) est synchronisée à l' $\alpha$ -facteur, puis relarguée dans un milieu contenant du nocodazole. On ajoute de l'inhibiteur 1-NAPP1 (10  $\mu$ M final) dans certaines cultures aux temps indiqués sur le schéma (A). Des aliquots sont prélevés à la fin de chaque expérience représentée sur le schéma (A) et analysés par Western-Blot (B) avec un anticorps dirigé contre la protéine Rad53 et par FACS (C).

Cependant, plusieurs études suggèrent que Cdc28 serait nécessaire au maintien de l'arrêt induit par le checkpoint du fuseau chez *Saccharomyces cerevisiae*. Ainsi, si l'on surexprime *SIC1*, un inhibiteur des complexes Cdk/Clb, dans des cellules préalablement arrêtées au nocodazole, les chromatides sœurs se séparent de façon dépendante de l'APC, indiquant que l'arrêt n'est plus maintenu (Amon, 1997). En condition restrictive, l'allèle *cdc28-5M* entraîne la perte concomitante de l'activité Cdk et de la capacité à arrêter le cycle suite à des dommages du fuseau ou des dommages de l'ADN (Li and Cai, 1997). Enfin, les allèles *cdc28-R288G* et *cdc28-R10G*, qui semblent compléter correctement les fonctions végétatives de Cdc28 à 30°C et qui semblent avoir conservé leur activité kinase, montrent des défauts partiels pour la réponse aux dommages du fuseau. Par exemple, ces mutants ne sont pas capables de s'arrêter en G2/M de façon correcte lors d'un traitement au nocodazole : la moitié des cellules environ arrivent à séparer leurs chromatides sœurs lors d'un traitement de 5 heures au nocodazole, contre 80% des cellules chez le mutant *mad1* et 10% chez la souche sauvage (Kitazono et al., 2003). D'autres études montrent également que l'activité Cdk est nécessaire au bon fonctionnement du checkpoint du fuseau chez *S. pombe* et chez les eucaryotes supérieurs (D'Angiolella et al., 2003; Yamaguchi et al., 2003).

Il est donc possible que l'ajout de l'analogue de l'ATP dans les expériences de la figure n°M3 affaiblisse l'activité du checkpoint du fuseau et entraîne ainsi indirectement une perte de la phosphorylation de Rad53 induite par le nocodazole. Pour interpréter plus précisément ces résultats, il faudrait examiner le blocage du cycle des cellules *cdc28-as* lors du traitement au nocodazole en analysant par exemple l'abondance de Pds1.

### 2.2.3. Influence de *Glc7*, *Ptc2* et *Ptc3* sur la phosphorylation de *Rad53* induite par le nocodazole

Au laboratoire, il a été mis en évidence que les phosphatases *Ptc2* et *Ptc3* étaient nécessaires à la déphosphorylation de *Rad53* après une cassure double-brin de l'ADN, que ce soit au cours d'un processus de rétablissement ou d'un processus d'adaptation (Leroy et al., 2003). *Ptc2* et *Ptc3* sont également nécessaires à la déphosphorylation de *Rad53* observée après un traitement à la camptothécine (cf figure n°G9D).

La surexpression de *GLC7* à l'aide d'un plasmide centromérique accélère la déphosphorylation de *Rad53* lors du processus d'adaptation après une cassure HO chez les mutants *ptc2Δ* et *ptc2Δ ptc3Δ* (cf figure n°G5). Elle accélère également la déphosphorylation de *Rad53* chez le mutant *ptc2Δ ptc3Δ* après un traitement à la camptothécine (cf figure n°G9E). De plus, l'extinction de l'expression de *GLC7* semble engendrer le maintien de la phosphorylation de *Rad53* induite par une cassure double-brin irréparable chez la souche sauvage (cf figure n°G8).

Ainsi, *Ptc2*, *Ptc3* et *Glc7* semblent être capables d'influer sur l'état de phosphorylation de *Rad53* en cas de dommages de l'ADN. C'est pourquoi nous avons cherché à mettre en évidence un effet potentiel de ces phosphatases sur la phosphorylation de *Rad53* engendrée par l'activation du checkpoint du fuseau. Des expériences préliminaires semblent indiquer que la surexpression de *GLC7*, à l'aide d'un plasmide centromérique ou d'un plasmide multi-copie, n'a pas d'influence sur la phosphorylation de *Rad53* lors d'un traitement au nocodazole. Il en est de même pour la surexpression de *PTC2* (plasmide multi-copie) (données non montrées). Pour confirmer cela, il faudrait toutefois étudier la cinétique d'apparition du doublet lors de l'ajout de nocodazole sur une population de cellules synchronisées portant ces vecteurs et/ou la cinétique de disparition du doublet lorsque ces cellules sont remises dans un milieu sans drogue après un blocage au nocodazole. Toutefois, nous avons montré que la cinétique de disparition du doublet n'était pas altérée chez le double mutant *ptc2Δ ptc3Δ* (cf figure n°4A). Les premiers tests semblent donc indiquer que les phosphatases *Ptc2*, *Ptc3* et *Glc7* ne sont pas capables de modifier la phosphorylation de *Rad53* en cas de dommages du fuseau.

## 2.3. Quelles peuvent être les significations physiologiques des modifications de *Rad9* et *Rad53* induites par le nocodazole ?

Le fait que l'activation du checkpoint du fuseau soit à l'origine d'une modification de l'état de phosphorylation de *Rad9* et *Rad53* nous a tout d'abord fait penser que ces protéines (voire une partie des voies des checkpoints de l'ADN) pourraient intervenir dans la réponse aux dommages du fuseau. Je présente ci-après les expériences qui ont été effectuées pour tester cette hypothèse. Nous avons ensuite essayé de savoir si les phosphorylations de *Rad9* et *Rad53* induites par le nocodazole modifiaient leur réponse en cas de stress génotoxique.

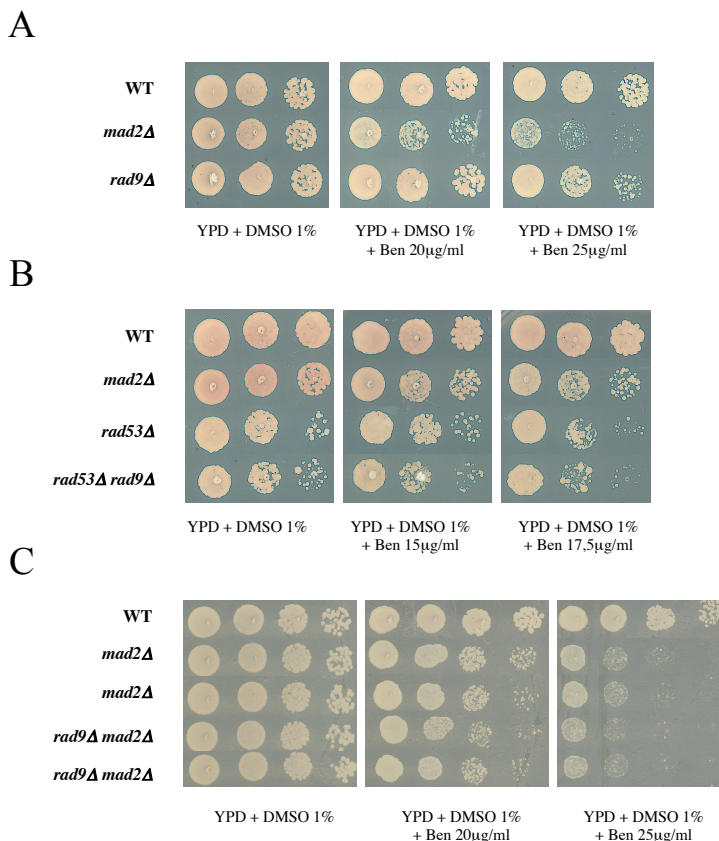
### 2.3.1. Les modifications de *Rad9* et *Rad53* induites par le nocodazole sont-elles nécessaires à la réponse aux dommages du fuseau ?

Nous avons plus précisément étudié l'effet de la délétion de *RAD9* ou *RAD53* sur la réponse aux dommages du fuseau.

Nous nous sommes intéressées dans un premier temps au comportement des délétants *rad9Δ* et *rad53Δ* lors de traitements au nocodazole ou au bénomyle. Comme l'indique la figure

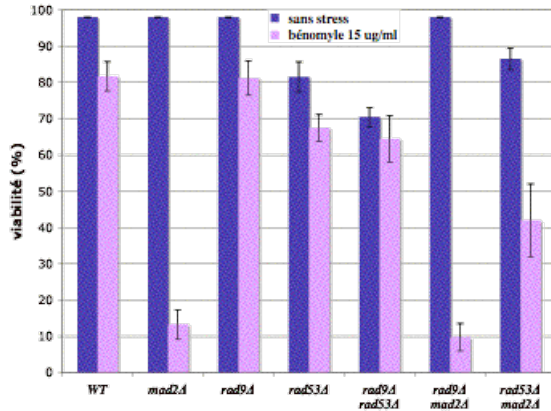
n°M4A, le délétant *rad9Δ* n'est pas sensible au bénomyle. *RAD53* étant un gène essentiel, le délétant *rad53Δ* survit grâce à la présence du plasmide pGAP-RNR1 qui induit la surexpression de la sous-unité Rnr1 de la ribonucléotide réductase. Cependant, cette souche n'est viable qu'à 80% et est légèrement affectée pour la croissance en absence de stress si on la compare à la souche sauvage (cf figure n°M4B). En dépit de ce léger défaut, la présence de bénomyle n'affecte pas de façon dramatique la croissance du délétant *rad53Δ* comme l'indique la figure n°M4B. Le fait que les souches *rad9Δ* et *rad53Δ* ne soient pas plus affectées par la présence de bénomyle que la souche sauvage est confirmé par l'expérience dont les résultats sont présentés sur la figure n°M4D : les souches *rad9Δ* et *rad53Δ* perdent comme la souche sauvage moins de 20% de viabilité en cas de dommages du fuseau. Au contraire, le même traitement affecte très fortement la viabilité du mutant *mad2Δ*. Comme les simples mutants, le double délétant *rad9Δ rad53Δ* ne montre pas non plus d'hypersensibilité au bénomyle (cf figure n°M4B). La délétion de *MAD2* entraîne également une forte sensibilité des mutants *rad9Δ* et *rad53Δ* aux dommages du fuseau (cf figure n°M4D). Les souches L114 et L115 ont tendance à flocculer et pourraient avoir accumulé des mutations supplémentaires. Il faudrait reconstruire ces souches (par croisement) pour voir si la plus forte viabilité du double mutant *rad53Δ mad2Δ* par rapport aux mutants *mad2Δ* et *rad9Δ mad2Δ* en cas de dommages du fuseau est significative (cf figure n°M4D). Le fait que le mutant *rad9Δ mad2Δ* se comporte de manière identique au mutant *mad2Δ* est confirmé par un test de sensibilité classique (cf figure n°M4C).

Figure n°M4





D



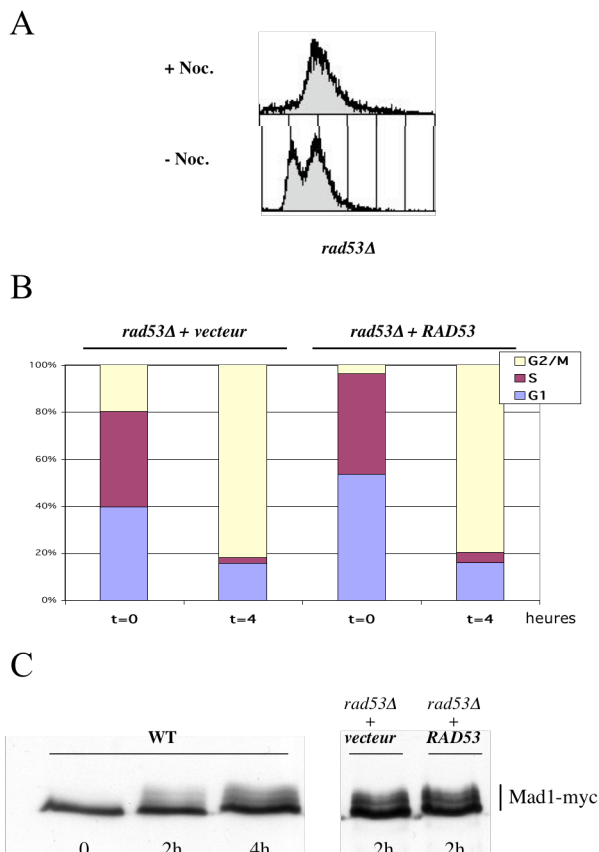
**Les délétions de *RAD9* ou *RAD53* n'induisent pas d'hypersensibilité au bénomyle.**

- A. La sensibilité des souches L64 (YPH499), L48 (YPH499 *mad2Δ*) et L157 (YPH499 *rad9Δ*) est testée pour différentes concentrations de bénomyle. Des dilutions sérielles au 1/10 de cultures en phase exponentielle sont «spottées» sur les milieux indiqués puis incubées à 30°C. Elles sont examinées 2 à 3 jours plus tard.
- B. La sensibilité des souches L64 (YPH499), L48 (YPH499 *mad2Δ*), L153 (YPH499 *rad53Δ*) et L299 (YPH499 *rad53Δ rad9Δ*) portant toutes le plasmide pGAP-RNR1 (qui permet aux délétants *rad53Δ* de survivre) est testée pour différentes concentrations de bénomyle. Des dilutions sérielles au 1/10 de cultures en phase exponentielle faites en milieu sélectif sont «spottées» sur les milieux indiqués puis incubées à 30°C. Elles sont examinées 2 à 3 jours plus tard.
- C. La sensibilité des souches L64 (YPH499), L183 (YPH499 *mad2Δ*), L184 (YPH499 *mad2Δ*), L204 (YPH499 *mad2Δ rad9Δ*) et L205 (YPH499 *mad2Δ rad9Δ*) est testée pour différentes concentrations de bénomyle. Des dilutions sérielles au 1/10 de cultures en phase exponentielle sont «spottées» sur les milieux indiqués puis incubées à 30°C. Elles sont examinées 2 à 3 jours plus tard.
- D. Les souches sont synchronisées à l'  $\alpha$ -facteur puis séparées en deux: une partie est relarguée dans un milieu frais puis incubée 1h25 à 30°C avant d'être spottée sur milieu riche (YPD+DMSO 1%), l'autre partie est relarguée en présence de nocodazole (15  $\mu$ g/ml final) pendant 1h25 avant d'être spottée sur un milieu riche contenant du bénomyle (YPD+DMSO1%+Bénomyle 15  $\mu$ g/ml final). Les boîtes sont incubées 24 heures, puis la viabilité est évaluée par comptage au microscope. Pour chaque mutant, l'expérience a été répétée deux fois avec à chaque fois deux souches indépendantes (WT: L64; *mad2Δ*: L48 et L183; *rad9Δ*: L157 et L256; *rad53Δ*: L153 et L305; *rad9Δ rad53Δ*: L298 et L299; *rad9Δ mad2Δ*: L204 et L205; *rad53Δ mad2Δ*: L114 et L115).

Nous avons par la suite essayé de mettre en évidence plus précisément une éventuelle implication de Rad9 et Rad53 dans l'arrêt du cycle induit par le nocodazole. Une analyse par FACS et un comptage au microscope indiquent que le mutant *rad53Δ* est capable de s'arrêter de façon correcte en G2/M lors d'un traitement au nocodazole (cf figures n°M5A et M5B). Une analyse par FACS d'une incubation prolongée (7 heures) en présence de nocodazole (15  $\mu$ g/ml final) des mutants *rad9Δ* et *rad53Δ* montrent que ceux-ci maintiennent un arrêt en G2/M identique à celui de la souche sauvage, contrairement à ce que l'on observe pour le mutant *mad2Δ* (cf figure n°M6D et donnée non montrée). Pour tenter de voir un défaut plus léger d'arrêt du cycle, nous avons analysé l'abondance de la protéine Pds1 au cours d'un traitement au nocodazole. Au cours d'un cycle non perturbé, la sécurine Pds1 s'accumule dans les cellules dès la phase S jusqu'à la transition métaphase/anaphase. À ce moment précis, elle doit être dégradée pour que la séparase Esp1 soit libérée et aille cliver la cohésine qui maintient les chromatides sœurs attachées avant l'anaphase (cf figures n°M6A et M6B). Lors d'un traitement au

nocodazole, le checkpoint du fuseau inhibe la dégradation de Pds1, ce qui empêche la séparation des chromatides sœurs et la progression dans le cycle (cf figures n°M6A et M6B). La délétion de *MAD2* supprime cette inhibition : Pds1 est dégradée avec une cinétique similaire chez le mutant *mad2Δ* traité au nocodazole et chez la souche sauvage non traitée (cf figure n°M6C et (Alexandru et al., 1999)). La délétion de *RAD9*, quant à elle, n'affecte pas la stabilisation de Pds1 lors d'un traitement au nocodazole, ce qui montre encore une fois que le mutant *rad9Δ* n'a pas de défaut d'arrêt du cycle en cas de dommages du fuseau. L'accumulation des formes phosphorylées de Mad1 lors d'un traitement au nocodazole, qui est considérée comme un des marqueurs de l'activation du checkpoint du fuseau, n'est pas non plus affectée chez le mutant *rad53Δ* (cf figure n°M5C). L'ensemble de ces données vont à l'encontre de l'idée d'un éventuel défaut d'activation du checkpoint du fuseau en cas de traitement au nocodazole ou au benomyle chez les mutant *rad53Δ* et *rad9Δ*.

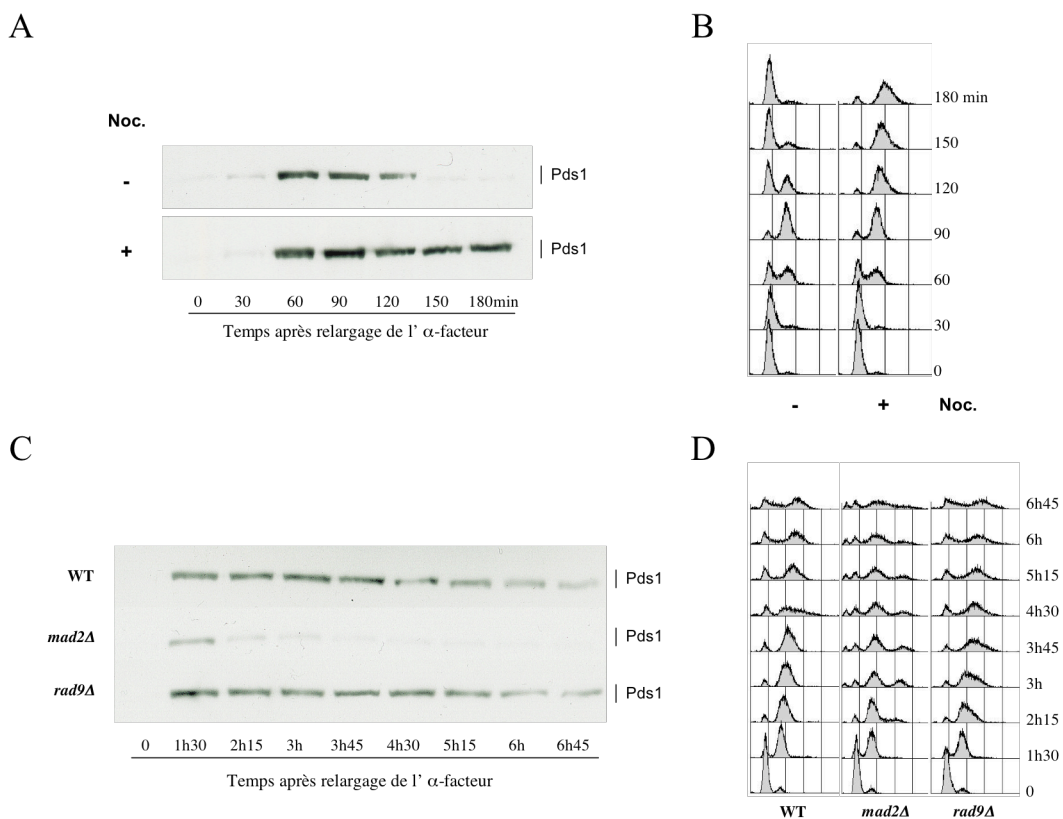
Figure n°M5



***RAD53* n'est pas nécessaire à la mise en place du checkpoint du fuseau.**

- A. Le nocodazole (15 µg/ml final) est ajouté dans une culture de la souche MCM259 (YPH499 *rad53Δ*). Une analyse par FACS est faite sur des aliquots fixés avant et deux heures après ajout de nocodazole.
- B. Des cellules L81 (YPH499 *rad53Δ MAD1-myc*) portant le plasmide vide pRS316 ou un plasmide centromérique portant *RAD53* (pJA92) sont cultivées en milieu sélectif. Le nocodazole (15 µg/ml final) est ajouté à t=0. Un comptage visuel au microscope est effectué sur des aliquots fixés aux temps indiqués après ajout de nocodazole pour évaluer la proportion de cellules en phase G1, en phase S et en G2/M.
- C. (*gauche*) Figure déjà présentée en G17A, permettant d'illustrer la phosphorylation de Mad1 obtenue dans une souche sauvage lors d'un traitement au nocodazole de 2h ou 4h. (*droite*) Des cellules L81 (YPH499 *rad53Δ MAD1-myc*) portant le plasmide vide pRS316 ou un plasmide centromérique portant *RAD53* (pJA92) sont cultivées en milieu sélectif. Le nocodazole (15 µg/ml final) est ajouté à t=0. Des aliquots sont prélevés deux heures après l'ajout de nocodazole et analysés par Western-Blot avec un anticorps dirigé contre le tag Myc.

Figure n°M6



**Étude de Pds1 suite à un traitement au nocodazole chez le mutant *rad9Δ*.**

- A. La souche L202 (YPH499 *bar1Δ PDS1-myc*) est synchronisée à l'α-facteur. Elle est ensuite relarguée dans un milieu frais en présence ou en absence de nocodazole (15 µg/ml). Des aliquots sont prélevés aux temps indiqués après relargage et analysés par Western-Blot avec un anticorps dirigé contre le tag Myc. De l'α-facteur est ajouté de nouveau dans la culture sans nocodazole 1h30 après relargage pour resynchroniser les cellules en G1.
- B. Analyse par FACS des points de la figure n°A.
- C. Les souches L202 (YPH499 *bar1Δ PDS1-myc*), L215 (YPH499 *bar1Δ PDS1-myc mad2Δ*) et L243 (YPH499 *bar1Δ PDS1-myc rad9Δ*) sont synchronisées à l'α-facteur. Elles sont ensuite relarguées dans un milieu frais en présence de nocodazole (15 µg/ml). Des aliquots sont prélevés aux temps indiqués après relargage et analysés par Western-Blot avec un anticorps dirigé contre le tag Myc. De l'α-facteur est ajouté de nouveau dans les cultures 2h15 après relargage.
- D. Analyse par FACS des points de la figure n°C.

Nous avons vu que le checkpoint du fuseau pouvait être activé suite à différents types de lésions, comme des défauts au niveau du kinétochore, au niveau de la duplication du SPB ou au niveau de l'ADN centromérique. Tout défaut qui engendre un mauvais attachement kinétochores/microtubules peut a priori être à l'origine de l'activation de ce checkpoint. Nous avons essayé de détecter d'éventuelles interactions génétiques entre *RAD9* et *RAD53* d'une part et des gènes codant pour des protéines nécessaires au fonctionnement du fuseau ou du kinétochore d'autre part, en pensant que Rad9 et Rad53 pourraient être requises seulement pour des réponses à des types de dommages particuliers. Nous avons pour cela utilisé les mutations *cbf1Δ*, *kar3Δ* et *gim3Δ*. Cbf1 est une protéine du kinétochore. Les mutants *cbf1Δ* croissent

lentement et sont sensibles au bénomyle. *KAR3* code pour une protéine moteur des microtubules. Ce type de protéine se déplace le long des microtubules en transportant d'autres protéines ou des organites. Ces protéines sont entre autres nécessaires à la formation du fuseau et à la régulation de sa longueur et de sa stabilité. Le mutant *kar3Δ* montre un retard en mitose. Les défauts mitotiques du mutant *kar3Δ* sont partiellement supprimés en présence d'une faible dose de bénomyle, peut-être parce que l'absence de *KAR3* stabilise de façon excessive les microtubules. Gim3 fait partie d'un complexe comportant 6 sous-unités qui joue probablement le rôle de chaperone pour la tubuline  $\alpha$ , un des deux composants majeurs des microtubules. Le mutant *gim3Δ* a une croissance légèrement ralentie. Il est cryosensible et hypersensible à de très faibles doses de bénomyle. Les mutations *cbf1Δ*, *kar3Δ* et *gim3Δ* sont toutes synthétiques létales avec les mutations *mad1Δ* et *mad2Δ* (Daniel et al., 2006; Hardwick et al., 1999). Ces létalités synthétiques suggèrent que l'activation du checkpoint du fuseau est nécessaire à la survie de ces mutants, peut-être parce qu'il permet de retarder le cycle tant que les défauts des mutants n'ont pas été corrigés. Quelques données suggèrent que les mutants *gim3Δ*, *kar3Δ* et *cbf1Δ* ont un checkpoint du fuseau fonctionnel. J'ai vérifié que le mutant *gim3Δ* n'était pas sensible à divers stress génotoxiques et j'ai également pu constater que le doublet de Rad53 est visible chez ce mutant lorsque celui-ci est incubé à 20°C. Le signal est toutefois faible, peut-être à cause d'une mauvaise synchronisation des cellules à faible température (données non montrées). Comme nous l'avons déjà indiqué, le doublet est de façon générale plus difficile à mettre en évidence lorsque les cellules cyclent moins rapidement, par exemple pour des cultures subissant une transition raffinose/galactose ou des cultures à basse température. Il apparaît plus tardivement et est souvent atténué. Ceci est peut-être dû au fait que les synchronisations sont moins efficaces dans ces conditions. Cela rend les interprétations parfois difficiles. Une autre difficulté vient du fait que j'ai de nombreuses fois observé un léger épaississement de la bande correspondant à Rad53 en Western-Blot lorsque les cellules sont en mitose en absence de stress. Cet « épaississement » est également présent chez le mutant *mad2Δ*, ce qui suggère qu'il ne correspond pas à la phosphorylation de Rad53 induite par le nocodazole. Je pense que Rad53 subit des modifications pendant la mitose indépendantes du checkpoint du fuseau. De même, Rad9 semble subir de légères modifications en mitose, notamment elle semble devenir plus abondante. Ces modifications sont, comme dans les cas de Rad53, différentes de celles induites par un traitement au nocodazole.

Nous n'avons pu mettre en évidence aucune interaction génétique entre *RAD9* et *RAD53* d'une part et *GIM3*, *CBF1* et *KAR3* d'autre part, en conditions permissives comme en conditions restrictives.

Ipl1 est nécessaire au maintien du checkpoint du fuseau en cas de surexpression de *MPS1*, mais pas en cas de traitement au nocodazole (Biggins and Murray, 2001). Nous avons donc essayé de savoir si Rad9 et Rad53 se comportaient de la même manière. Cependant, si l'on analyse la viabilité de souches portant un plasmide pGAL-MPS1 (plasmide E325, pN-myc-Gal-MPS1 2 $\mu$  *LEU2* de M.Winey ou plasmide p415GAL1/MPS1 CEN *LEU2*) après les avoir spottées sur des boîtes contenant du galactose, on remarque que la surexpression de *MPS1* n'affecte pas plus les mutants *rad9Δ* et *rad53Δ* que la souche sauvage, comme nous avons pu le constater pour le traitement au bénomyle. Cette expérience a été faite en maintenant ou non la sélection pour le plasmide (données non montrées). Un défaut léger du maintien de l'arrêt induit par la surexpression de *MPS1* chez les mutants *rad9Δ* et *rad53Δ* est peut-être à étudier, par exemple en suivant la cinétique de dégradation de Pds1, comme cela a été fait pour le mutant *ipl1* (Biggins and Murray, 2001).

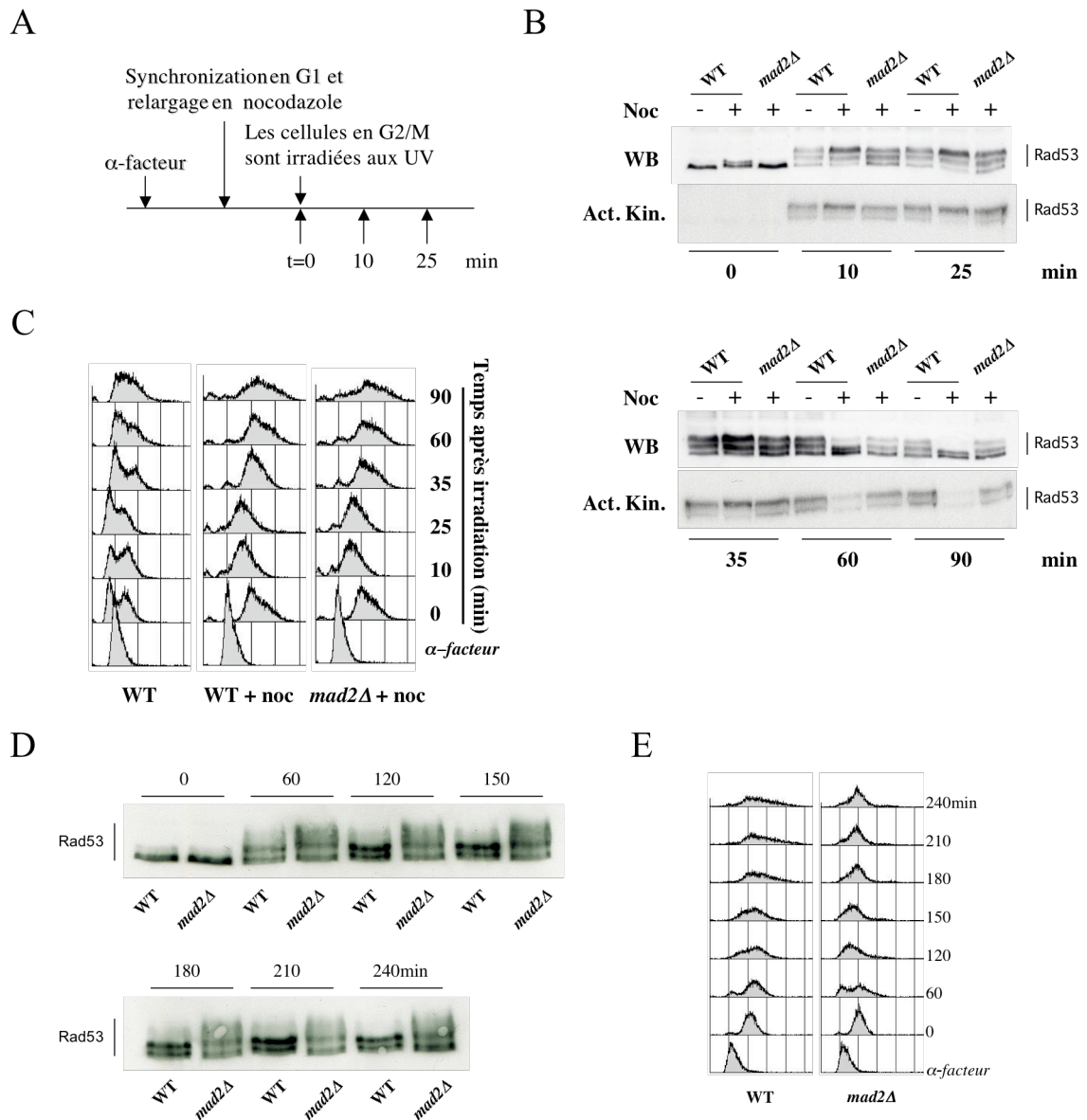
Il a parfois été suggéré que le défaut de tension au niveau du kinétochore et le défaut d'attachement kinétochore/microtubule pourraient constituer deux signaux qui activeraient par des voies distinctes le checkpoint du fuseau. Nous avons vu que Rad9 et Rad53 ne semblaient pas être nécessaires à la réponse au nocodazole mais ces protéines pourraient être spécifiquement requises pour la réponse à un défaut de tension. Pour l'instant, deux essais ont été mis au point pour créer un manque de tension sans défaut d'attachement. Le premier consiste à dépléter les cellules en Cdc6, un facteur d'initiation de la réplication. Comme nous l'avons vu, ces cellules entrent en mitose sans avoir préalablement répliqué leur génome. Ces cellules montrent un arrêt en G2/M (plus précisément, une stabilisation de Pds1) qui est dépendant du checkpoint du fuseau (Stern and Murray, 2001). Toutefois, le checkpoint de l'ADN ne détecte pas cette absence totale de réplication, suggérant que Rad9 et Rad53 ne répondent pas à ce stress. Le second test consiste à induire un défaut de cohésion des chromatides sœurs. Ce défaut entraîne un arrêt du cycle et une stabilisation de Pds1 dépendante du checkpoint du fuseau comme on peut le voir chez les mutants *mcd1-1*, *ctf18Δ* et *ctf8Δ* (Biggins and Murray, 2001; Hanna et al., 2001; Kitagawa et al., 2003; Mayer et al., 2001). Cependant, la délétion de *RAD9*, contrairement à la délétion de *MAD2*, ne supprime pas l'accumulation des cellules en G2/M des mutants *ctf8Δ* et *ctf18Δ* (Hanna et al., 2001; Mayer et al., 2001). Ceci suggère que Rad9 et Rad53 ne sont pas nécessaires à la réponse à un manque de tension au niveau du kinétochore.

Ainsi, aucun élément ne nous permet de penser que Rad9 et Rad53 puissent être des effecteurs du checkpoint du fuseau.

### *2.3.2. Les phosphorylations de Rad9 et Rad53 induites par le nocodazole modifient-elles la réponse aux stress génotoxiques ?*

Nous avons vu que l'activation du checkpoint du fuseau induisait une phosphorylation spécifique de Rad9 et Rad53. Pour savoir si ce checkpoint peut également modifier la réponse aux dommages de l'ADN chez *S. cerevisiae*, et plus précisément si les modifications de Rad9 et Rad53 induites par le nocodazole peuvent influencer leur comportement en cas de stress génotoxique, nous avons fait l'expérience suivante : une souche sauvage préalablement synchronisée à l' $\alpha$ -facteur est relarguée en présence ou en absence de nocodazole. Une fois que les cellules ont atteint la phase G2/M, elles sont irradiées aux UV ( $40\text{J/m}^2$ ). On suit alors par Western-Blot la cinétique d'apparition et de disparition des formes phosphorylées de Rad9 et Rad53 induites par le stress génotoxique. Comme le montrent les figures n°5A, 5B et M7B, le traitement au nocodazole accélère la déphosphorylation de Rad53 et c'est sur ce fait que nous avons concentré par la suite notre réflexion. La figure n°M7B indique également que cette accélération de la déphosphorylation de Rad53 est accompagnée d'une diminution de l'activité d'autophosphorylation de Rad53, ce qui suggère que Rad53 est « désactivée » plus rapidement après une irradiation UV lorsque les cellules sont traitées en même temps au nocodazole. Le terme « désactivation » n'est pas forcément le terme le plus approprié, car il fait référence à un état inactif de la kinase pour sa fonction au sein du checkpoint de l'ADN. Comme nous l'avons vu, le doublet ne semble pas correspondre à une forme « active » de Rad53 dans ce sens-là. Cependant, nous ne sommes pas capables d'affirmer que les formes phosphorylées de Rad53 correspondant à la bande supérieure du doublet ne possèdent aucune activité kinase. Nous conserverons tout de même le terme « désactivation » pour désigner le phénomène observé.

Figure n°M7



**L'activation du checkpoint du fuseau accélère la désactivation de Rad53 lors d'une irradiation aux UV.**

- A. Schéma représentant l'expérience décrite en B.
- B. Les souches MCM185 (YPH499 *bar1Δ*) et L48 (YPH499 *bar1Δ mad2Δ*) sont synchronisées à l'α-facteur puis relarguées en présence ou en absence de nocodazole (15 μg/ml) pendant 1h30. Les cellules sont alors irradiées aux UV (40J/m<sup>2</sup>) et incubées à nouveau en présence ou en absence de nocodazole comme précédemment. Des aliquots sont prélevés aux temps indiqués après irradiation et analysés par Western-Blot avec un anticorps dirigé contre la protéine Rad53 (WB) et à l'aide du test d'autophosphorylation de Rad53 sur membrane (Act. Kin.).
- C. Analyse par FACS des points de la figure n°B.
- D. Les souches L208 (Y300) et L266 (Y300 *mad2Δ*) portant le plasmide pGAL-MPS1 sont cultivées et synchronisées à l'α-facteur en raffinose. Elles sont ensuite relarguées dans un milieu contenant du galactose pendant 2 heures. Les cellules sont ensuite irradiées aux UV (30J/m<sup>2</sup>) puis incubées de nouveau en présence de galactose. Des aliquots sont prélevés aux temps indiqués après irradiation et analysés par Western-Blot avec un anticorps dirigé contre la protéine Rad53.
- E. Analyse par FACS des points de la figure n°D.

### **2.3.2.1. L'accélération de la « désactivation » de Rad53 est dépendante du checkpoint du fuseau.**

Pour vérifier que la désactivation plus rapide de Rad53 induite par le traitement au nocodazole était bien due au fait que la drogue active le checkpoint du fuseau, nous avons répété l'expérience chez le mutant *mad2Δ*. La délétion de *MAD2* supprime totalement cet effet (cf figures n°5A, 5B et M7B). De plus, la surexpression de *MPS1*, qui est considérée comme un moyen alternatif d'activation du checkpoint du fuseau, accélère également la déphosphorylation de Rad53 après une irradiation UV (cf figure n°M7D). Par ailleurs, l'effet du nocodazole sur la déphosphorylation de Rad53 chez la souche sauvage n'est pas visible si les cellules ne sont pas incubées de nouveau en présence de nocodazole après l'irradiation UV (Clerici et al., 2004). Ces données suggèrent fortement que la « désactivation » plus rapide de Rad53 après une irradiation UV est due à l'activité du checkpoint du fuseau.

### **2.3.2.2. L'accélération de la « désactivation » de Rad53 est-elle le signe d'une désactivation globale plus rapide du checkpoint de l'ADN lorsque le checkpoint du fuseau est activé ?**

Pour les conditions expérimentales exposées précédemment, nous avons également suivi la cinétique de phosphorylation de Rad9. Comme pour Rad53, le traitement au nocodazole semble modifier le comportement de Rad9 après une irradiation UV. L'effet majeur observé correspond à une plus forte abondance des formes phosphorylées qui apparaissent normalement après irradiation (cf figures n°5A et 5B). Cet effet est dépendant de *MAD2*, ce qui suggère qu'il est bien dû, comme pour les effets observés pour Rad53, à l'activité du checkpoint du fuseau (cf figures n°5A et 5B).

La présence de nocodazole dans le milieu de culture ne semble pas avoir d'influence sur l'état de phosphorylation de Chk1 et Ddc2 (cf figure n°M1C et donnée non montrée). Or, Chk1 est phosphorylée suite à un stress génotoxique et l'on peut également observer une accumulation de formes phosphorylées de Ddc2 en cas de dommages de l'ADN (Paciotti et al., 2000). Il aurait été intéressant de suivre la cinétique de phosphorylation de Chk1 et Ddc2 après un stress UV pour voir si ces protéines étaient également déphosphorylées plus rapidement en présence de nocodazole.

Je pense que la « désactivation » de Rad53 fait partie d'un processus plus global de désactivation du checkpoint de l'ADN. Il est difficile d'affirmer que Rad9 est déphosphorylée de façon concomitante mais, à ma connaissance, il n'existe pas de cas où seule une partie des protéines de la voie Mec1/Rad9/Rad53/Chk1 est inactivée alors que d'autres restent actives (voir par exemple, (Clerici et al., 2004; Keogh et al., 2006; Pellicioli et al., 2001)). Il aurait été intéressant de suivre l'état de phosphorylation de Pds1 pour confirmer le fait que le checkpoint est complètement inactivé.

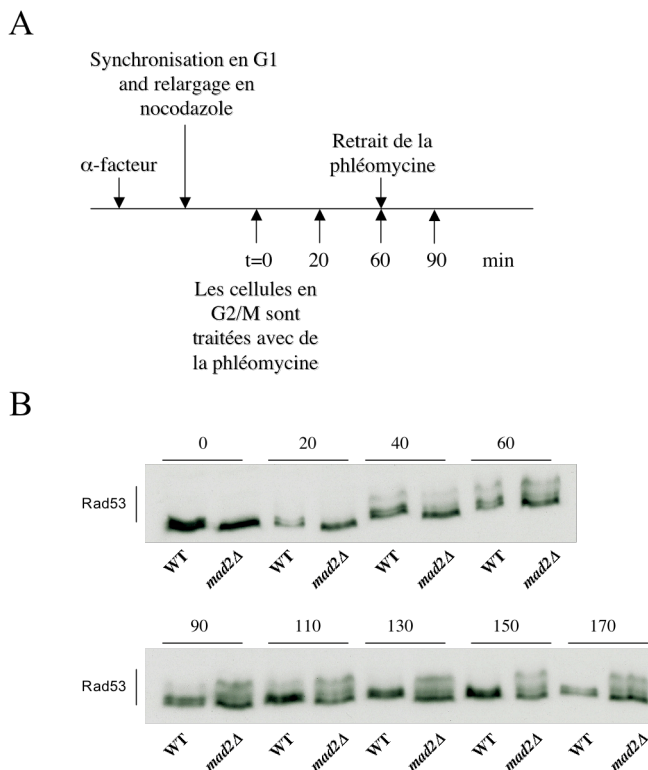
### **2.3.2.3. Le doublet est-il une forme pré-activée de Rad53 ?**

La désactivation plus rapide de Rad53 semble être corrélée à la présence du doublet. En effet, elle n'a pas lieu chez la souche sauvage lorsque le checkpoint du fuseau n'est pas activé et dans la souche *mad2Δ*, en présence ou en absence de nocodazole. Dans ces trois cas, le doublet est également absent. Cependant, une dépendance formelle n'est pas établie. Nous avons imaginé,

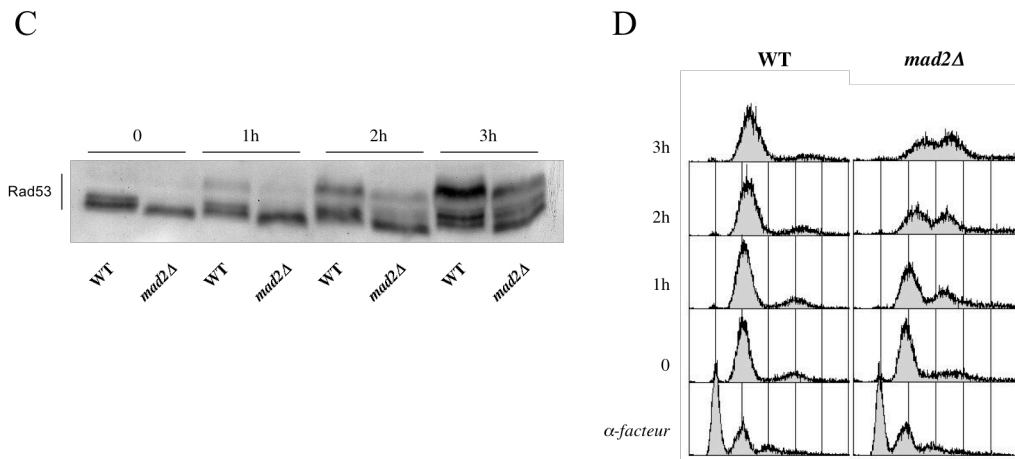
dans un premier temps, que les modifications de Rad53 et Rad9 induites par le nocodazole pourraient correspondre à des formes « pré-activées » de Rad9 et Rad53. Elles permettraient au checkpoint de l'ADN de faire face plus rapidement et/ou plus efficacement aux dommages de l'ADN, ce qui expliquerait la désactivation plus rapide de Rad53 lorsque le checkpoint du fuseau est activé.

La phosphorylation de Rad53 après un stress UV est extrêmement rapide. J'ai donc essayé de trouver d'autres conditions avec lesquelles je pourrais éventuellement observer une phosphorylation plus rapide de Rad53 après un stress génotoxique lorsque le checkpoint du fuseau est actif. J'ai repris le protocole suivi pour l'irradiation UV et je l'ai adapté au cas d'un traitement à la phléomycine, agent génotoxique qui engendre la création de cassures double-brin. Comme le montre la figure n°5E, en présence de nocodazole, Rad53 est également déphosphorylée plus rapidement chez la souche sauvage que chez le mutant *mad2Δ* lors du rétablissement après un traitement à la phléomycine. Il a été vérifié que cet effet était visible seulement en présence de nocodazole, c'est-à-dire que la cinétique de phosphorylation de Rad53 dans cette expérience est identique chez la souche sauvage non traitée au nocodazole et chez le mutant *mad2Δ* traité au nocodazole (donnée non montrée). Cette expérience montre que le nocodazole affecte la réponse à divers types de stress génotoxiques. J'ai plus précisément suivi la cinétique de phosphorylation de Rad53 au cours de cette expérience juste après l'addition de phléomycine (cf figure n°M8B). Aucune différence n'est visible au moment de l'activation de Rad53 (temps 20, 40 et 60 min de la figure n°M8).

Figure n°M8







**Influence d'un traitement au nocodazole sur la réponse à d'autres stress génotoxiques.**

- A. Schéma représentant l'expérience décrite en B.
- B. Les souches MCM185 (YPH499 *bar1Δ*) et L48 (YPH499 *bar1Δ mad2Δ*) sont synchronisées à l' $\alpha$ -facteur puis relarguées en présence de nocodazole (15  $\mu$ g/ml) pendant 2h. De la phléomycine est alors ajoutée au milieu de culture (10  $\mu$ g/ml final) à  $t=0$ . Une heure plus tard, les cellules sont lavées pour enlever la phléomycine puis incubées de nouveau en présence de nocodazole. Des aliquots sont prélevés aux temps indiqués après le début du traitement à la phléomycine et analysés par Western-Blot avec un anticorps dirigé contre la protéine Rad53. Cette figure est présentée en partie dans l'article (Clemenson and Marsolier-Kergoat, 2006).
- C. Les souches MCM261 (JKM139) et L45 (JKM139 *mad2Δ*) sont synchronisées à l' $\alpha$ -facteur en milieu raffinose. Elles sont ensuite relarguées en milieu raffinose en présence de nocodazole (15  $\mu$ g/ml) pendant 2h20. On induit l'expression de *HO* en ajoutant du galactose à  $t=0$ . Des aliquots sont prélevés aux temps indiqués après induction de la cassure et analysés par Western-Blot avec un anticorps dirigé contre la protéine Rad53.
- D. Analyse par FACS des points de la figure n°C.

Nous avons toutefois répété l'expérience avec un autre type de stress, à savoir une cassure double-brin unique et irréparable générée par l'endonucléase HO qui induit une phosphorylation de Rad53 mais de façon beaucoup moins rapide que les radiations UV ou la phléomycine. Ce type de stress nous permet d'habitude d'étudier le phénomène d'adaptation. J'ai adapté le protocole à ce stress particulier : j'ai synchronisé les cellules à l' $\alpha$ -facteur avant de les relarguer en présence de nocodazole. Une fois que les cellules ont atteint la phase G2/M, l'expression de l'endonucléase HO est induite par ajout de galactose dans le milieu de culture. De façon intéressante, l'accumulation des formes phosphorylées induites par la présence de la cassure double-brin est plus rapide et plus forte chez la souche sauvage que chez le mutant *mad2Δ* (cf figure n°M8C). Ce résultat va dans le sens de notre hypothèse. Cependant, la cassure HO est un stress particulier : si la cassure est générée en G1, Rad53 n'est pas phosphorylée (Pelliccioli et al., 2001). Ceci n'est pas vrai pour une irradiation UV ou un traitement au 4-NQO (Ira et al., 2004; Vialard et al., 1998) et semble être dû au fait que la phosphorylation de Rad53 en cas de cassure double-brin nécessite une résection continue des extrémités de cette cassure, résection pour laquelle l'activité Cdk est requise et qui ne se produit pas en G1 (Ira et al., 2004). Or, une analyse par FACS (cf figure n° M8D) indique clairement que les cellules *mad2Δ* ne sont pas maintenues bloquées en G2/M tout au long de notre expérience. Il est donc possible que la moindre phosphorylation de Rad53 observée dans cette souche soit due au fait que les cellules soient sorties de mitose et retournées en G1.

Ainsi, aucune donnée ne nous permet réellement d'affirmer que Rad53 et le checkpoint de l'ADN sont activés plus rapidement lorsque le checkpoint du fuseau est actif.

#### 2.3.2.4. L'accélération de la déphosphorylation de Rad53 est-elle la conséquence d'un meilleur blocage en G2/M ?

Il a été montré que la résistance aux UV n'était pas constante au cours du cycle et, en particulier, que les cellules de levure comme les cellules de mammifère étaient plus sensibles aux UV en phase G1 qu'en fin de phase S et en phase G2. Chez *Saccharomyces cerevisiae*, la résistance aux radiations UV est maximale en mitose (Siede and Friedberg, 1990). Il est intéressant de noter que la différence de résistance aux UV entre les phases G1 et G2 est également présente chez le mutant *rad9-1* (Siede and Friedberg, 1990). On peut imaginer que l'état diploïde transitoire favorise la réparation. Ceci pourrait peut-être expliquer la différence de déphosphorylation de Rad53 induite par la présence de nocodazole après un stress UV. On peut imaginer que, dans la souche non traitée au nocodazole, l'irradiation soit faite à un moment où une partie des cellules sont proches de ou ont déjà passé la transition métaphase/anaphase et dans lesquelles le checkpoint de l'ADN peut difficilement freiner la progression de la mitose. Au contraire, le traitement au nocodazole maintient les cellules à un moment où les chromatides sœurs sont toutes les deux présentes et où elles sont maintenues attachées l'une à l'autre. Cet état pourrait favoriser la réparation, notamment la recombinaison homologue et ainsi conduire à une inactivation plus rapide du checkpoint de l'ADN. Pour résumer, la déphosphorylation plus rapide de Rad53 pourrait simplement résulter du fait que le traitement au nocodazole améliore l'arrêt des cellules en G2/M au cours de notre expérience et donc la réparation. Nous avons testé si la cinétique de réparation des lésions UV était fortement influencée par la présence de nocodazole dans notre protocole expérimental. Pour cela, nous avons suivi la décroissance de la quantité de CPDs (« Cyclobutane Pyrimidine Dimers »), le type de lésions majoritaire induit par les rayons ultraviolets, dans notre expérience. Comme le montre la figure n°5D, les cinétiques de réparation des CPDs sont semblables chez la souche sauvage et le mutant *mad2Δ* en présence ou en absence de nocodazole. Ceci est en accord avec des données obtenues dans les cellules CHO, qui montrent que le taux de réparation des lésions UV est similaire en phase G1 et en phase G2 alors que la résistance des cellules aux UV dans ces deux phases n'est pas la même (Petersen et al., 1995). L'effet que l'on observe n'est donc probablement pas dû à un effet sur la réparation.

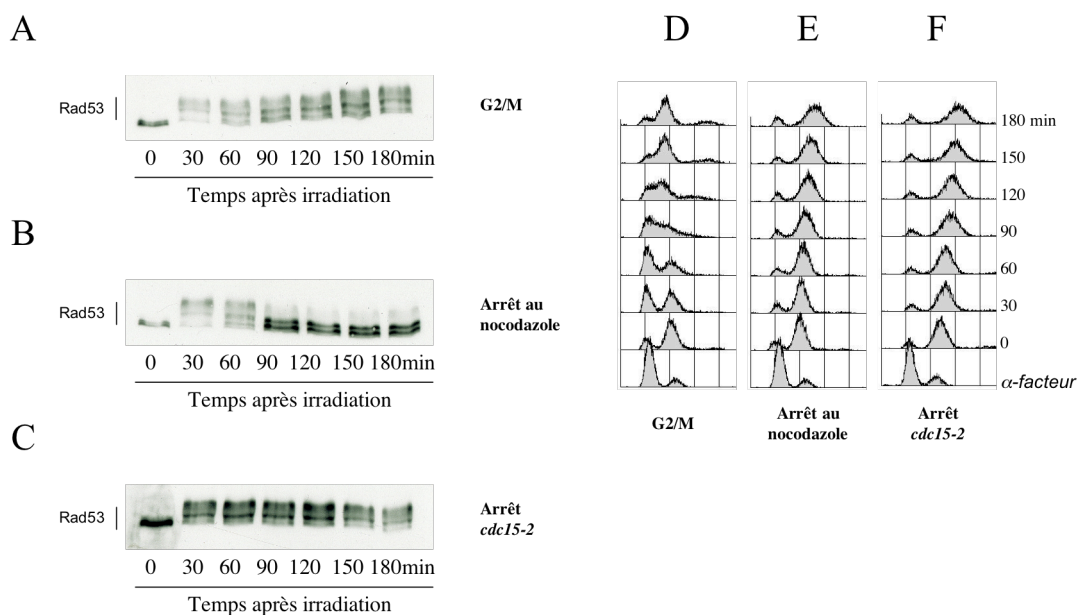
Toutefois, malgré le fait que les taux de réparation soient similaires, la résistance des cellules n'est pas la même en G1 et en G2. Il est donc probable que la réponse aux UV contrôlée par le checkpoint de l'ADN soit différente selon la phase du cycle. Pour éviter les éventuels biais dus à une réponse différente aux UV selon la phase du cycle, j'ai essayé systématiquement de mettre au point des protocoles dans lesquels les différentes souches comparées étaient dans la même phase. D'où le protocole suivi pour toutes les souches : synchronisation à l' $\alpha$ -facteur puis relargage en présence ou en absence de nocodazole et irradiation lorsque les cellules sont en G2/M. Une analyse FACS nous a permis au cours de ces expériences de savoir si les cellules étaient ou non sorties de mitose et retournées en G1 après le traitement aux UV. Dans la plupart des cas, l'irradiation a bien eu lieu lorsque les cellules étaient synchronisées en G2/M et les cellules ne semblaient pas être sorties de mitose lorsque des différences au niveau de la phosphorylation de Rad53 étaient observées. Cependant, l'analyse FACS est une analyse assez grossière qui ne nous permet pas de savoir à quel stade précis, entre la fin de la réplication et de la mitose, sont les cellules. Si nous sommes à peu près sûres que la souche sauvage traitée au

nocodazole est arrêtée à la transition métaphase/anaphase, il est possible que les cellules de la souche sauvage non traitée et de la souche *mad2Δ* traitée ou non traitée dépassent ce stade et soient ensuite difficilement arrêtées par l'activation du checkpoint de l'ADN, suite à l'irradiation UV. C'est pourquoi nous avons testé si un simple blocage du cycle indépendant de l'activation du checkpoint du fuseau engendrait le même effet sur la « désactivation » de Rad53 que le traitement au nocodazole. Comme le checkpoint du fuseau bloque à la fois la transition métaphase/anaphase et la sortie de mitose, j'ai étudié séparément l'influence de ces blocages sur la cinétique de phosphorylation de Rad53 après un stress UV. Une autre façon de procéder aurait été d'analyser l'abondance de Pds1 pour savoir si toutes les cellules restaient bloquées à la transition métaphase/anaphase au cours de nos cinétiques.

### 2.3.2.4.1. Blocage de la sortie de mitose

Pour bloquer les cellules en télophase, j'ai utilisé la mutation *cdc15-2*. Ce mutant a été synchronisé à l' $\alpha$ -facteur puis relargué à température restrictive. Lorsque les cellules étaient bloquées en télophase, elles ont été irradiées aux UV. Dans ces cellules, Rad53 reste phosphorylée aussi longtemps que dans les cellules de la souche sauvage qui ont été irradiées alors qu'elles étaient en phase G2/M. Par contre, le blocage au nocodazole induit encore une fois une accélération de la déphosphorylation de Rad53 (cf figures n°M9A, M9B et M9C). Le blocage de la sortie de mitose n'est donc clairement pas responsable de la « désactivation » plus rapide de Rad53 induite par le traitement au nocodazole. Ceci est en accord avec le fait que la délétion de *MAD2* supprime l'accélération de la « désactivation » de Rad53. En effet, en cas de traitement au nocodazole, le mutant *mad2Δ* passe certes sans retard la transition métaphase/anaphase, mais il reste bloqué au moins un certain temps en fin de mitose.

Figure n°M9



**Influence de différents points d'arrêt du cycle sur la réponse aux UV.**

- A. La souche sauvage L228 (DLY) est synchronisée à l' $\alpha$ -facteur à 23°C. Elle est ensuite relarguée dans un milieu frais à 37°C pendant 1h30. On lui fait alors subir une irradiation UV (40J/m<sup>2</sup>) à t=0. Elle reste par la suite incubée à 37°C. Des aliquots sont prélevés aux temps indiqués après irradiation et analysés par Western-Blot avec un anticorps dirigé contre la protéine Rad53.
- B. La souche sauvage L228 (DLY) est synchronisée à l' $\alpha$ -facteur à 23°C. Elle est ensuite relarguée dans un milieu frais contenant du nocodazole (15  $\mu$ g/ml) à 37°C pendant 1h30. On lui fait alors subir une irradiation UV (40J/m<sup>2</sup>) à t=0. Elle reste par la suite incubée à 37°C en présence de nocodazole. Des aliquots sont prélevés aux temps indiqués après irradiation et analysés par Western-Blot avec un anticorps dirigé contre la protéine Rad53.
- C. La souche L226 (DLY *cdc15-2*) est synchronisée à l' $\alpha$ -facteur à 23°C. Elle est ensuite relarguée à 37°C pendant 2h30. On lui fait alors subir une irradiation UV (40J/m<sup>2</sup>) à t=0. Elle reste par la suite incubée à 37°C. Des aliquots sont prélevés aux temps indiqués après irradiation et analysés par Western-Blot avec un anticorps dirigé contre la protéine Rad53.
- D. Analyse par FACS des points de la figure n°A.
- E. Analyse par FACS des points de la figure n°B.
- F. Analyse par FACS des points de la figure n°C.

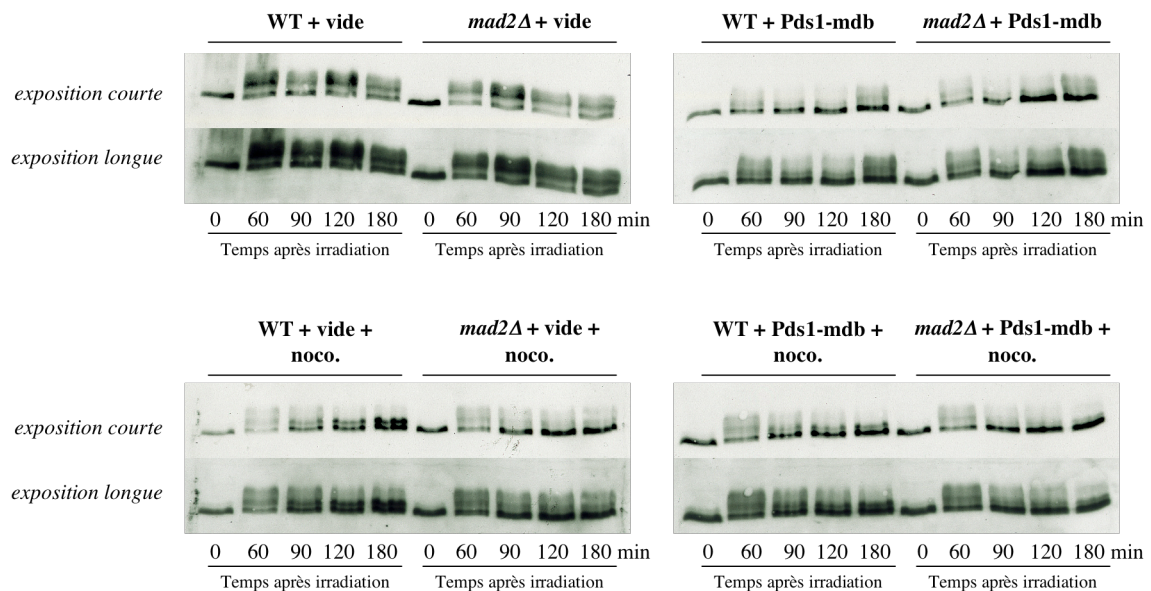
Il est arrivé que la souche sauvage soit irradiée alors qu'elle avait déjà progressé en mitose. C'est le cas par exemple pour l'expérience présentée sur la figure n°M7B, comme on peut en juger d'après l'analyse par FACS (cf figure n°M7C). Je n'ai jamais observé de conséquence de cela sur la cinétique de phosphorylation de Rad53 : Rad53 reste phosphorylée pendant au moins trois heures. Ceci est en accord avec les résultats obtenus par M.Clerici et ses collaborateurs qui montrent par exemple que l'irradiation UV, après un arrêt au nocodazole ou un arrêt à l' $\alpha$ -facteur sans maintien du blocage après l'irradiation, induit une phosphorylation de Rad53 qui est également maintenue pendant au moins 3 heures (Clerici et al., 2004). Ainsi, la cinétique de phosphorylation de Rad53 suite à l'irradiation aux UV d'une population asynchrone de cellules est similaire à celles observées lors de l'irradiation d'une population de cellules préalablement arrêtées à la transition métaphase/anaphase ou en G1 ou lors de l'irradiation d'une population de cellules maintenues bloquées en téléphase.

**2.3.2.4.2. Blocage de la transition métaphase/anaphase**

Pour étudier l'influence d'un blocage des cellules à la transition métaphase/anaphase indépendamment de l'activation du checkpoint du fuseau, j'ai utilisé le vecteur pGAL-PDS1-mdb qui permet de surexprimer une forme non dégradable de Pds1. J'ai synchronisé les cellules d'une souche sauvage et d'une souche *mad2 $\Delta$*  portant ou non le plasmide pGAL-PDS1-mdb à l' $\alpha$ -facteur en raffinose avant de les relarguer en présence ou en absence de nocodazole dans un milieu contenant du galactose. Une fois que les cellules ont atteint la phase G2/M, elles sont irradiées aux UV puis elles sont incubées à nouveau dans un milieu contenant du galactose en présence ou en absence de nocodazole comme précédemment. Cependant, comme le montre la figure n°M10, le résultat est loin d'être clair. Il est difficile d'interpréter l'expérience, parce que le fait que la phosphorylation de Rad53 soit maintenue dans les contrôles sans le vecteur pGAL-PDS1-mdb est déjà difficile à dire. En effet, pour les souches sauvages et *mad2 $\Delta$*  portant le vecteur vide et non traitées au nocodazole, Rad53 reste phosphorylée jusqu'à la fin de l'expérience ce qui est en accord avec les résultats déjà obtenus. Par contre, dans la souche *mad2 $\Delta$*  portant le plasmide vide et traité au nocodazole, la phosphorylation de Rad53 ne semble

pas être maintenue (cf figure n°M10). On ne peut donc tirer des conclusions sur les Western-Blots correspondant aux souches portant le plasmide pGAL-PDS1-mdb. J'ai déjà souligné le fait que mes expériences étaient parfois difficiles à interpréter lorsque les cellules cyclent moins rapidement (culture avec une transition raffinose/galactose ou culture à 20°C par exemple). Cette expérience en est un autre exemple. Ceci est peut-être dû au fait que les synchronisations sont moins efficaces dans ces conditions. Pour améliorer l'expérience et obtenir des conditions dans lesquelles on voit clairement une différence entre la souche sauvage et le mutant *mad2Δ*, dans le cas où les deux souches portent le plasmide vide et sont incubées en présence de nocodazole, j'ai essayé de changer le moment de l'irradiation (en irradiant 15 min avant ou après le moment opportun). J'ai également essayé de changer de fond génétique (certains fonds restent mieux synchronisés que d'autres après le relargage d'un blocage à l' $\alpha$ -facteur), et/ou d'augmenter la dose d'UV (pour avoir une phosphorylation de Rad53 maintenue plus longtemps dans la souche *mad2Δ* traitée au nocodazole). Aucun de ces essais n'a permis d'améliorer le résultat.

**Figure n°M10**



**Influence de la surexpression de *PDS1-mdb* et du nocodazole sur la réponse aux UV.**

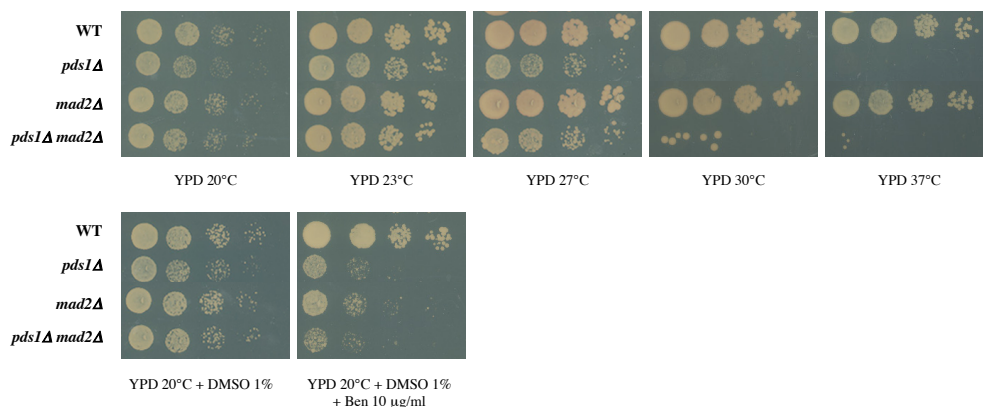
Les souches L208 (Y300 *bar1Δ*) et L266 (Y300 *bar1Δ mad2Δ*) portant ou non le plasmide p416GAL1/PDS1-mdb-HA (pOC57-HA) sont synchronisées à l' $\alpha$ -facteur en raffinose avant d'être relarguées dans un milieu contenant du galactose en présence ou en absence de nocodazole (15  $\mu$ g/ml) pendant 1h50. Les cellules sont alors irradiées aux UV (40J/m<sup>2</sup>) puis incubées à nouveau dans un milieu contenant du galactose en présence ou en absence de nocodazole comme précédemment. Des aliquots sont prélevés aux temps indiqués après irradiation et analysés par Western-Blot avec un anticorps dirigé contre la protéine Rad53.

Puisque les conditions expérimentales censées induire un blocage artificiel de la transition métaphase/anaphase ne nous permettent pas de savoir si la « désactivation » plus rapide de Rad53 induite par le nocodazole après une irradiation UV est due à ce blocage, nous avons essayé de

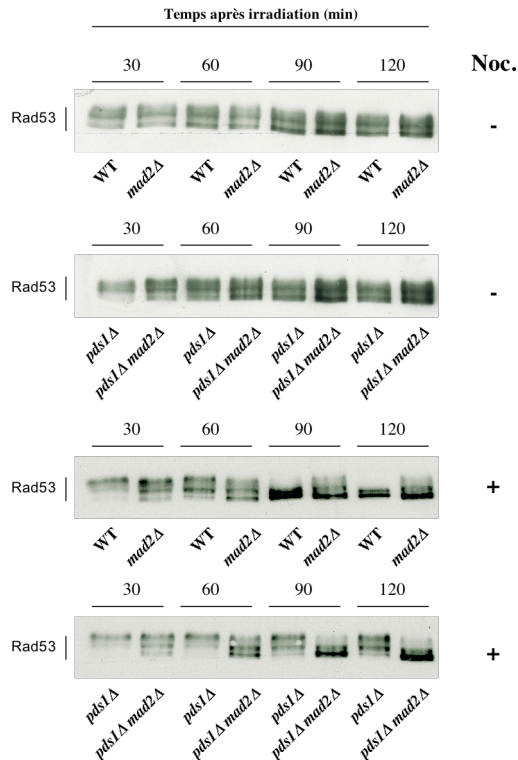
supprimer ce blocage dans notre expérience. Pour cela, nous avons utilisé des mutants *pds1Δ*. Nous avons synchronisé les souches *pds1Δ* et *pds1Δ mad2Δ* à l'α-facteur à 20°C avant de les relarguer en présence de nocodazole et de les irradier aux UV lorsque les cellules atteignent la phase G2/M. Si les souches sont incubées à 20°C (température permissive pour le mutant *pds1Δ* (cf figure n°M11A)) après le relargage de l'α-facteur, nous retrouvons le même problème que précédemment : la phosphorylation de Rad53 dans la souche *mad2Δ* traitée au nocodazole dans ces conditions ne semble pas être maintenue (données non montrées). C'est pourquoi nous avons relargué les souches à 30°C après la synchronisation à l'α-facteur. La figure n°M11B présente le résultat obtenu avec en parallèle les contrôles effectués sur une souche sauvage et un mutant *mad2Δ* traités ou non au nocodazole. Les expériences contrôles confirment les données obtenues précédemment, à savoir que la déphosphorylation de Rad53 est plus rapide chez la souche sauvage si elle est traitée au nocodazole. La souche *mad2Δ* semble maintenir la phosphorylation de Rad53 qu'elle soit traitée ou non au nocodazole comme c'était le cas dans l'expérience présentée dans les figures n°5A et 5B. Cependant, les résultats obtenus pour les mutants *pds1Δ* sont difficiles à interpréter avec nos connaissances actuelles sur les fonctions de Pds1. En effet, la souche *pds1Δ* traitée au nocodazole maintient un fort taux de phosphorylation de Rad53. Ceci semblerait indiquer que le blocage à la transition métaphase/anaphase est responsable du phénomène de « désactivation » de Rad53 induit par le nocodazole. Cependant, les souches *pds1Δ* et *pds1Δ mad2Δ* traitées au nocodazole ont clairement un comportement différent aux temps tardifs après irradiation, alors qu'elles devraient toutes les deux maintenir un fort taux de phosphorylation de Rad53. De façon surprenante, Rad53 semble être « sur-activée » après irradiation chez le mutant *pds1Δ* lorsque celui-ci est traité au nocodazole.

**Figure n°M11**

A



B



**Influence de la délétion de *PDS1* et du nocodazole sur la réponse aux UV.**

- A. La sensibilité des souches L64 (YPH499), L48 (YPH499 *mad2Δ*), L199 (YPH499 *pds1Δ*) et L273 (YPH499 *pds1Δ mad2Δ*) est testée sur bénomyle et à différentes températures. Des dilutions sérielles au 1/10 de cultures en phase exponentielle sont «spottées» sur les milieux indiqués puis examinées 2 à 5 jours plus tard.
- B. Les souches L64 (YPH499), L48 (YPH499 *mad2Δ*), L199 (YPH499 *pds1Δ*) et L273 (YPH499 *pds1Δ mad2Δ*) sont synchronisées à l' $\alpha$ -facteur à 20°C avant d'être relarguées à 30°C en présence ou en absence de nocodazole (15  $\mu$ g/ml) pendant 1h45. Les cellules sont alors irradiées aux UV (40J/m<sup>2</sup>) puis incubées à nouveau à 30°C en présence ou en absence de nocodazole. Des aliquots sont prélevés aux temps indiqués après irradiation et analysés par Western-Blot avec un anticorps dirigé contre la protéine Rad53.

Des éléments dans la littérature semblent indiquer que des biais potentiels pourraient être présents dans cette dernière expérience et qu'elle doit être considérée avec précaution. A. Yamamoto et ses collaborateurs ont fait subir le traitement suivant au mutant *pds1-1* : synchronisation à l' $\alpha$ -facteur à 23°C, puis incubation à 37°C pendant une heure en maintenant le blocage à l' $\alpha$ -facteur et enfin relargage à 37°C. Ils ont remarqué qu'après avoir subi ce traitement, le mutant n'était pas capable d'atteindre la télophase. Ils ont aussi montré que ce n'était pas le cas, si à la place de l' $\alpha$ -facteur, on bloquait les cellules avec de l'hydroxyurée ou du nocodazole (Yamamoto et al., 1996a). Par ailleurs, ils indiquent que si le mutant *pds1-1* est incubé à 37°C entre les points d'arrêt de l' $\alpha$ -facteur et de l'hydroxyurée et qu'il est ensuite réincubé à 23°C, les cellules n'arrivent pas non plus à atteindre la télophase (Yamamoto et al., 1996a). Ils en ont conclu qu'en plus de son rôle dans la ségrégation des chromatides sœurs, Pds1 devait jouer un autre rôle plus tôt dans le cycle. Des éléments suggèrent que ce rôle serait requis

pour l'élongation du fuseau en anaphase et indispensable à la survie cellulaire à 37°C (Yamamoto et al., 1996a). De façon liée ou non, il a également été montré que Pds1 était nécessaire à l'accumulation d'Esp1 dans le noyau, probablement via l'interaction Pds1/Esp1 qui a lieu pendant la phase S (Agarwal and Cohen-Fix, 2002).

Au cours de mon expérience, les cellules *pds1Δ* ont été synchronisées à l' $\alpha$ -facteur à 20°C, puis lavées et reprises dans un milieu également à 20°C avant d'être placées dans un incubateur à 30°C. Je ne sais pas si ce protocole aurait permis aux cellules délétées pour *PDS1* de passer le point critique décrit par A. Yamamoto et ses collaborateurs (Yamamoto et al., 1996a). On ne peut pas utiliser un blocage à l'hydroxyurée au lieu de l' $\alpha$ -facteur, qui éliminerait pourtant ce problème, car Rad53 est phosphorylée lors d'un traitement à l'hydroxyurée. On ne peut pas non plus utiliser un mutant thermosensible pour bloquer le cycle puisque des conditions de température sont déjà imposées par la délétion de *PDS1*. Par ailleurs, nous ne savons pas non plus dans quelle mesure le rôle d'Esp1 est affecté dans cette expérience. Toutefois, les éventuels biais dus aux autres rôles de Pds1 indiqués précédemment ne peuvent expliquer le fait que les souches *pds1Δ* et *pds1Δ mad2Δ* se comportent différemment.

### 2.3.2.5. Conclusion : le traitement au nocodazole modifie la réponse aux stress génotoxiques

Plusieurs de nos données indiquent que la traitement au nocodazole d'une souche sauvage modifie sa réponse au stress génotoxique. En particulier, elle semble accélérer la « désactivation » de Rad53 après une irradiation UV. Nous avons montré que cette « désactivation » était bien dépendante du checkpoint du fuseau, qu'elle n'était pas spécifique des lésions UV et qu'elle n'était probablement pas due à une réparation plus efficace des dommages. J'aurais aimé analyser plus précisément les relations entre la « désactivation » plus rapide de Rad53 et le blocage à la transition métaphase/anaphase causé par l'ajout de nocodazole. Dans une étude de M. Pia Longhese, on peut voir que la déphosphorylation de Rad53 après une irradiation UV est aussi rapide dans des cellules maintenues arrêtées au nocodazole ou à l' $\alpha$ -facteur (Clerici et al., 2004). Ce résultat illustre encore une fois la complexité des liens entre blocage du cycle, checkpoint du fuseau et déphosphorylation de Rad53 sont complexes.

L'étude des mutants *pds1Δ* pourrait également remettre en cause la corrélation entre le doublet et la « désactivation » plus rapide de Rad53 induite par le nocodazole après une irradiation UV. En effet, la mutation n'empêche pas la formation du doublet en cas de traitement au nocodazole (cf figure n°3G), par contre, elle empêche la déphosphorylation plus rapide de Rad53 (cf figure n°M11B). Il serait donc très intéressant de savoir si le résultat obtenu dans l'expérience avec irradiation est biaisé par des rôles de Pds1 autres que celui de promoteur de la séparation des chromatides sœurs.

## 3. Discussion

### 3.1. Les phosphorylations de Rad53 et Rad9 induites par le nocodazole

#### 3.1.1. Caractérisation

Rad9 et Rad53 sont phosphorylées suite à l'activation du checkpoint du fuseau, que celui-ci soit activé par un traitement au nocodazole ou via la surexpression de *MPS1* (cf figures n°1A et



1C). Ces phosphorylations ne semblent pas être une conséquence indirecte de l'arrêt imposé par le checkpoint du fuseau, puisque l'état de phosphorylation de Rad53 n'est pas modifié lors d'un arrêt à la transition métaphase/anaphase imposé par la surexpression d'une forme non dégradable de Pds1 et lors d'un arrêt en télophase imposé par la mutation *cdc15-2*, alors que ces deux points correspondent aux deux blocages imposés par le checkpoint du fuseau (cf figures n°3F et M2B). Par ailleurs, la formation du doublet est indépendante de *PDS1*, ce qui montre que l'arrêt à la transition métaphase/anaphase n'est pas nécessaire à la phosphorylation de Rad53 engendrée par l'activation du checkpoint du fuseau (cf figure n°3G). Ces modifications semblent disparaître lorsque le checkpoint du fuseau est inactivé : Rad53 est déphosphorylée après le relargage d'un blocage au nocodazole et la phosphorylation de Rad53 est transitoire chez le mutant *bub2Δ* qui est défectueux pour le maintien de l'arrêt lors d'un traitement au nocodazole, ce qui suggère qu'il est également défectueux pour le maintien de l'activité du checkpoint du fuseau (cf figures n°3A et 4A).

Tout comme l'induction transcriptionnelle des gènes *RNR* est considérée comme un marqueur de l'activation de la voie des checkpoints de l'ADN dépendante de Rad53, les phosphorylations de Rad53 et Rad9 mises en évidence au cours de notre étude pourraient être considérées comme des marqueurs de l'activité du checkpoint du fuseau indépendants de l'établissement d'un blocage de l'initiation de l'anaphase par ce checkpoint. Leur étude pourrait compléter celle de la phosphorylation de Mad1 qui possède l'inconvénient d'être dépendante de *MAD2*, *BUB1*, et *BUB3* en cas de traitement au nocodazole et d'en être indépendante en cas de surexpression de *MPS1* (Hardwick and Murray, 1995; Hardwick et al., 1996).

L'étude de ce marqueur nous permet de penser, comme l'avaient suggéré W.Palframan et ses collaborateurs, que le checkpoint du fuseau n'est pas actif en télophase (Palframan et al., 2006). En effet, la présence de nocodazole n'induit pas la formation du doublet dans les cellules *cdc15-2* préalablement bloquées à température restrictive (cf figure n°M2B). Par ailleurs, cette donnée conforte l'idée que la dégradation de Mps1 de façon dépendante de l'APC soit nécessaire à l'inhibition de l'activité du checkpoint du fuseau après la transition métaphase/anaphase, puisque le traitement au nocodazole, contrairement à la surexpression de *MPS1*, ne serait pas capable de réactiver le checkpoint en télophase (cf figure n°M2B et (Palframan et al., 2006)).

Il est intéressant de noter que certaines drogues utilisées pour activer le checkpoint du fuseau entraînent également des phosphorylations spécifiques de certaines protéines des checkpoints de l'ADN chez les eucaryotes supérieurs. C'est le cas notamment pour un des homologues potentiels de Rad9, 53BP1, qui montre une phosphorylation spécifique en cas de traitement à la colcémide<sup>1</sup> (cf figure n°M12C et (Jullien et al., 2002)). Chk1 est également phosphorylée suite à un traitement au taxol ou au nocodazole sur un (des) site(s) différent(s) de la sérine 345 et la sérine 317 (qui sont phosphorylés en cas de stress génotoxique) (Zachos et al., 2007).

---

<sup>1</sup> La colcémide est un agent qui entraîne, comme le nocodazole ou le bénomyle, une dépolymérisation des microtubules.

### 3.1.2. Signification(s) physiologique(s) des phosphorylations de Rad9 et Rad53 induites par le nocodazole

#### 3.1.2.1. Rad9 et Rad53 sont-elles impliquées dans la réponse aux dommages du fuseau ?

Notre première interrogation a été de savoir si ces modifications étaient nécessaires à la réponse aux dommages du fuseau ou plus globalement à tout type de stress engendrant l'activation du checkpoint du fuseau. Cependant, les résultats que nous avons obtenus, ainsi que les données de la littérature, suggèrent que Rad9 et Rad53 ne sont pas des effecteurs du checkpoint du fuseau, puisque ces protéines ne semblent pas être requises pour l'activation de ce checkpoint. En effet, l'absence de *RAD9* ou *RAD53* n'affecte pas la survie de cellules exposées au bénomyle ou de cellules surexprimant *MPS1* (cf figure n°M4 et données non montrées). Rad9 et Rad53 ne sont pas nécessaires à l'établissement et au maintien de l'arrêt induit par le nocodazole et Rad53 n'est pas requise pour la phosphorylation de Mad1 lors d'un traitement au nocodazole (cf figures n°M5 et M6). Par ailleurs, il a été montré que *RAD9*, contrairement à *MAD2* ou *BUB1*, n'était pas nécessaire à l'arrêt du cycle induit par la mutation *ctf13-30*, qui affecte une protéine du kinétochore, et que la délétion de *RAD9* n'influence pas la viabilité du mutant *ctf13-30* à température restrictive (Pangilinan and Spencer, 1996). En outre, le retard en G2/M induit par une mutation de l'ADN centromérique n'est pas affecté chez le mutant *rad9Δ* (Pangilinan and Spencer, 1996).

Toutefois, les modifications de Rad9 et Rad53 lors de l'activation du checkpoint du fuseau pourraient indiquer que ces protéines sont des cibles de ce checkpoint, qui auraient alors probablement une fonction mineure dans la réponse aux dommages du fuseau. À ce stade, il est intéressant de citer une étude qui semble mettre en évidence un rôle direct de Rad53 dans la régulation de la dynamique du fuseau. L'objet de ce travail est plus précisément l'étude de l'inhibition de l'élongation du fuseau lors d'un stress réplicatif (Krishnan et al., 2004). Lors d'un traitement à l'hydroxyurée, les cellules sauvages s'arrêtent en début de phase S avec un gros bourgeon, un noyau non divisé et un petit fuseau. Par contre, les mutants *mec1* et *rad53* allongent leur fuseau dans les mêmes conditions, ce qui conduit à une division asymétrique du noyau largement haploïde. Cette élongation du fuseau ne dépend pas du complexe APC et a lieu alors que la sous-unité Scc1 de la cohésine n'est pas clivée. Chez le mutant *mec1* traité à l'hydroxyurée, on observe une accumulation d'effecteurs impliqués dans l'élongation du fuseau comme Cin8 ou Stu2. La surexpression de *CIN8* permet aux cellules sauvages traitées à l'hydroxyurée d'allonger leur fuseau et de subir la division nucléaire. Au contraire, la mutation de *CIN8* et *STU2* réduit la fraction de cellules *mec1* qui allongent leur fuseau et subissent une division nucléaire. Ainsi, le checkpoint de la réplication semble moduler directement la dynamique du fuseau en régulant les effecteurs impliqués dans l'élongation du fuseau, ce qui a probablement pour conséquence de restreindre la division nucléaire. Ainsi, l'absence d'élongation du fuseau maintenue par le checkpoint ne résulte pas indirectement, comme on le pensait, d'une inhibition de l'entrée en mitose ou d'une inhibition de la dégradation de Pds1 (Krishnan et al., 2004). Il est probable que Rad53 et Mec1 affectent également le fonctionnement du fuseau en l'absence de stress réplicatif. En effet, une forte surexpression de *RAD53* entraîne un arrêt en G2/M des cellules, qui montrent alors des fuseaux anormalement petits, et un taux réduit de Cin8 et Stu2. Ces défauts ne semblent pas être dus à une activation artificielle du checkpoint de l'ADN puisque la délétion de *PDS1* ne permet pas à ces cellules d'allonger leur

fuseau et ne supprime pas la morphologie anormale de leur fuseau (Krishnan et al., 2004). Par ailleurs, la mutation de *RAD53* ou *MEC1* supprime un défaut du mutant *cdc28-as*, à savoir l'absence apparente de fuseau, ce qui suggère à nouveau que Rad53 et Mec1 peuvent affecter la dynamique du fuseau en dehors du contexte d'un checkpoint de l'ADN activé (Krishnan et al., 2004). On peut donc imaginer que Rad53 soit ciblée par le checkpoint du fuseau pour renforcer l'inhibition de l'élongation du fuseau. Nous savons que l'élongation du fuseau est déjà inhibée par le maintien de la cohésion des chromatides sœurs. Cependant, la surexpression de *CIN8* ne permet l'élongation du fuseau que si les cellules sont en début de phase S, au moment où la cohésion est certainement moins forte. Elle ne permet pas l'élongation du fuseau chez le mutant *cdc13-1*, qui s'arrête à la transition métaphase/anaphase dans des conditions similaires à l'arrêt induit par des dommages du fuseau, ou dans des cellules bloquées à l'entrée de la mitose (Krishnan et al., 2004). Ainsi, l'élongation du fuseau serait inhibée par deux mécanismes : un mécanisme prépondérant résultant du maintien de la cohésion des chromatides sœurs, et un mécanisme mineur dépendant de Rad53. Cette hypothèse serait en accord avec l'idée d'une implication mineure de Rad53 dans la réponse aux dommages du fuseau. Ce rôle ne pourrait à mon avis être mis en évidence qu'en présence d'un défaut de cohésion, défaut qui active le checkpoint du fuseau. Le fait que la délétion de *RAD9*, contrairement à la délétion de *MAD2*, n'empêche pas l'accumulation en G2/M des mutants *ctf8Δ* et *ctf18Δ* défectueux pour la cohésion des chromatides sœurs (Hanna et al., 2001; Mayer et al., 2001) suggère que Rad9 ne participerait pas à ce blocage de l'élongation du fuseau. Cependant, dans ces études, le suivi de l'accumulation est fait par une analyse FACS, analyse assez grossière qui ne permet de suivre que le retour des cellules en G1. Une analyse plus fine pourrait peut-être permettre de mettre en évidence, dans un contexte de défaut de cohésion des chromatides sœurs, une accélération de l'élongation du fuseau chez le mutant *rad53Δ* et chez le mutant *rad9Δ*.

Des données obtenues chez les eucaryotes supérieurs confortent l'idée d'une implication potentielle de Rad53 et Rad9, ou plus globalement des protéines des checkpoints de l'ADN dans la régulation du fonctionnement du fuseau, voire dans la réponse engendrée par l'activation du checkpoint du fuseau.

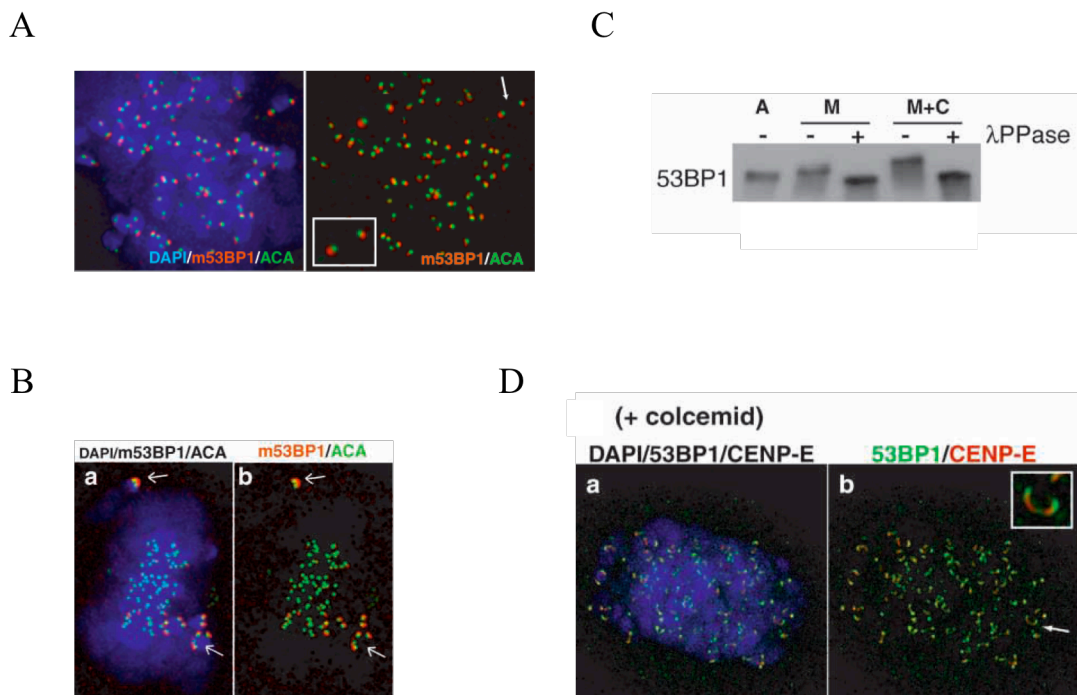
Tout d'abord, comme nous le détaillons ci-dessous, il a été montré que les homologues potentiels de Rad9 (Brca1 et 53BP1) et l'homologue de Rad53 (Chk2) sont associés aux centrosomes ou aux kinétochores chez les mammifères. Ceci pourrait être indicateur d'un rôle de ces protéines dans le fonctionnement du fuseau ou dans l'attachement kinétochore/microtubule. Il est par ailleurs intéressant de rappeler que les protéines du checkpoint du fuseau montrent également de telles localisations, ce qui suggère que Brca1, 53BP1 et Chk2 pourraient être ciblées par les composants de ce checkpoint.

Brca1 est nécessaire à l'arrêt induit par un stress génotoxique en phases S et G2. Elle est phosphorylée par ATM/ATR et est nécessaire à l'activation de Chk1/Chk2 suite à des dommages de l'ADN. Elle est également impliquée dans plusieurs voies de réparation (Nyberg et al., 2002). Il a été montré que Brca1 interagissait en co-immunoprécipitation avec la tubuline  $\gamma$ , un des composants des centrosomes qui s'associe aux microtubules et qui est responsable de leur nucléation (Hsu and White, 1998). De plus, une analyse par immunofluorescence montre une colocalisation de Brca1 avec la tubuline  $\gamma$  dans les cellules en prométaphase et en métaphase (Hsu and White, 1998). Il est intéressant de noter que seule la forme hypophosphorylée interagit avec la tubuline  $\gamma$  et est présente au niveau des centrosomes, ce qui suggère que la fonction potentielle

liée à cette localisation est indépendante du rôle de Brca1 dans la réponse aux dommages de l'ADN (Hsu and White, 1998).

La protéine 53BP1 a été identifiée originellement comme interagissant en double-hybride avec la protéine p53. 53BP1 est impliquée dans la réponse aux dommages de l'ADN et joue notamment un rôle dans la phosphorylation de Chk2 par ATM. Elle est hyperphosphorylée en cas de stress génotoxique et est relocalisée sous forme de foci après des radiations ionisantes, foci qui colocalisent avec les foci formés par l'histone H2AX phosphorylée. Il a été montré par immunofluorescence que 53BP1 était localisée au niveau des kinétochores en mitose, plus précisément à partir de la prophase jusqu'en début d'anaphase, probablement au niveau de la couronne fibreuse (cf figure n°M12A et (Jullien et al., 2002)). De façon intéressante, le signal semble être plus fort au niveau du kinétochore des chromosomes qui ne sont pas attachés. En effet, la fluorescence est plus forte avant la prométaphase, elle est également plus forte au niveau du kinétochore des chromosomes qui tardent à s'aligner au niveau de la plaque équatoriale, et du kinétochore de tous les chromosomes lors d'un traitement à la colcémide (cf figures n°M12B, M12D et (Jullien et al., 2002)). L'étude de la localisation de 53BP1 rappelle fortement les données obtenues concernant la localisation des protéines du checkpoint du fuseau Bub1, BubR1, Mad2 et Bub3.

**Figure n°M12**

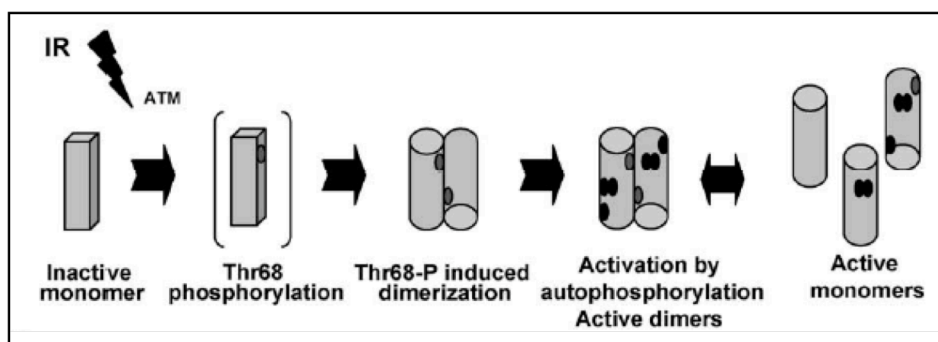


**53BP1 est localisée au niveau des kinétochores non attachés et est phosphorylée en cas d'activation du checkpoint du fuseau. Extrait de (Jullien et al., 2002).**

- A. Superposition des signaux obtenus par immunofluorescence avec des anticorps dirigés contre les centromères (ACA, « Anti-Centromeric Antibodies ») et la protéine 53BP1 dans des cellules fibroblastiques de souris (NIH3T3) en prométaphase. Le signal obtenu après une coloration de l'ADN au DAPI est également superposé sur l'image de gauche. La flèche indique quel centromère est visualisé dans l'encart.
- B. Superposition des signaux obtenus par immunofluorescence avec des anticorps dirigés contre les centromères (ACA, « Anti-Centromeric Antibodies ») et la protéine 53BP1 dans des cellules fibroblastiques de souris (NIH3T3) en fin de prométaphase. Le signal obtenu après une coloration de l'ADN au DAPI est également superposé sur l'image de gauche (bleu, a). Les flèches indiquent les chromosomes qui ne sont pas alignés sur la plaque équatoriale.
- C. Analyse par Western-Blot de la protéine 53BP1, immunoprécipitée à partir d'extraits de cellules HeLa asynchrones (A), en mitose (M) ou bloquées en mitose par un traitement à la colcémide (M+C). Les immunoprécipités ont été incubés en présence (+) ou en absence (-) de phosphatase  $\lambda$  ( $\lambda$ PPase). 53BP1 est phosphorylée en mitose et hyperphosphorylée après un traitement à la colcémide.
- D. Superposition des signaux obtenus par immunofluorescence avec des anticorps dirigés contre la protéine centromérique CENP-E et la protéine 53BP1 dans des cellules HeLa bloquées en mitose par un traitement à la colcémide. Le signal obtenu après une coloration de l'ADN au DAPI est également superposé sur l'image de gauche (bleu, a). La flèche indique quel centromère est visualisé dans l'encart.

La phosphorylation de résidus situés dans le domaine SCD (« SQ/TQ Cluster Domain ») de Chk2 est une des premières étapes de l'activation de cette kinase après un stress génotoxique (cf figure n°M13). Plus particulièrement, la thréonine 68 située dans le domaine SCD est phosphorylée en cas de cassures double-brin, probablement par ATM qui est le régulateur majeur de Chk2 lors de cette réponse, et par ATR en cas de stress répliatif ou après une irradiation UV. La protéine Chk2 entre par la suite dans un processus d'oligomérisation et d'autophosphorylation. Ce processus conduit à la phosphorylation des résidus T383 et T387, situés dans la boucle d'activation de Chk2. Il a été montré par immunofluorescence que les protéines Chk2 phosphorylées sur la thréonine 68 colocalisaient avec la tubuline  $\gamma$  au niveau des centrosomes, en interphase comme en mitose, en l'absence de stress génotoxique, alors qu'un anticorps anti-Chk2 non spécifique des formes phosphorylées montre un signal diffus nucléaire et cytoplasmique (Tsvetkov et al., 2003). Ceci suggère que des formes phosphorylées de Chk2 pourraient être impliquées dans la régulation du fonctionnement du fuseau.

**Figure n°M13**



**Modèle d'activation de Chk2 chez les mammifères. Extrait de (Ahn et al., 2004).**

Suite à une irradiation, ATM phosphoryle Chk2 sur la thréonine 68. Chk2 se dimérise alors et s'autophosphoryle. Les dimères ou monomères phosphorylés peuvent alors phosphoryler leurs substrats.

Les localisations de Brca1, 53BP1 et Chk2 sont surprenantes, mais il n'a pas été montré qu'elles étaient liées à une implication de ces protéines dans le checkpoint du fuseau ou dans le fonctionnement du fuseau. Toutefois, d'autres données obtenues chez les eucaryotes supérieurs font penser que les protéines des checkpoints de l'ADN pourraient être impliquées dans ces mécanismes. Ainsi, comme nous le détaillons ci-dessous, (i) ATM semble être impliquée dans un processus d'amplification des centrosomes lors d'un stress génotoxique important chez les cellules DT40 (Dodson et al., 2004), (ii) DmChk2 serait responsable, dans certaines conditions, de l'inactivation des centrosomes et de l'inhibition de la ségrégation des chromatides sœurs chez la drosophile (Takada et al., 2003), (iii) Brca1 pourrait être impliquée dans le checkpoint du fuseau via sa capacité à réguler l'expression des gènes de ce checkpoint chez les mammifères (Wang et al., 2004) et enfin, (iv) Chk1 serait nécessaire à la réponse engendrée par le checkpoint du fuseau, spécifiquement lors d'un défaut de tension dans les cellules DT40 (Zachos et al., 2007).

L'irradiation gamma ou une déficience en Rad51, protéine impliquée dans la recombinaison homologue, induisent un arrêt en G2 dans les cellules DT40. Cependant, les cellules arrivent à échapper à l'arrêt et entrent en mitose. Une proportion significative de ces cellules montrent un nombre anormal de centrosomes et des anomalies du fuseau (Dodson et al., 2004). Par exemple, 24 heures après l'induction de la déficience en Rad51, 35% des cellules montrent 3 centrosomes ou plus. L'augmentation du nombre de centrosomes dans les cellules irradiées dépend quant à elle de la dose infligée (Dodson et al., 2004). Cette accumulation des centrosomes semble avoir lieu pendant l'arrêt en G2, alors que la duplication normale du centrosome a lieu en phase S. Le traitement à la caféine ou la wortmannine, ou la déficience en ATM suppriment le nombre anormal de centrosomes dans les cellules DT40 déficientes pour la recombinaison homologue (Dodson et al., 2004). Ceci suggère que le phénomène d'amplification des centrosomes dépend des checkpoints de l'ADN. Cependant, l'amplification pourrait être une conséquence indirecte de l'activation des checkpoints de l'ADN, et résulter seulement de l'arrêt du cycle, qui pourrait découpler le processus de duplication du centrosome des autres événements du cycle. Cette amplification pourrait toutefois avoir une signification physiologique, à savoir empêcher la survie des cellules qui ont subi des dommages importants et qui sont parvenues à échapper à l'arrêt (Dodson et al., 2004).

Chez les embryons syncytiaux de drosophile, les noyaux de la couche corticale qui entrent en mitose après avoir subi un stress génotoxique (particulièrement des cassures double-brin) montrent des centrosomes et un fuseau non fonctionnels, alors que ceux-ci ne semblaient pas défectueux pendant l'interphase. On observe en parallèle un échec total de la ségrégation des chromosomes et de la division de ces noyaux. Ces noyaux endommagés se détachent de la couche corticale et sont ainsi éliminés du pool de cellules qui donnera naissance au futur organisme (Takada et al., 2003). La mutation du gène *nmk* codant pour la protéine DmChk2 supprime le phénomène d'inactivation des centrosomes et du fuseau dans les cellules ayant subi des dommages en interphase et qui sont parvenues jusqu'à la mitose. Elle permet une élongation

apparemment normale du fuseau en anaphase et empêche l'élimination des noyaux endommagés (Takada et al., 2003). Ainsi, l'inactivation du centrosome dans les noyaux sauvages en cas de stress génotoxique pourrait être à l'origine de l'inhibition de la ségrégation des chromosomes et ainsi de l'élimination des noyaux. Il a été montré que DmChk2 pourrait intervenir à deux niveaux dans ce processus. En effet, DmChk2 est responsable de l'inactivation du centrosome en début de mitose dans ces conditions, et semble jouer indépendamment un rôle dans le processus d'élimination des noyaux, processus qui nécessite l'altération des liens entre centrosomes et noyaux (Takada et al., 2003). En effet, l'induction de cassures double-brin en mitose n'induit pas d'inactivation du centrosome mais bloque la ségrégation des chromatides sœurs. Dans ce cas-là, les noyaux sont éliminés de façon dépendante de *nmk* (Takada et al., 2003). Par ailleurs, il a été montré que DmChk2 localise au niveau des centrosomes et des microtubules. Cette localisation est plus importante en présence de dommages de l'ADN, ce qui suggère que DmChk2 pourrait modifier directement des composants de la machinerie de ségrégation (Takada et al., 2003).

Le traitement préalable au nocodazole de cellules MEFs (« Mouse Embryonic Fibroblast ») empêche ces cellules de sortir de mitose pendant plusieurs jours. L'inactivation de *Brcal* supprime cette inhibition, ce qui est en accord avec le fait que les cellules déficientes pour *Brcal* ne maintiennent pas dans ces conditions un fort taux de cycline B1 et une forte activité Cdk1 (Wang et al., 2004). De plus, l'inactivation de *Brcal* augmente la sensibilité des cellules au nocodazole (Wang et al., 2004) et la surexpression d'un peptide dominant-négatif de *Brcal* altère l'arrêt induit par un traitement à la colchicine (Hsu and White, 1998). L'ensemble de ces données suggèrent que les cellules déficientes en *Brcal* sont défectueuses pour le checkpoint du fuseau. Ceci est en accord avec le fait qu'une forte proportion de cellules mitotiques déficientes pour *Brcal* passe l'anaphase en présence de chromosomes non attachés ou sépare de façon prématurée leurs chromatides sœurs (Wang et al., 2004) et également avec le fait qu'une expression réduite de *BRCAL* accélère la progression en G2/M (Hsu and White, 1998). R. Wang et ses collaborateurs ont montré que cette déficience pour le checkpoint du fuseau semble résulter d'une moindre expression des protéines de ce checkpoint. Ils ont par ailleurs montré que *Brcal* se lie au promoteur de *MAD2* probablement de façon concomitante avec le facteur de transcription Oct1, ce qui permet à *Brcal* de réguler positivement l'expression de *MAD2* (Wang et al., 2004). *Brcal* pourrait donc être nécessaire à la réponse aux dommages du fuseau, au moins en partie parce qu'elle est capable de réguler la transcription des gènes du checkpoint du fuseau. *Brcal* pourrait ainsi influencer sur l'activation et/ou l'inactivation du checkpoint du fuseau.

Enfin, une étude dans les cellules DT40 et dans des lignées de cellules humaines semble indiquer que Chk1 pourrait également jouer un rôle dans le checkpoint du fuseau, plus spécifiquement dans la réponse au taxol<sup>1</sup>. En effet, les cellules déficientes pour Chk1 ne sont pas capables de maintenir l'arrêt en mitose induit par le taxol. Elles montrent une décondensation de leurs chromosomes, une faible activité Cdk1 et ne sont pas capables de maintenir l'accumulation des cyclines B en présence de cette drogue. Après la sortie de mitose, les cellules subissent une reréplication et accumulent un contenu d'ADN supérieur à 4C. Ces défauts ne sont pas observés si l'on traite ces cellules au nocodazole (Zachos et al., 2007). La déficience en Chk1 semble donc conférer un défaut pour le checkpoint du fuseau qui pourrait être responsable du fort taux d'initiation de l'anaphase en présence de chromosomes non alignés sur la plaque équatoriale et des nombreux caryotypes aberrants observés dans les cellules déficientes en Chk1 (Zachos et al.,

---

<sup>1</sup> Le taxol stabilise les microtubules en empêchant leur dépolymérisation mais cette stabilisation altère la dynamique des microtubules. Il a été supposé que le taxol générerait des défauts de tension au niveau des kinétochores. Toutefois, des défauts d'attachement kinétochore/microtubule ne peuvent être exclus. Nous rappelons que le nocodazole entraîne au contraire la dépolymérisation des microtubules et empêche la formation du fuseau.

2007). Par ailleurs, il a été montré que Chk1 montrait une localisation aux kinétochores en prométaphase et qu'elle était nécessaire au recrutement de BubR1 au niveau des kinétochores et à la phosphorylation de BubR1 lors d'un traitement au taxol, mais pas lors d'un traitement au nocodazole (Zachos et al., 2007). Ces données renforcent l'idée d'une implication de Chk1 dans la réponse à certains types de défauts qui activent le checkpoint du fuseau.

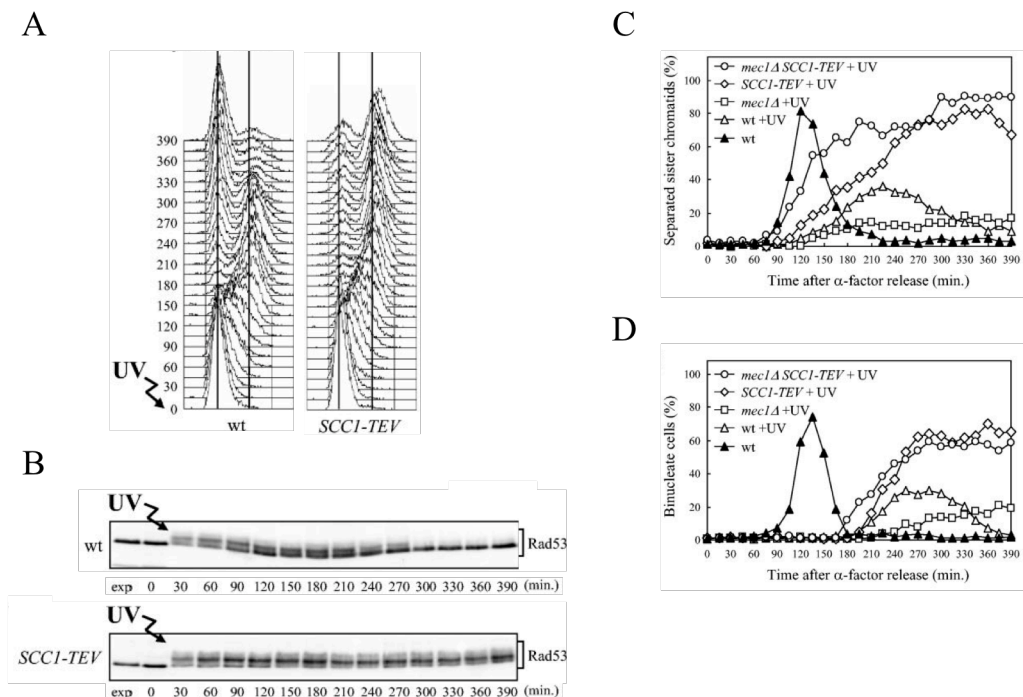
### 3.1.2.2. Les phosphorylations de Rad9 et Rad53 induites par le nocodazole modifient-elles leur réponse en cas de stress génotoxique ?

Nous avons vu que l'état activé du checkpoint du fuseau engendrait spécifiquement une désactivation plus rapide de Rad53 et une phosphorylation plus importante de Rad9 après une irradiation UV (cf figures n°5A, 5B et M7B). Ce phénomène nous a semblé dans un premier temps être corrélé à la présence des modifications de Rad53 et Rad9 induites par le nocodazole en absence de stress génotoxique. Nous avons donc pensé que les formes modifiées de Rad53 et Rad9 induites par le nocodazole pourraient être des formes « pré-activées » de ces protéines. Cette hypothèse aurait pu permettre d'expliquer une éventuelle réponse plus rapide aux stress génotoxiques en leur présence. Cependant, aucune donnée ne nous permet d'affirmer que la réponse est effectivement plus rapide et le fait que Rad53 ne soit pas rapidement déphosphorylée chez le mutant *pds1Δ* (cf figure n°M11) alors que la formation du doublet est indépendante de *PDS1* (cf figure n°3G) remet en cause l'hypothèse selon laquelle la présence du doublet serait à l'origine de la déphosphorylation plus rapide de Rad53 induite par le checkpoint du fuseau après une irradiation UV. La mutation des sites de Rad9 et Rad53 phosphorylés suite à l'activation du checkpoint du fuseau nous permettrait d'étudier de façon claire l'éventuelle influence de ces modifications sur la réponse aux dommages de l'ADN.

Le fait que l'état de phosphorylation de Rad53 ne soit pas identique après une irradiation UV en présence de nocodazole chez les mutants *pds1Δ* et *pds1Δ mad2Δ* est très surprenant (cf figure n°M11). Cependant, ce résultat est peut-être à rapprocher d'un résultat obtenu par l'équipe de M.Pia Longhese. Cette équipe a en effet étudié la cinétique de phosphorylation de Rad53 suite à une irradiation UV après une synchronisation préalable à l' $\alpha$ -facteur dans une souche portant une fusion SCC1-TEV et la construction *GAL-TEV* plaçant l'expression de la protéase TEV sous le contrôle du promoteur *GAL* (cf figure n°M14 et (Clerici et al., 2004)). Juste après l'irradiation, les cellules sont cultivées en présence de galactose, ce qui induit le clivage de la sous-unité Scc1 de la cohésine. Il est très probable que le checkpoint du fuseau soit activé dans ces conditions puisque nous avons vu qu'un mutant *scc1* montre un blocage à la transition métaphase/anaphase dépendant du checkpoint du fuseau, probablement parce qu'un défaut de tension est présent au niveau des kinétochores (Biggins and Murray, 2001). Dans cette expérience, comme dans notre expérience avec le mutant *pds1Δ*, le checkpoint du fuseau est activé et la cohésion des chromatides sœurs n'est pas maintenue. Or, l'étude de Clerici *et al.*, 2004 montre que Rad53 est déphosphorylée en télophase dans la souche sauvage. Au contraire, dans les cellules portant la fusion SCC1-TEV, la phosphorylation de Rad53 est maintenue alors que les cellules s'accumulent en télophase, probablement à cause de l'activation du checkpoint du fuseau (cf figure n°M14 et (Clerici et al., 2004)). Ainsi, mes données (cf figure n°M11) et celles de Clerici *et al.*, 2004 (cf figure n°M14) semblent indiquer que l'activation du checkpoint du fuseau couplée au passage de la transition métaphase/anaphase promeut le maintien de la phosphorylation de Rad53.



Figure n°M14



**Etude de la phosphorylation de Rad53 dans une souche portant la fusion SCC1-TEV après une irradiation UV. Extrait de (Clerici et al., 2004).**

Une souche sauvage (wt) et une souche portant la fusion SCC1-TEV (SCC1-TEV) dans lesquelles sont intégrées les constructions *tetR-GFP/tetO* et *GAL-TEV* sont synchronisées en G1 avec de l' $\alpha$ -facteur dans un milieu contenant du raffinose et relarguées à t=0 dans un milieu contenant du galactose pour induire la production de la protéase TEV. Elles sont irradiées aux UV (30J/m<sup>2</sup>) avant le relargage. Lorsque les cellules ont rebourgeonné, de l' $\alpha$ -facteur est ajouté à nouveau dans les cultures. Des aliquots sont prélevés aux temps indiqués après relargage et analysés par FACS (A) et par Western-Blot avec un anticorps dirigé contre la protéine Rad53 (B). La séparation des chromatides sœurs est déterminée par microscopie en utilisant le système *tetR-GFP/tetO* (C). La cinétique de division nucléaire est analysée à l'aide d'une coloration à l'iodure de propidium (D). exp, cellules en croissance exponentielle.

### 3.2. Les interrégulations entre checkpoint du fuseau et checkpoints de l'ADN

#### 3.2.1. Implication des checkpoints de l'ADN dans la réponse aux dommages du fuseau

Le fait que Rad9 et Rad53 soient phosphorylées en cas d'activation du checkpoint du fuseau constitue la seule donnée qui montrerait une éventuelle implication de protéines des checkpoints de l'ADN dans la réponse aux dommages du fuseau chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*. En effet, les autres données obtenues concernant ce sujet vont plutôt dans le sens d'une indépendance totale du checkpoint du fuseau vis-à-vis des protéines des checkpoints de l'ADN. Ainsi, la délétion de *RAD9* ou de *RAD53* n'aggravent pas la sensibilité d'une souche sauvage ou *mad2Δ* au bénomyle (cf figure n°M4). Elles n'aggravent pas non plus la sensibilité d'une souche sauvage à la surexpression de *MPS1* (données non montrées). Les mutants *rad9Δ* et

*rad53Δ* ne semblent pas être défectueux pour l'arrêt du cycle induit par un traitement au nocodazole (cf figure n°M6C). Rad53 n'est pas nécessaire à la phosphorylation de Mad1 induite par le nocodazole (cf figure n°M5). Nous n'avons observé aucune interaction génétique entre les gènes *RAD9* et *RAD53* et les gènes *GIM3*, *CBF1* et *KAR3* codant pour des protéines intervenant dans le fonctionnement du fuseau ou des kinétochores. Rad9 ne semble pas être requise pour l'arrêt du cycle induit par un défaut de tension au niveau du kinétochore (Hanna et al., 2001; Mayer et al., 2001). Enfin, la délétion de *RAD9* n'affecte pas le mutant du kinétochore *ctf13-30* (qui active à température restrictive le checkpoint du fuseau), ni le retard en G2/M induit par une mutation de l'ADN centromérique (Pangilinan and Spencer, 1996). Il est donc peu probable que Rad9 et Rad53 soient des effecteurs du checkpoint du fuseau chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*. Cependant, l'existence des phosphorylations de Rad9 et Rad53 induites par le nocodazole suggère que Rad53 et Rad9 pourraient tout de même être ciblées en cas d'activation du checkpoint du fuseau, peut-être pour qu'elles exercent une fonction spécifique, probablement mineure, au niveau du fuseau, des kinétochores ou des SPB. Cet éventuel rôle serait probablement indépendant de leurs rôles au sein des checkpoints de l'ADN. Il a été montré que Rad53 était capable de moduler directement la dynamique du fuseau en jouant sur des effecteurs de l'élongation du fuseau en présence comme en absence de stress répliatif (Krishnan et al., 2004). Il est donc possible que Rad53, voire Rad9, interviennent pour renforcer l'inhibition de l'élongation du fuseau en cas d'activation du checkpoint du fuseau.

Chez les eucaryotes supérieurs, des données pourraient confirmer l'hypothèse d'un éventuel rôle des protéines des checkpoints de l'ADN sur la régulation de la machinerie de ségrégation des chromosomes. Ainsi, Chk2 phosphorylée sur la thréonine 68 et Brca1 montrent une localisation au centrosome et 53BP1 est localisée au niveau des kinétochores chez les mammifères (cf figures n°M12A, M12B, M12D et (Hsu and White, 1998; Jullien et al., 2002; Tsvetkov et al., 2003)). Chez la drosophile, DmChk2 localise au niveau des centrosomes et des microtubules (Takada et al., 2003). Dans les cellules DT40, Chk1 est localisée au niveau des kinétochores (Zachos et al., 2007). Par ailleurs, ATM semble être impliquée dans un processus d'amplification des centrosomes lors d'un stress génotoxique chez les cellules DT40 (Dodson et al., 2004), alors que DmChk2 serait impliquée dans un processus d'inactivation des centrosomes et d'inhibition de la ségrégation des chromatides sœurs chez la drosophile (Takada et al., 2003).

Si les données obtenues chez *Saccharomyces cerevisiae* ne montrent pas une implication des protéines des checkpoints de l'ADN dans le checkpoint du fuseau, plusieurs études semblent indiquer que cela pourrait au contraire être le cas chez les eucaryotes supérieurs. Ainsi, il est surprenant de constater que la localisation de 53BP1 soit renforcée au niveau des kinétochores non attachés comme c'est le cas pour les protéines du checkpoint du fuseau chez les mammifères (cf figures n°M12B, M12D et (Jullien et al., 2002)). Le fait que cette protéine subisse une phosphorylation spécifique en présence de colcémide est également très intéressant et nous rappelle la phosphorylation de Rad9 induite par le nocodazole (cf figures n°1A, M12C et (Jullien et al., 2002)). La protéine Chk1 pourrait également s'associer spécifiquement aux kinétochores non attachés puisqu'elle est localisée au niveau des kinétochores en prométaphase mais pas en métaphase ou en anaphase dans les cellules DT40 en mitose (Zachos et al., 2007). Il est d'ailleurs intéressant de noter qu'elle colocalise alors avec BubR1 (Zachos et al., 2007). Par ailleurs, il a été montré que Brca1 était capable de réguler l'expression des gènes des protéines du checkpoint du fuseau chez les mammifères, et que le checkpoint du fuseau était défectueux dans les cellules déficientes en Brca1 (Wang et al., 2004). Enfin, Chk1 semble être nécessaire à la réponse

contrôlée par le checkpoint du fuseau, spécifiquement lors d'un défaut de tension dans les cellules DT40 (Zachos et al., 2007). Il serait intéressant de savoir si les implications de Brca1 et Chk1 dans le checkpoint du fuseau correspondent à des rôles nouveaux de ces protéines, indépendants de leur fonction au sein des checkpoints de l'ADN, ou si le checkpoint de l'ADN dans sa globalité participe à la réponse aux dommages du fuseau.

### 3.2.2. Implication du checkpoint du fuseau dans la réponse aux dommages de l'ADN

#### 3.2.2.1. Chez *Saccharomyces cerevisiae*

Au premier abord, les protéines du checkpoint du fuseau ne semblent pas être requises pour la réponse aux dommages de l'ADN. En effet, les mutants *bub* ne sont pas sensibles aux rayons  $\gamma$  (Hoyt et al., 1991). Les mutants *mad2 $\Delta$*  ne sont pas sensibles aux rayonnements UV, à la phléomycine, à la camptothécine, à l'hydroxyurée, au MMS ni au 4-NQO (cf figure n°G18A, (Garber and Rine, 2002; Krishnan et al., 2004) et données non montrées). Le blocage en G2/M à température restrictive et la viabilité après un passage temporaire à température restrictive sont identiques chez les mutants *cdc13-1*, *cdc13-1 mad1 $\Delta$* , *cdc13-1 mad2 $\Delta$*  et *cdc13-1 mad3 $\Delta$*  (Hardwick et al., 1999). La délétion de *MAD2* n'affecte pas la survie du mutant *cdc13-1* incubé de façon continue à température restrictive (Maringele and Lydall, 2002). Enfin, la mutation *mps1-1* ne supprime pas non plus l'accumulation des cellules en G2/M du mutant *cdc13-1* à température restrictive (Weiss and Winey, 1996).

Cependant, au cours de ma thèse, j'ai mis en évidence deux effets du checkpoint du fuseau ou de ses composants sur la réponse aux stress génotoxiques. D'une part, j'ai montré que la délétion de *MAD2* entraînait une accélération de la déphosphorylation de Rad53 et de la reprise du cycle après cassure HO chez des mutants d'adaptation (cf figure n°G16). D'autre part, j'ai montré que l'état actif du checkpoint du fuseau induisait une déphosphorylation plus rapide de Rad53 et augmentait l'abondance des formes phosphorylées de Rad9 après une irradiation UV (cf figures n°5A et 5B). D'autres données dans la littérature indiquent également que Mad2 pourrait intervenir dans la réponse aux dommages de l'ADN.

Tout d'abord, la délétion de *MAD2* restaure partiellement la viabilité du mutant thermosensible *yku70 $\Delta$*  à température restrictive (Maringele and Lydall, 2002). Nous rappelons que le complexe Yku70/Yku80 est impliqué dans le mécanisme de NHEJ et dans la régulation de la stabilité des télomères. À température restrictive, le mutant *yku70 $\Delta$*  accumule de l'ADN simple-brin dans les régions subtélomériques, mais de façon beaucoup moins abondante que le mutant *cdc13-1*. Il montre une accumulation en G2/M qui est conséquente seulement après plusieurs cycles à température restrictive, contrairement à ce que l'on observe chez le mutant *cdc13-1* (Maringele and Lydall, 2002). L'arrêt en G2/M de ce mutant est dépendant des gènes *CHK1*, *MEC1*, *RAD9*, *RAD17*, *RAD24* et *DUN1*, ce qui suggère fortement qu'il est dépendant des checkpoints de l'ADN. Toutefois, le checkpoint du fuseau pourrait également être en partie responsable de cet arrêt, puisque la délétion de *MAD2* atténue l'accumulation en G2/M du mutant *yku70 $\Delta$*  à température restrictive (Maringele and Lydall, 2002). Le fait que les délétions de *RAD24* et *CHK1* d'une part et la délétion de *MAD2* d'autre part montrent des effets cumulatifs sur la croissance et l'accumulation en G2/M des cellules *yku70 $\Delta$*  à température restrictive suggère que les deux checkpoints agissent de façon au moins partiellement additive. Il est intéressant de noter que la délétion concomitante de *MAD2* et *CHK1* supprime totalement le défaut de

croissance et d'accumulation en G2/M du mutant *yku70Δ* à température restrictive (Maringele and Lydall, 2002). Ces données sont en accord avec celles obtenues par P.Garber et J.Rine lors de l'étude du mutant *mcm2*, mutant qui possède un défaut de l'initiation de la réplication. Le mutant *mcm2* montre un arrêt en G2/M à 37°C. La délétion de *MAD2* réduit l'accumulation en G2/M à 37°C de ce mutant dans des cellules *rad24Δ* mais également chez la souche sauvage. L'étude d'une population synchronisée de cellules montre par ailleurs que seul le triple mutant *mcm2 rad24Δ mad2Δ* est capable de passer en télophase (Garber and Rine, 2002).

Des informations complémentaires mais également légèrement différentes sont apportées par l'étude de la réponse au MMS. Le traitement au MMS induit chez une souche sauvage une accumulation de cellules possédant un gros bourgeon et un noyau non divisé. Cette accumulation est réduite chez le double mutant *rad9Δ rad24Δ*. La délétion de *MAD2* ou de *MAD1* chez le mutant *rad9Δ rad24Δ* réduit encore cette accumulation. Par ailleurs, l'étude sur une population synchronisée de cellules montre que seul le triple mutant *rad9Δ rad24Δ mad2Δ* est capable de passer rapidement en télophase en cas de traitement au MMS (Garber and Rine, 2002). Toutefois, contrairement à ce qui a été obtenu pour les mutants *yku70Δ* et *mcm2*, la délétion de *MAD2* ou de *MAD1* n'a pas d'effet sur l'arrêt de la souche sauvage induit par un traitement au MMS (Garber and Rine, 2002). Ceci est toutefois en accord (i) avec le fait que le mutant *mad2Δ* ne montre pas d'hypersensibilité au MMS ni à d'autres stress génotoxiques (cf figure n°G18A et (Garber and Rine, 2002; Krishnan et al., 2004)) et (ii) de façon plus éloignée, avec le fait que la délétion de *MAD2* n'ait pas d'effet sur le blocage de la progression du cycle après une irradiation UV en phase G1 (Clerici et al., 2004). Il faut cependant noter que la délétion de *MAD2* n'affecte pas non plus la survie du mutant *rad9Δ rad24Δ* lors d'une exposition continue au MMS. Ceci montre que la corrélation entre le maintien de l'arrêt et la viabilité lors d'une exposition continue à un stress particulier n'est pas évidente. Nous avons d'ailleurs fait une remarque similaire après avoir constaté que la délétion de *CHK1* affaiblissait le maintien de l'arrêt induit par un traitement à la camptothécine chez le mutant *ptc2Δ* alors qu'elle n'avait pas d'influence sur la sensibilité du mutant *ptc2Δ* à ce stress (cf figure n°G12).

Ces données suggèrent que Mad2 serait nécessaire au blocage de la progression du cycle induit par un stress génotoxique, notamment en présence de checkpoints de l'ADN défectueux. Ceci est en accord avec le fait que la délétion de *MAD2* affaiblisse également l'arrêt induit par un traitement à l'hydroxyurée chez le mutant *mec1Δ* (Garber and Rine, 2002) et qu'elle supprime presque totalement l'arrêt en G2/M observé chez le mutant *mec1Δ* irradié aux UV en phase G1 (Clerici et al., 2004). Par ailleurs, le fait que le mutant *rad53Δ chk1Δ mad2Δ* entre en télophase de façon plus précoce que les mutants *rad53Δ chk1Δ* et *mec1Δ tel1Δ* après une irradiation aux UV en phase G1 (Clerici et al., 2004) semble confirmer que la contribution de Mad2 à l'arrêt induit par un stress génotoxique soit au moins en partie indépendante des checkpoints de l'ADN. Cette contribution pourrait s'expliquer par le fait que des centromères endommagés ou non complètement répliqués pourraient engendrer des défauts d'assemblage du kinétochore, ce qui empêcherait une interaction kinétochore/microtubule correcte et conduirait à l'activation du checkpoint du fuseau. Il a en effet été montré qu'une mutation de l'ADN centromérique entraînait un retard en G2/M de façon dépendante du checkpoint du fuseau (Pangilinan and Spencer, 1996). Toutefois, il n'a pas été montré clairement que le checkpoint du fuseau était activé dans les expériences décrites précédemment (Clerici et al., 2004; Garber and Rine, 2002; Maringele and Lydall, 2002). De plus, cette hypothèse permet difficilement d'expliquer les résultats obtenus pour le mutant *yku70Δ* (Maringele and Lydall, 2002), puisqu'il est peu probable que les centromères soient affectés dans ce cas.

Ces résultats sont certainement à rapprocher de ceux que nous avons obtenus avec la cassure HO. En effet, nous avons montré que la délétion de *MAD2* engendrait également un défaut de maintien de l'arrêt induit par une cassure double-brin chez le mutant *ptc2Δ*. Nous rappelons que l'effet n'était pas spécifique de ce mutant mais qu'il concernait plusieurs mutants d'adaptation (cf figures n°G15 et G16C). Il est intéressant de remarquer que l'effet de Mad2 est dans ce cas-là visible dans une souche qui possède non pas un checkpoint de l'ADN défectueux mais au contraire un checkpoint de l'ADN activé de façon anormalement longue. D'ailleurs, ceci empêche de tester si l'effet de Mad2 après cassure HO est indépendant des checkpoints de l'ADN, comme cela est suggéré par les études préalablement exposées (Garber and Rine, 2002; Maringele and Lydall, 2002). La seule délétion de *MAD2* ne montrait pas d'effet sur l'arrêt induit par la cassure HO, ce qui rappelle les données obtenues lors d'un traitement au MMS ou après une irradiation UV (Clerici et al., 2004; Garber and Rine, 2002).

De plus, nos données suggèrent que Mad2 n'interviendrait pas au niveau de l'activation du checkpoint de l'ADN, puisque les cinétiques d'accumulation en G2/M et de phosphorylation de Rad53 sont identiques en présence et en absence de *MAD2* au cours des premières heures après l'induction de la cassure HO (cf figure n°G16). Mad2 semblerait donc plutôt intervenir au niveau du maintien de l'arrêt induit par un stress génotoxique. Le fait que la délétion de *MAD2* montre également un effet sur la déphosphorylation de Rad53 (cf figures n°G16A et G16B) en plus de son effet sur la progression du cycle nous permet plus précisément de proposer que Mad2 soit requise pour le maintien global de l'activité du checkpoint.

Dans notre étude comme dans les études citées préalablement (Clerici et al., 2004; Garber and Rine, 2002; Maringele and Lydall, 2002), il est difficile de savoir si les effets que nous observons sont dus au checkpoint du fuseau ou à une fonction de Mad2 qui n'a pas encore été identifiée et qui est indépendante de son rôle au sein de ce checkpoint. Il est commun d'affirmer que l'effet est dû au checkpoint du fuseau s'il est également observé en cas de disruption du gène *MAD1*, ce qui est pour nous le cas (cf figures n°G15A, G15B, G16A et G16C). Cependant, Mad1 et Mad2 forment un complexe qui est impliqué dans la réponse aux dommages du fuseau, mais qui pourrait également avoir d'autres fonctions. En effet, Mad1 et Mad2 sont par exemple toutes les deux associées aux pores nucléaires. Il serait donc peut-être plus adéquat d'utiliser la délétion d'un autre gène du checkpoint du fuseau pour essayer de confirmer le fait que l'effet soit bien dû au checkpoint du fuseau dans sa globalité. En outre, nous avons montré que le traitement au nocodazole et la surexpression de *MPS1* n'influençaient pas la réponse d'une souche sauvage à la cassure HO (cf figure n° G17). Ceci pourrait suggérer que l'effet observé résulte d'une fonction de Mad2 indépendante de son rôle au sein du checkpoint du fuseau, ou que le checkpoint du fuseau est déjà activé dans notre expérience. Cette dernière hypothèse n'est probablement pas correcte car d'une part, la cassure double-brin a lieu loin du centromère du chromosome concerné et il est donc peu probable que le centromère soit affecté, et d'autre part, parce que Mad1 n'est pas phosphorylée suite à l'induction de la cassure HO (cf figure n°G17). Nous avons d'ailleurs fait remarquer que, dans les études citées précédemment (Clerici et al., 2004; Garber and Rine, 2002; Maringele and Lydall, 2002), il n'était pas montré formellement que le checkpoint du fuseau était activé et que l'hypothèse de l'activation du checkpoint du fuseau induite par des centromères endommagés ne permettait pas, comme dans notre cas, d'expliquer les résultats obtenus chez le mutant *yku70Δ* (Maringele and Lydall, 2002). L'hypothèse d'un nouveau rôle de Mad2 indépendant de sa fonction au sein du checkpoint du fuseau est donc loin d'être exclue.

J'ai également montré au cours de ma thèse que l'activité du checkpoint du fuseau induisait une déphosphorylation plus rapide de Rad53 après une irradiation UV (cf figures n°5A

et 5B). Cela semble a priori contradictoire avec le fait que la délétion de *MAD2* accélère l'inactivation des checkpoints de l'ADN. Cependant, comme nous l'avons vu précédemment, il est probable que les contextes ne soient pas les mêmes et qu'en particulier le checkpoint du fuseau soit activé dans un cas et pas dans l'autre. Les expériences que nous avons faites ne nous permettent pas d'analyser le blocage de la progression du cycle lorsque les deux checkpoints sont activés. Cependant, il est possible que la cellule ait sélectionné des mécanismes empêchant de cumuler les arrêts en G2/M induits par les deux checkpoints et qui seraient à l'origine du phénomène que nous observons. Il est enfin intéressant de noter que *Ptc2* et *Ptc3* ne sont pas impliquées dans ce phénomène (cf figure n°6A).

Ainsi, nos deux études permettent pour la première fois de mettre en évidence une influence du checkpoint du fuseau ou de ses composants sur l'état de phosphorylation de Rad53 après un stress génotoxique.

### 3.2.2.2. Chez *Schizosaccharomyces pombe*

Chez *S. pombe*, Rad3 (homologue d'ATR et de Mec1) et Cds1 (homologue de Rad53 et de hChk2) sont, comme chez *S. cerevisiae*, importantes pour le checkpoint de la réplication. L'analyse de l'entrée en mitose suite à un stress répliatif montre que les cellules *rad3* entrent sans retard en mitose, alors que les cellules *cds1* s'arrêtent de façon transitoire avant l'entrée en mitose et que cet arrêt transitoire est supprimé par la mutation *chk1*. Chez *S. pombe*, le blocage de la progression du cycle entraîne une élévation des cellules. Il a été montré que la délétion de *mad2+* réduisait la taille des cellules et la viabilité du mutant *cds1* en cas de traitement à l'hydroxyurée ou au MMS (Sugimoto et al., 2004). Ceci suggère que Mad2 pourrait également être impliquée dans l'inhibition de la progression du cycle en cas de stress génotoxique chez cette levure. Par ailleurs, la délétion de *mad2+* n'influence pas la réponse de la souche sauvage à ces stress, ce qui rappelle les données obtenues chez *Saccharomyces cerevisiae* (Garber and Rine, 2002; Sugimoto et al., 2004). La délétion des gènes *bub1+*, *mad1+* ou *mad3+* ne montre pas les mêmes effets que la délétion de *mad2+* (Sugimoto et al., 2004), ce qui indique à nouveau que Mad2 pourrait avoir un rôle dans la réponse aux stress génotoxiques indépendant de son rôle au sein du checkpoint du fuseau.

Suite à un traitement à la camptothécine, Chk1 est phosphorylée par Rad3 sur la sérine 345. La protéine Crb2 (homologue de Rad9) est nécessaire à cette phosphorylation. L'étude du mutant *crb2PH* partiellement déficient pour la réponse à la camptothécine pourrait apporter quelques éléments d'information concernant un nouveau rôle potentiel de Mad2 (Collura et al., 2005). Ce mutant est sensible à la camptothécine et montre un défaut de phosphorylation de Chk1. Cependant, le mutant *crb2PH* est moins sensible que le mutant *crb2Δ* et ne supprime que partiellement le blocage de la progression du cycle induit par cette drogue, contrairement au mutant *crb2Δ*. Ceci semble indiquer que le mutant *crb2PH* conserve une fonction nécessaire à la réponse à la camptothécine qui est indépendante de son rôle dans la phosphorylation de Chk1 sur S345 (Collura et al., 2005). De même, Chk1 semble posséder un rôle dans la réponse à cette drogue indépendante de sa phosphorylation par Rad3. Des tests de survie après une exposition temporaire au stress et le suivi de la progression dans le cycle indiquent que la fonction retenue par le mutant *crb2PH* nécessite *mad2+*, mais aussi *chk1+*. Par contre, la phosphorylation de Chk1 sur S345 n'est pas requise pour le maintien de cette fonction (Collura et al., 2005). Par ailleurs, la fonction de Chk1 indépendante de sa phosphorylation nécessite *mad2+*. En outre, il a été montré que le mutant *crb2PH* s'arrêtait à la transition métaphase/anaphase lors d'un

traitement à la camptothécine et qu'un rôle de Mad2 dans la réponse à la camptothécine n'était pas visible chez les mutants *crb2Δ* et *chk1Δ* (Collura et al., 2005). L'ensemble de ces données suggèrent que l'absence de phosphorylation de Chk1 sur S345 dans les cellules *crb2PH* supprime l'arrêt en G2 dépendant des checkpoints de l'ADN et permet à ces cellules de progresser dans le cycle. Elles sont toutefois arrêtées par la suite à la transition métaphase/anaphase de façon dépendante de Mad2, Chk1 et Crb2 (Collura et al., 2005). Ainsi, Mad2 est impliquée dans la réponse à la camptothécine et cette fonction semble résulter au moins en partie de l'implication de Mad2 dans une voie des checkpoints de l'ADN qui bloque les cellules en mitose si elles n'ont pas été arrêtées avant. Cette voie des checkpoints de l'ADN impliquerait également Chk1 et Crb2 et mettrait en jeu des rôles différents de ces protéines de ceux actuellement connus. Le fait que la délétion de *mad2+* n'aggrave pas le phénotype des mutants *rad3* lors d'un traitement à l'hydroxyurée (Sugimoto et al., 2004) pourrait suggérer que cette voie des checkpoints implique également Rad3.

Nos résultats montrent que la délétion de *MAD2* entraîne des effets similaires à ceux induits par le délétion de *CHK1* en cas de cassure HO ou de traitement à la camptothécine. Ceci pourrait indiquer qu'une voie commune, comprenant Mad2 et Chk1, et capable de bloquer les cellules ayant un ADN endommagé en mitose existe également chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*. Il est d'ailleurs possible que seul le rôle de Chk1 indépendant de sa phosphorylation soit conservé chez *S. cerevisiae*, puisque l'arrêt en G2 n'existe pas chez cet organisme. Au cours de l'arrêt à la transition métaphase/anaphase induit par un stress génotoxique, Chk1 phosphoryle Pds1 et inhibe ainsi sa dégradation. On peut imaginer que Mad2 renforce cet arrêt en liant Cdc20.

Cependant, la délétion de *MAD2* permet aux cellules *mec1Δ* ayant subi une irradiation UV de sortir de mitose, contrairement à la délétion de *CHK1* (Clerici et al., 2004). De plus, la délétion de *MAD2* accélère le passage en télophase des cellules *rad53Δ chk1Δ* irradiées aux UV (Clerici et al., 2004). Enfin, les délétions de *MAD2* et *CHK1* montrent des effets cumulatifs sur la croissance et l'accumulation en G2/M des cellules *yku70Δ* à température restrictive (Maringele and Lydall, 2002). Ces données suggèrent que Mad2 et Chk1 ont également d'autres rôles en plus d'une éventuelle implication dans une voie commune.

### 3.2.2.3. Chez les eucaryotes supérieurs

Le fait que le checkpoint du fuseau ne soit probablement pas activé avant la prophase alors qu'un stress génotoxique inhibe l'entrée en mitose chez les eucaryotes supérieurs et chez *S. pombe*, suggère qu'il est peu probable que le checkpoint du fuseau intervienne dans la réponse aux dommages de l'ADN chez ces organismes. Cependant, nous avons vu que les cellules arrivent parfois à échapper à l'arrêt en G2 après avoir subi un stress génotoxique ou un stress réplicatif, alors qu'il est probable que l'ADN soit toujours endommagé. Chez *Schizosaccharomyces pombe*, il a été montré dans le cas d'un traitement à la camptothécine que les cellules s'arrêtaient alors à la transition métaphase/anaphase de façon dépendante de Mad2 et Chk1 (Collura et al., 2005). Un arrêt en mitose a également été observé chez les eucaryotes supérieurs. En effet, il a déjà été constaté qu'un stress génotoxique pouvait induire un ralentissement du cycle en prométaphase chez la drosophile et dans les cellules DT40 (Dodson et al., 2004; Takada et al., 2003). Des données semblent montrer que ce ralentissement serait induit par un checkpoint de l'ADN intra-mitose comme cela a été suggéré chez *S. pombe* (Collura et al., 2005). Cependant, d'autres données semblent plutôt indiquer que ce ralentissement serait en fait

dû uniquement à l'activation du checkpoint du fuseau. L'existence de ce checkpoint de l'ADN intra-mitose est ainsi controversée et le fait que le checkpoint du fuseau réponde ou non à la présence de dommages de l'ADN n'est pas claire. Nous détaillons ci-dessous les différentes études concernant ce sujet.

Chez la drosophile, le mutant *dup<sup>a3</sup>* est défectueux pour la réplication et ne subit probablement qu'une réplication partielle. Ce mutant montre un retard en G2 dépendant de Mei-41 (homologue d'ATR), mais il finit par progresser dans le cycle avant de subir un nouvel arrêt en mitose. Cet arrêt en mitose est caractérisé par un fort taux de cycline A et de cycline B et par la présence de Bub1 au niveau des kinétochores, ce qui indique que cet arrêt a probablement lieu avant la transition métaphase/anaphase (Garner et al., 2001). L'inactivation de Bub1 entraîne une réduction de la proportion de cellules *dup<sup>a3</sup>* arrêtées en mitose et leur permet de progresser en télophase (Garner et al., 2001). Ces données suggèrent que le checkpoint du fuseau est au moins en partie responsable de l'arrêt en mitose des mutants *dup<sup>a3</sup>*. Cependant, le fait que le taux de cycline A soit élevé lors de ce blocage alors que cette protéine est normalement dégradée en métaphase a conduit les auteurs à supposer que des contrôles additionnels étaient, dans une moindre mesure, également nécessaires à l'établissement de cet arrêt (Garner et al., 2001).

Une étude menée sur plusieurs lignées de cellules de mammifères semble confirmer le fait que le checkpoint du fuseau soit impliqué dans la réponse aux dommages de l'ADN (Mikhailov et al., 2002). Le traitement de ces cellules avec de l'adriamycine ou du ICRF-193<sup>1</sup> entraîne un blocage en métaphase. L'ajout de caféine ne supprime pas cet arrêt. Par contre, l'anaphase est initiée dans les cellules bloquées juste après la micro-injection d'un mutant dominant négatif de Mad2, le mutant Mad2ΔC (Mikhailov et al., 2002). Par ailleurs, on voit par immunofluorescence que Mad2 est présent sur au moins un des kinétochores dans ces cellules bloquées en métaphase. De plus, ces cellules ne montrent pas un fort taux de cycline A contrairement à ce qui a été observé chez la drosophile (Garner et al., 2001). Ces données permettent aux auteurs de conclure que le blocage de la progression de la mitose induit par la présence de dommages de l'ADN est entièrement dû au checkpoint du fuseau (Mikhailov et al., 2002). Le checkpoint du fuseau pourrait dans ce cas-là être activé par un défaut d'assemblage des kinétochores résultant de l'endommagement des centromères. En effet, seule la présence d'une quantité importante de dommages de l'ADN entraîne un retard à la transition métaphase/anaphase, peut-être parce que statistiquement les kinétochores sont plus à même d'être affectés et d'entraîner l'activation du checkpoint du fuseau (Mikhailov et al., 2002). Ainsi, aucun ralentissement de la progression de la mitose n'est observé si l'on utilise de faibles doses d'adriamycine ou d'ICRF-193. De même, l'induction ciblée de cassures double-brin dans le noyau des cellules en prophase à l'aide d'un laser ne semble pas affecter la progression de la mitose alors que des foci de la protéine H2AX phosphorylée sont présents (Mikhailov et al., 2002). L'endommagement des centromères pourrait également expliquer les résultats obtenus chez la drosophile par M. Garner et ses collaborateurs : l'absence partielle ou totale de chromatides sœurs pourrait conduire à une absence partielle ou totale de cohésion et à des défauts de formation des kinétochores qui expliqueraient l'implication du checkpoint du fuseau dans l'arrêt induit par la mutation *dup<sup>a3</sup>* en mitose chez la drosophile (Garner et al., 2001).

Ce modèle est confirmé par une troisième étude portant sur des cellules déficientes pour p53 (Nitta et al., 2004). Ces cellules ne sont pas capables de maintenir l'arrêt en G2 induit par un

---

<sup>1</sup> L'adriamycine et l'ICRF-193 sont des inhibiteurs de la topoisomérase II qui induisent la formation de cassures double-brin de l'ADN, via la stabilisation de complexe covalent entre ADN et topoisomérase II.



long traitement à l'aphidicoline ou une irradiation en G2. Elles entrent donc en mitose puis s'arrêtent à la transition métaphase/anaphase. Lors de ce blocage, les cellules montrent un fort taux de sécurine, de cycline B et un faible taux de cycline A. La déplétion en Mad2 ou BubR1 à l'aide de « siRNA » supprime cet arrêt et conduit à une division nucléaire aberrante, ce qui suggère encore une fois que le checkpoint du fuseau est responsable de l'arrêt en mitose des cellules possédant un ADN endommagé. L'endommagement des centromères peut également expliquer l'activation du checkpoint du fuseau dans ce cas-là (Nitta et al., 2004). Toutefois, dans cette étude, la déficience en p53 pourrait supprimer la réponse par un éventuel checkpoint de l'ADN intra-mitose.

Pour voir si l'implication du checkpoint du fuseau dans la réponse aux dommages de l'ADN en mitose résulte bien d'une activation indirecte causée par la présence de centromères endommagés, A.Royou et ses collaborateurs ont utilisé un autre type de dommages, à savoir la création de cassures double-brin à l'aide de l'endonucléase I-CreI chez la drosophile. Le site de restriction de cette enzyme se situe dans l'ADN ribosomique 18S, ce qui permet de penser que les dommages créés par cette endonucléase n'affectent pas les centromères. L'induction de I-CreI fait baisser la proportion des cellules mitotiques qui ont séparé leurs chromatides sœurs, ce qui suggère qu'elle induit un retard avant la transition métaphase/anaphase. De façon intéressante, le mutant *bubR1* se comporte comme les cellules sauvages alors que ce retard est supprimé chez le mutant *grp* (Grp est l'homologue de Chk1 et est nécessaire à l'arrêt en G2 en cas de lésions de l'ADN chez la drosophile) (Royou et al., 2005). Par contre, une irradiation (stress qui peut affecter les centromères) semble également engendrer dans les cellules sauvages un retard à la transition métaphase/anaphase, retard qui n'est complètement supprimé que chez le double mutant *grp bubR1* et pas chez les simples mutants correspondants (Royou et al., 2005). L'arrêt induit par une dose plus faible d'irradiation (la probabilité d'endommager les centromères est dans ces conditions affaiblie) semble ne nécessiter que la présence de Grp (Royou et al., 2005). Les auteurs en concluent que des dommages qui n'affectent pas le fonctionnement du kinétochore engendrent un arrêt à la transition métaphase/anaphase par un checkpoint indépendant de BubR1 mais dépendant de Grp (Royou et al., 2005). Ce modèle est en contradiction avec les résultats cités précédemment et plus particulièrement avec l'étude de A.Mikhailov et ses collaborateurs qui montrait qu'une faible quantité de dommages n'induisait pas d'arrêt en mitose et surtout que l'ajout de caféine ne supprimait pas l'arrêt, contrairement à l'inactivation de Mad2 (Mikhailov et al., 2002). Il est possible que la quantité de dommages considérée comme faible dans l'étude de Mikhailov *et al.*, 2002 soit trop petite pour mettre en évidence un arrêt éventuellement contrôlé par un checkpoint de l'ADN intra-mitose. Par ailleurs, il est possible que l'importance relative des deux checkpoints dans la réponse aux dommages de l'ADN dépende du type de stress et du type de cellules. Enfin, A.Royou et ses collaborateurs suivent l'arrêt induit à la transition métaphase/anaphase seulement en se basant sur la proportion de cellules qui, parmi les cellules mitotiques, ont déjà initié l'anaphase, ce qui est à mon avis sujet à de nombreux biais.

D'autres données dans la littérature montrent que ce problème pourrait être plus complexe encore. Par exemple, les cellules MEFs *BubR1*<sup>+/-</sup> qui montrent un défaut de l'arrêt en mitose induit par des dommages de l'ADN, montrent également une forte réduction de l'augmentation du taux d'histone H2AX phosphorylée observée en cas de traitement à l'adriamycine (Fang et al., 2006). Par ailleurs, le traitement à l'adriamycine ou une irradiation UV engendrent une réduction du taux de BubR1. Or une réduction du taux de BubR1 semble être corrélée à une réduction du taux de p53 en présence comme en absence de dommages de l'ADN (Fang et al., 2006). Une

autre étude semble indiquer que l'induction de dommages de l'ADN dans des cellules humaines maintenues bloquées en mitose à l'aide d'un traitement au nocodazole, engendre une phosphorylation de Cdc2 sur la tyrosine 15 (Chow et al., 2003). Cette phosphorylation est normalement observée lors de l'activation du checkpoint de l'ADN en G2 et inhibe l'activation des complexes Cdk/cycline nécessaire à l'entrée en mitose. Or, comme nous l'avons vu, l'activation du checkpoint du fuseau semble quant à elle plutôt concourir au maintien de l'activation de ces complexes pour empêcher la sortie de mitose.

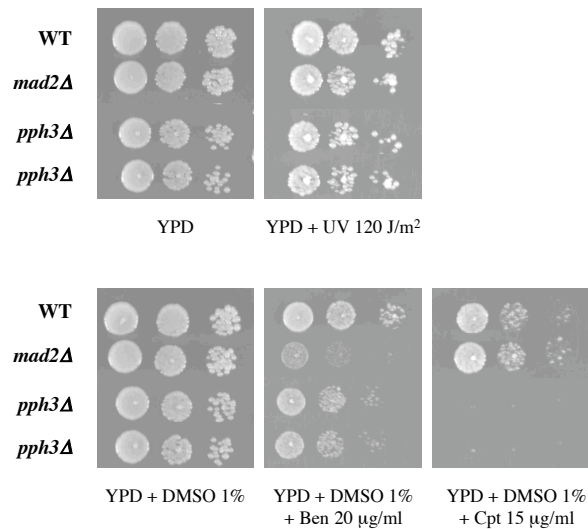
Des études complémentaires sont sans aucun doute nécessaires pour confirmer ces données et essayer de mieux appréhender les apparentes contradictions qu'elles suscitent, mais également pour mieux comprendre la réponse aux dommages de l'ADN qui a lieu en mitose.

### 3.3. *Pph3 et les réponses aux dommages du fuseau et aux dommages de l'ADN*

Pph3 est classée dans les protéines phosphatases proches des sérine/thréonine phosphatases de type 2A, comme Ppg1 et Sit4 (Arino, 2002). Nous avons vu que les PP2A sont des holoenzymes trimériques qui comportent une sous-unité catalytique, codée par les gènes *PPH21* et *PPH22* chez *S. cerevisiae*, une sous-unité régulatrice A, codée par *TPD3* et une sous-unité régulatrice B. Il existe trois familles de sous-unités B : les familles B, B' et B''. Chez *Saccharomyces cerevisiae*, *CDC55* est le seul membre de la famille B, alors que *RTS1* est le seul membre de la famille B' et qu'aucune séquence correspondant à une éventuelle sous-unité B'' n'a été trouvée dans le génome de cette levure. Le gène *PPH3* montre 51% et 52% d'identité avec les gènes *PPH21* et *PPH22* respectivement, alors que l'identité de séquence est de 89% entre *PPH21* et *PPH22*. De plus, il a été montré que, si Pph3 possédait certaines propriétés biochimiques caractéristiques des PP2A, d'autres la distinguaient de cette classe de phosphatase (Stark, 1996). Le fait que le double mutant *pph21Δ pph22Δ* montre un fort défaut de croissance alors que le triple mutant *pph21Δ pph22Δ pph3Δ* n'est pas viable, suggère que Pph3 pourrait avoir des fonctions redondantes avec Pph21 et Pph22 *in vivo* (Stark, 1996). Cependant, Pph3 semble également posséder des fonctions spécifiques (Arino, 2002). Aucun défaut dans la progression du cycle n'a été remarqué chez le mutant *pph3Δ* (Evans and Stark, 1997).

Il a été montré que Pph3 faisait partie d'un complexe qui comprend également les protéines Psy2 et Psy4 (Gingras et al., 2005; Hastie et al., 2006; Keogh et al., 2006). Ce complexe est nécessaire à la résistance au cisplatine, agent génotoxique utilisé dans le traitement de plusieurs cancers. Le cisplatine entraîne, chez la levure, l'activation du checkpoint de l'ADN en G2/M. Les cellules délétées pour certains gènes des voies de réparation et certains gènes des checkpoints de l'ADN y sont hypersensibles (Grossmann et al., 1999; Wu et al., 2004). Les souches *pph3Δ*, *psy2Δ* et *psy4Δ* montrent également une hypersensibilité au cisplatine (Gingras et al., 2005; Hastie et al., 2006), ce qui n'est pas le cas pour les souches délétées pour *PPH21* et *PPH22* (Hastie et al., 2006). Chez les mammifères, les homologues putatifs de Pph3, Psy4 et Psy2 forment également un complexe : le complexe Ppp4c/R2/R3, où les sous-unités R2 et R3 sont des sous-unités spécifiques de Ppp4c puisqu'elles ne semblent pas être capables d'interagir avec les PP2A (Gingras et al., 2005; Hastie et al., 2006). Ce complexe est également nécessaire à la résistance au cisplatine (Gingras et al., 2005).

Figure n°M15



**Le mutant *pph3Δ* est sensible au bénomyle et à la camptothécine.**

La sensibilité des souches L64 (YPH499) et L48 (YPH499 *mad2Δ*) portant un plasmide vide (par souci d'homogénéité des marqueurs d'auxotrophie) et des souches L288 (YPH499 *pph3Δ*) et L289 (YPH499 *pph3Δ*) est testée sur bénomyle (20 µg/ml), sur camptothécine (15 µg/ml) et après une irradiation UV (120J/m²) à 30°C. Des dilutions sérielles au 1/10 de cultures en phase exponentielle sont «spottées» sur les milieux indiqués puis examinées 2 à 3 jours plus tard.

L'implication du complexe Pph3/Psy2/Psy4 dans la réponse aux dommages de l'ADN n'est toutefois pas immédiate. En effet, les mutants *pph3Δ* et *psy2Δ* ne semblent pas être sensibles à la bléomycine<sup>1</sup>, à l'hydroxyurée, et aux UV (cf figure n°M15 et (Keogh et al., 2006)). La sensibilité au MMS n'est pas claire, puisque des données contradictoires sont trouvées dans la littérature (Hanway et al., 2002; Keogh et al., 2006). De même, le mutant *pph3Δ* semble sensible à la camptothécine (cf figure n°M15), contrairement à ce qui a été publié (Keogh et al., 2006). Il a été montré que Psy2 et Rad53 interagissaient en double-hybride, mais *PSY2* et *PSY4* ne sont pas nécessaires à la phosphorylation de Rad53 après un traitement au MMS (Gingras et al., 2005; Hastie et al., 2006). Toutefois, le complexe Pph3/Psy2/Psy4 pourrait intervenir dans la désactivation du checkpoint de l'ADN via son implication dans la déphosphorylation de l'histone H2AX (Keogh et al., 2006). Chez les eucaryotes, ce variant d'histone subit une phosphorylation à proximité des cassures double-brin. Cette modification est importante pour le recrutement de nombreux facteurs sur le site des cassures et est dépendante des kinases ATM/ATR. Chez *S. cerevisiae*, le taux de phosphorylation de H2AX augmente après un traitement au MMS ou une irradiation  $\gamma$ . Ce taux est plus fort chez les mutants *pph3Δ*, *psy2Δ* et *psy4Δ* que dans la souche sauvage en absence de dommages exogènes comme en présence de MMS (Keogh et al., 2006). Après un traitement aux rayons  $\gamma$ , le taux de phosphorylation de H2AX augmente puis diminue dans la souche sauvage alors qu'il reste constant et élevé chez le mutant *pph3Δ* (Keogh et al., 2006). Par ailleurs, Pph3 déphosphoryle H2AX *in vitro* (Keogh et al., 2006). L'ensemble de ces

<sup>1</sup> La bléomycine est un agent génotoxique induisant des cassures double-brin de l'ADN.

données suggèrent que Pph3 déphosphoryle H2AX *in vivo*. Cette déphosphorylation pourrait avoir lieu après que les histones H2AX aient été retirées de la chromatine, puisque Pph3 ne semble pas être requise pour le désassemblage des foci H2AX après une irradiation  $\gamma$  et pour la réparation des cassures double-brin (Keogh et al., 2006). Cette déphosphorylation serait toutefois nécessaire à un rétablissement efficace après la réparation des cassures double-brin. L'activation de Rad9 et Rad53 induite par une cassure double-brin réparable sont similaires chez le mutant *pph3 $\Delta$*  et chez la souche sauvage, ce qui suggère que Pph3 n'est pas requise pour l'activation du checkpoint. Par contre, au moment du rétablissement, ces protéines restent phosphorylées plus longtemps chez le mutant *pph3 $\Delta$*  que chez la souche sauvage. Le fait que les cellules du mutant *pph3 $\Delta$*  restent bloquées en G2/M alors qu'une reprise du cycle est observée dans la souche sauvage suite à ce dommage conforte l'idée que *pph3 $\Delta$*  soit un mutant de rétablissement (Keogh et al., 2006). La mutation de la sérine 129 de H2AX (site de phosphorylation de l'histone) en alanine supprime ce défaut, ce qui suggère que c'est bien le défaut de déphosphorylation de l'histone qui est à l'origine du défaut de rétablissement du mutant *pph3 $\Delta$*  (Keogh et al., 2006). La phosphatase Pph3 influencerait donc la désactivation de Rad53 de façon indirecte, via son effet sur l'histone H2AX.

Nous avons également observé un effet de la délétion de *PPH3* sur la phosphorylation de Rad53 après un stress génotoxique. En effet, la déphosphorylation de Rad53 dans le cas de lésions UV est retardée chez le mutant *pph3 $\Delta$*  (cf figure n°6E). Il a été montré chez les mammifères que H2AX était phosphorylée suite à une irradiation UV (Halicka et al., 2005; Limoli et al., 2002). Il est donc possible que l'effet que nous observons soit une conséquence indirecte d'un défaut de déphosphorylation de H2AX. Pour confirmer cela, il faudrait vérifier que la mutation de la sérine 129 de H2AX en alanine supprime le phénotype des mutants *pph3 $\Delta$* . Nous avons par ailleurs montré que la délétion de *PPH3* supprimait la « désactivation » plus rapide de Rad53 induite par le nocodazole après une irradiation UV (cf figure n°6C). Il serait également intéressant de tester si la mutation de la sérine 129 de H2AX supprime ce phénotype.

La délétion de *PPH3* montre également une influence sur la phosphorylation de Rad53 induite par le nocodazole. En effet, la disparition du doublet suite au relargage d'un blocage au nocodazole est retardée chez le mutant *pph3 $\Delta$*  (cf figure n°4A). Or, le nocodazole n'induit pas, à ma connaissance, une phosphorylation de la sérine 129 de H2AX. Ces données et le fait que Rad53 interagisse avec Psy2 en double-hybride (Gingras et al., 2005) suggèrent que Rad53 pourrait être une cible directe de Pph3 au cours de la réponse aux dommages du fuseau. Cependant, j'ai observé que le mutant *pph3 $\Delta$*  était légèrement sensible au bénomyle (cf figure n°M15). Et il a été montré chez la drosophile et chez *C. elegans* que Ppp4c était nécessaire à la maturation du centrosome et à la formation du fuseau mitotique. Il est donc possible que le mutant *pph3 $\Delta$*  possède certains défauts qui soient exacerbés par le traitement au nocodazole et au bénomyle et que le checkpoint du fuseau soit activé plus longuement dans cette souche, ce qui expliquerait le fait que le doublet soit maintenu plus longtemps après le relargage du blocage au nocodazole (cf figure n°4C). Ces défauts pourraient résulter d'une fonction de Pph3 indépendante du complexe Pph3/Psy4/Psy2, puisque la délétion de *PSY4* n'engendre pas d'hypersensibilité au bénomyle (Hastie et al., 2006).



# BIBLIOGRAPHIE

- Aboussekhra, A., Vialard, J.E., Morrison, D.E., de la Torre-Ruiz, M.A., Cernakova, L., Fabre, F. and Lowndes, N.F. (1996) A novel role for the budding yeast RAD9 checkpoint gene in DNA damage-dependent transcription. *Embo J*, **15**, 3912-3922.
- Agarwal, R. and Cohen-Fix, O. (2002) Phosphorylation of the mitotic regulator Pds1/securin by Cdc28 is required for efficient nuclear localization of Esp1/separase. *Genes Dev*, **16**, 1371-1382.
- Agarwal, R., Tang, Z., Yu, H. and Cohen-Fix, O. (2003) Two distinct pathways for inhibiting pds1 ubiquitination in response to DNA damage. *J Biol Chem*, **278**, 45027-45033.
- Aggen, J.B., Nairn, A.C. and Chamberlin, R. (2000) Regulation of protein phosphatase-1. *Chem Biol*, **7**, R13-23.
- Ahn, J., Urist, M. and Prives, C. (2004) The Chk2 protein kinase. *DNA Repair (Amst)*, **3**, 1039-1047.
- 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**, 958-965.
- Alexandru, G., Uhlmann, F., Mechtler, K., Poupard, M.A. and Nasmyth, K. (2001) Phosphorylation of the cohesin subunit Scc1 by Polo/Cdc5 kinase regulates sister chromatid separation in yeast. *Cell*, **105**, 459-472.
- Alexandru, G., Zachariae, W., Schleiffer, A. and Nasmyth, K. (1999) Sister chromatid separation and chromosome re-duplication are regulated by different mechanisms in response to spindle damage. *Embo J*, **18**, 2707-2721.
- Allen, J.B., Zhou, Z., Siede, W., Friedberg, E.C. and Elledge, S.J. (1994) The SAD1/RAD53 protein kinase controls multiple checkpoints and DNA damage-induced transcription in yeast. *Genes Dev*, **8**, 2401-2415.
- Amon, A. (1997) Regulation of B-type cyclin proteolysis by Cdc28-associated kinases in budding yeast. *Embo J*, **16**, 2693-2702.
- Andreassen, P.R., Lacroix, F.B., Villa-Moruzzi, E. and Margolis, R.L. (1998) Differential subcellular localization of protein phosphatase-1 alpha, gamma1, and delta isoforms during both interphase and mitosis in mammalian cells. *J Cell Biol*, **141**, 1207-1215.
- Andrews, P.D. and Stark, M.J. (2000) Type 1 protein phosphatase is required for maintenance of cell wall integrity, morphogenesis and cell cycle progression in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Sci*, **113 (Pt 3)**, 507-520.
- Arino, J. (2002) Novel protein phosphatases in yeast. *Eur J Biochem*, **269**, 1072-1077.
- Bailis, J.M. and Roeder, G.S. (2000) Pachytene exit controlled by reversal of Mek1-dependent phosphorylation. *Cell*, **101**, 211-221.
- Baker, S.H., Frederick, D.L., Bloecher, A. and Tatchell, K. (1997) Alanine-scanning mutagenesis of protein phosphatase type 1 in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, **145**, 615-626.
- Bashkirov, V.I., King, J.S., Bashkirova, E.V., Schmuckli-Maurer, J. and Heyer, W.D. (2000) DNA repair protein Rad55 is a terminal substrate of the DNA damage checkpoints. *Mol Cell Biol*, **20**, 4393-4404.
- Biggins, S. and Murray, A.W. (2001) The budding yeast protein kinase Ipl1/Aurora allows the absence of tension to activate the spindle checkpoint. *Genes Dev*, **15**, 3118-3129.
- Biggins, S., Severin, F.F., Bhalla, N., Sassoon, I., Hyman, A.A. and Murray, A.W. (1999) The conserved protein kinase Ipl1 regulates microtubule binding to kinetochores in budding yeast. *Genes Dev*, **13**, 532-544.
- Birrell, G.W., Brown, J.A., Wu, H.I., Giaever, G., Chu, A.M., Davis, R.W. and Brown, J.M. (2002) Transcriptional response of *Saccharomyces cerevisiae* to DNA-damaging agents does not identify the genes that protect against these agents. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 8778-8783.
- Bishop, A.C., Ubersax, J.A., Petsch, D.T., Matheos, D.P., Gray, N.S., Blethrow, J., Shimizu, E., Tsien, J.Z., Schultz, P.G., Rose, M.D., Wood, J.L., Morgan, D.O. and Shokat, K.M. (2000) A chemical switch for inhibitor-sensitive alleles of any protein kinase. *Nature*, **407**, 395-401.
- Black, S., Andrews, P.D., Sneddon, A.A. and Stark, M.J. (1995) A regulated MET3-GLC7 gene fusion provides evidence of a mitotic role for *Saccharomyces cerevisiae* protein phosphatase 1. *Yeast*, **11**, 747-759.
- Bloecher, A. and Tatchell, K. (1999) Defects in *Saccharomyces cerevisiae* protein phosphatase type I activate the spindle/kinetochore checkpoint. *Genes Dev*, **13**, 517-522.
- Bloecher, A. and Tatchell, K. (2000) Dynamic localization of protein phosphatase type 1 in the mitotic cell cycle of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol*, **149**, 125-140.
- Brady, D.M. and Hardwick, K.G. (2000) Complex formation between Mad1p, Bub1p and Bub3p is crucial for spindle checkpoint function. *Curr Biol*, **10**, 675-678.
- Branzei, D. and Foiani, M. (2005) The DNA damage response during DNA replication. *Curr Opin Cell Biol*, **17**, 568-575.
- Branzei, D. and Foiani, M. (2006) The Rad53 signal transduction pathway: Replication fork stabilization, DNA repair, and adaptation. *Exp Cell Res*, **312**, 2654-2659.
- 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**, 15075-15080.

- Cannon, J.F., Pringle, J.R., Fiechter, A. and Khalil, M. (1994) Characterization of glycogen-deficient glc mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, **136**, 485-503.
- Caspari, T., Murray, J.M. and Carr, A.M. (2002) Cdc2-cyclin B kinase activity links Crb2 and Rqh1-topoisomerase III. *Genes Dev*, **16**, 1195-1208.
- Ceulemans, H. and Bollen, M. (2004) Functional diversity of protein phosphatase-1, a cellular economizer and reset button. *Physiol Rev*, **84**, 1-39.
- Ceulemans, H., Stalmans, W. and Bollen, M. (2002) Regulator-driven functional diversification of protein phosphatase-1 in eukaryotic evolution. *Bioessays*, **24**, 371-381.
- Chan, C.S. and Botstein, D. (1993) Isolation and characterization of chromosome-gain and increase-in-ploidy mutants in yeast. *Genetics*, **135**, 677-691.
- 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**, 16934-16939.
- Cheeseman, I.M., Anderson, S., Jwa, M., Green, E.M., Kang, J., Yates, J.R., 3rd, Chan, C.S., Drubin, D.G. and Barnes, G. (2002) Phospho-regulation of kinetochore-microtubule attachments by the Aurora kinase Ipl1p. *Cell*, **111**, 163-172.
- Chen, R.H. (2002) BubR1 is essential for kinetochore localization of other spindle checkpoint proteins and its phosphorylation requires Mad1. *J Cell Biol*, **158**, 487-496.
- Chen, R.H., Brady, D.M., Smith, D., Murray, A.W. and Hardwick, K.G. (1999) The spindle checkpoint of budding yeast depends on a tight complex between the Mad1 and Mad2 proteins. *Mol Biol Cell*, **10**, 2607-2618.
- Cheng, L., Hunke, L. and Hardy, C.F. (1998) Cell cycle regulation of the *Saccharomyces cerevisiae* polo-like kinase cdc5p. *Mol Cell Biol*, **18**, 7360-7370.
- Chiolo, I., Carotenuto, W., Maffioletti, G., Petrini, J.H., Foiani, M. and Liberi, G. (2005) Srs2 and Sgs1 DNA helicases associate with Mre11 in different subcomplexes following checkpoint activation and CDK1-mediated Srs2 phosphorylation. *Mol Cell Biol*, **25**, 5738-5751.
- Chow, J.P., Siu, W.Y., Fung, T.K., Chan, W.M., Lau, A., Arooz, T., Ng, C.P., Yamashita, K. and Poon, R.Y. (2003) DNA damage during the spindle-assembly checkpoint degrades CDC25A, inhibits cyclin-CDC2 complexes, and reverses cells to interphase. *Mol Biol Cell*, **14**, 3989-4002.
- Ciosk, R., Zachariae, W., Michaelis, C., Shevchenko, A., Mann, M. and Nasmyth, K. (1998) An ESP1/PDS1 complex regulates loss of sister chromatid cohesion at the metaphase to anaphase transition in yeast. *Cell*, **93**, 1067-1076.
- Clemenson, C. and Marsolier-Kergoat, M.C. (2006) The spindle assembly checkpoint regulates the phosphorylation state of a subset of DNA checkpoint proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*.
- Clerici, M., Baldo, V., Mantiero, D., Lottersberger, F., Lucchini, G. and Longhese, M.P. (2004) A Tel1/MRX-dependent checkpoint inhibits the metaphase-to-anaphase transition after UV irradiation in the absence of Mec1. *Mol Cell Biol*, **24**, 10126-10144.
- Cohen, P.T. (1997) Novel protein serine/threonine phosphatases: variety is the spice of life. *Trends Biochem Sci*, **22**, 245-251.
- Cohen-Fix, O. and Koshland, D. (1997) The anaphase inhibitor of *Saccharomyces cerevisiae* Pds1p is a target of the DNA damage checkpoint pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 14361-14366.
- Cohen-Fix, O. and Koshland, D. (1999) Pds1p of budding yeast has dual roles: inhibition of anaphase initiation and regulation of mitotic exit. *Genes Dev*, **13**, 1950-1959.
- Cohen-Fix, O., Peters, J.M., Kirschner, M.W. and Koshland, D. (1996) Anaphase initiation in *Saccharomyces cerevisiae* is controlled by the APC-dependent degradation of the anaphase inhibitor Pds1p. *Genes Dev*, **10**, 3081-3093.
- Collura, A., Blaisonneau, J., Baldacci, G. and Francesconi, S. (2005) The fission yeast Crb2/Chk1 pathway coordinates the DNA damage and spindle checkpoint in response to replication stress induced by topoisomerase I inhibitor. *Mol Cell Biol*, **25**, 7889-7899.
- Cullen, P.J. and Sprague, G.F., Jr. (2002) The Glc7p-interacting protein Bud14p attenuates polarized growth, pheromone response, and filamentous growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot Cell*, **1**, 884-894.
- D'Angiolella, V., Mari, C., Nocera, D., Rametti, L. and Grieco, D. (2003) The spindle checkpoint requires cyclin-dependent kinase activity. *Genes Dev*, **17**, 2520-2525.
- Daley, J.M., Palmbo, P.L., Wu, D. and Wilson, T.E. (2005) Nonhomologous end joining in yeast. *Annu Rev Genet*, **39**, 431-451.
- Daniel, J.A., Keyes, B.E., Ng, Y.P., Freeman, C.O. and Burke, D.J. (2006) Diverse functions of spindle assembly checkpoint genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, **172**, 53-65.
- De Antoni, A., Pearson, C.G., Cimini, D., Canman, J.C., Sala, V., Nezi, L., Mapelli, M., Sironi, L., Faretta, M., Salmon, E.D. and Musacchio, A. (2005) The Mad1/Mad2 complex as a template for Mad2 activation in the spindle assembly checkpoint. *Curr Biol*, **15**, 214-225.
- de la Torre-Ruiz, M.A., Green, C.M. and Lowndes, N.F. (1998) RAD9 and RAD24 define two additive, interacting branches of the DNA damage checkpoint pathway in budding yeast normally required for Rad53 modification and activation. *Embo J*, **17**, 2687-2698.

- den Elzen, N., Kosoy, A., Christopoulos, H. and O'Connell, M.J. (2004) Resisting arrest: recovery from checkpoint arrest through dephosphorylation of Chk1 by PP1. *Cell Cycle*, **3**, 529-533.
- den Elzen, N.R. and O'Connell, M.J. (2004) Recovery from DNA damage checkpoint arrest by PP1-mediated inhibition of Chk1. *Embo J*, **23**, 908-918.
- Dickman, M.B. and Yarden, O. (1999) Serine/threonine protein kinases and phosphatases in filamentous fungi. *Fungal Genet Biol*, **26**, 99-117.
- Dodson, H., Bourke, E., Jeffers, L.J., Vagnarelli, P., Sonoda, E., Takeda, S., Earnshaw, W.C., Merdes, A. and Morrison, C. (2004) Centrosome amplification induced by DNA damage occurs during a prolonged G2 phase and involves ATM. *Embo J*, **23**, 3864-3873.
- Egloff, M.P., Johnson, D.F., Moorhead, G., Cohen, P.T., Cohen, P. and Barford, D. (1997) Structural basis for the recognition of regulatory subunits by the catalytic subunit of protein phosphatase 1. *Embo J*, **16**, 1876-1887.
- Emili, A. (1998) MEC1-dependent phosphorylation of Rad9p in response to DNA damage. *Mol Cell*, **2**, 183-189.
- Esashi, F. and Yanagida, M. (1999) Cdc2 phosphorylation of Crb2 is required for reestablishing cell cycle progression after the damage checkpoint. *Mol Cell*, **4**, 167-174.
- Evans, D.R. and Stark, M.J. (1997) Mutations in the *Saccharomyces cerevisiae* type 2A protein phosphatase catalytic subunit reveal roles in cell wall integrity, actin cytoskeleton organization and mitosis. *Genetics*, **145**, 227-241.
- Fang, G. (2002) Checkpoint protein BubR1 acts synergistically with Mad2 to inhibit anaphase-promoting complex. *Mol Biol Cell*, **13**, 755-766.
- Fang, G., Yu, H. and Kirschner, M.W. (1998) The checkpoint protein MAD2 and the mitotic regulator CDC20 form a ternary complex with the anaphase-promoting complex to control anaphase initiation. *Genes Dev*, **12**, 1871-1883.
- Fang, Y., Liu, T., Wang, X., Yang, Y.M., Deng, H., Kunicki, J., Traganos, F., Darzynkiewicz, Z., Lu, L. and Dai, W. (2006) BubR1 is involved in regulation of DNA damage responses. *Oncogene*, **25**, 3598-3605.
- Feng, Z.H., Wilson, S.E., Peng, Z.Y., Schlender, K.K., Reimann, E.M. and Trumbly, R.J. (1991) The yeast GLC7 gene required for glycogen accumulation encodes a type 1 protein phosphatase. *J Biol Chem*, **266**, 23796-23801.
- Fernandez, A., Brautigan, D.L. and Lamb, N.J. (1992) Protein phosphatase type 1 in mammalian cell mitosis: chromosomal localization and involvement in mitotic exit. *J Cell Biol*, **116**, 1421-1430.
- Fesquet, D., Fitzpatrick, P.J., Johnson, A.L., Kramer, K.M., Toyn, J.H. and Johnston, L.H. (1999) A Bub2p-dependent spindle checkpoint pathway regulates the Dbf2p kinase in budding yeast. *Embo J*, **18**, 2424-2434.
- Foiani, M., Pelliccioli, A., Lopes, M., Lucca, C., Ferrari, M., Liberi, G., Muzi Falconi, M. and Plevani, P. (2000) DNA damage checkpoints and DNA replication controls in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mutat Res*, **451**, 187-196.
- Francisco, L., Wang, W. and Chan, C.S. (1994) Type 1 protein phosphatase acts in opposition to IpL1 protein kinase in regulating yeast chromosome segregation. *Mol Cell Biol*, **14**, 4731-4740.
- Frank-Vaillant, M. and Marcand, S. (2002) Transient stability of DNA ends allows nonhomologous end joining to precede homologous recombination. *Mol Cell*, **10**, 1189-1199.
- Fraschini, R., Beretta, A., Lucchini, G. and Piatti, S. (2001a) Role of the kinetochore protein Ndc10 in mitotic checkpoint activation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Genet Genomics*, **266**, 115-125.
- Fraschini, R., Beretta, A., Sironi, L., Musacchio, A., Lucchini, G. and Piatti, S. (2001b) Bub3 interaction with Mad2, Mad3 and Cdc20 is mediated by WD40 repeats and does not require intact kinetochores. *Embo J*, **20**, 6648-6659.
- Fraschini, R., Formenti, E., Lucchini, G. and Piatti, S. (1999) Budding yeast Bub2 is localized at spindle pole bodies and activates the mitotic checkpoint via a different pathway from Mad2. *J Cell Biol*, **145**, 979-991.
- Furuya, K., Poitelea, M., Guo, L., Caspari, T. and Carr, A.M. (2004) Chk1 activation requires Rad9 S/TQ-site phosphorylation to promote association with C-terminal BRCT domains of Rad4TOPBP1. *Genes Dev*, **18**, 1154-1164.
- Galgoczy, D.J. and Toczyski, D.P. (2001) Checkpoint adaptation precedes spontaneous and damage-induced genomic instability in yeast. *Mol Cell Biol*, **21**, 1710-1718.
- Gancedo, J.M. (1998) Yeast carbon catabolite repression. *Microbiol Mol Biol Rev*, **62**, 334-361.
- Garber, P.M. and Rine, J. (2002) Overlapping roles of the spindle assembly and DNA damage checkpoints in the cell-cycle response to altered chromosomes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, **161**, 521-534.
- Garcia-Gimeno, M.A., Munoz, I., Arino, J. and Sanz, P. (2003) Molecular characterization of Ypi1, a novel *Saccharomyces cerevisiae* type 1 protein phosphatase inhibitor. *J Biol Chem*, **278**, 47744-47752.
- Gardner, R., Putnam, C.W. and Weinert, T. (1999) RAD53, DUN1 and PDS1 define two parallel G2/M checkpoint pathways in budding yeast. *Embo J*, **18**, 3173-3185.
- Garner, M., van Kreeveld, S. and Su, T.T. (2001) mei-41 and bub1 block mitosis at two distinct steps in response to incomplete DNA replication in *Drosophila* embryos. *Curr Biol*, **11**, 1595-1599.
- Garvik, B., Carson, M. and Hartwell, L. (1995) Single-stranded DNA arising at telomeres in *cdc13* mutants may constitute a specific signal for the RAD9 checkpoint. *Mol Cell Biol*, **15**, 6128-6138.
- Gasch, A.P., Huang, M., Metzner, S., Botstein, D., Elledge, S.J. and Brown, P.O. (2001) Genomic expression



- responses to DNA-damaging agents and the regulatory role of the yeast ATR homolog Mec1p. *Mol Biol Cell*, **12**, 2987-3003.
- Gerald, J.N., Benjamin, J.M. and Kron, S.J. (2002) Robust G1 checkpoint arrest in budding yeast: dependence on DNA damage signaling and repair. *J Cell Sci*, **115**, 1749-1757.
- Giannattasio, M., Lazzaro, F., Longhese, M.P., Plevani, P. and Muzi-Falconi, M. (2004) Physical and functional interactions between nucleotide excision repair and DNA damage checkpoint. *Embo J*, **23**, 429-438.
- Gilbert, C.S., Green, C.M. and Lowndes, N.F. (2001) Budding yeast Rad9 is an ATP-dependent Rad53 activating machine. *Mol Cell*, **8**, 129-136.
- Gingras, A.C., Caballero, M., Zarske, M., Sanchez, A., Hazbun, T.R., Fields, S., Sonenberg, N., Hafen, E., Raught, B. and Aebersold, R. (2005) A novel, evolutionarily conserved protein phosphatase complex involved in cisplatin sensitivity. *Mol Cell Proteomics*, **4**, 1725-1740.
- Glover, C.V., 3rd. (1998) On the physiological role of casein kinase II in *Saccharomyces cerevisiae*. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*, **59**, 95-133.
- Green, C.M., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P. and Lowndes, N.F. (2000) A novel Rad24 checkpoint protein complex closely related to replication factor C. *Curr Biol*, **10**, 39-42.
- Grenon, M., Gilbert, C. and Lowndes, N.F. (2001) Checkpoint activation in response to double-strand breaks requires the Mre11/Rad50/Xrs2 complex. *Nat Cell Biol*, **3**, 844-847.
- Grossmann, K.F., Brown, J.C. and Moses, R.E. (1999) Cisplatin DNA cross-links do not inhibit S-phase and cause only a G2/M arrest in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mutat Res*, **434**, 29-39.
- Guillemain, G., Ma, E., Mauger, S., Miron, S., Thai, R., Guerois, R., Ochsenbein, F. and Marsolier-Kergoat, M.C. (2007) Mechanisms of checkpoint kinase Rad53 inactivation after a double-strand break in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*.
- Guo, C.Y., Brautigan, D.L. and Lerner, J.M. (2002) Ionizing radiation activates nuclear protein phosphatase-1 by ATM-dependent dephosphorylation. *J Biol Chem*, **277**, 41756-41761.
- Halicka, H.D., Huang, X., Traganos, F., King, M.A., Dai, W. and Darzynkiewicz, Z. (2005) Histone H2AX phosphorylation after cell irradiation with UV-B: relationship to cell cycle phase and induction of apoptosis. *Cell Cycle*, **4**, 339-345.
- Haneda, M., Kojima, E., Nishikimi, A., Hasegawa, T., Nakashima, I. and Isobe, K. (2004) Protein phosphatase 1, but not protein phosphatase 2A, dephosphorylates DNA-damaging stress-induced phospho-serine 15 of p53. *FEBS Lett*, **567**, 171-174.
- Hanna, D.E., Rethinaswamy, A. and Glover, C.V. (1995) Casein kinase II is required for cell cycle progression during G1 and G2/M in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*, **270**, 25905-25914.
- 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**, 3144-3158.
- Hanway, D., Chin, J.K., Xia, G., Oshiro, G., Winzeler, E.A. and Romesberg, F.E. (2002) Previously uncharacterized genes in the UV- and MMS-induced DNA damage response in yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 10605-10610.
- Hardwick, K.G., Johnston, R.C., Smith, D.L. and Murray, A.W. (2000) MAD3 encodes a novel component of the spindle checkpoint which interacts with Bub3p, Cdc20p, and Mad2p. *J Cell Biol*, **148**, 871-882.
- Hardwick, K.G., Li, R., Mistrot, C., Chen, R.H., Dann, P., Rudner, A. and Murray, A.W. (1999) Lesions in many different spindle components activate the spindle checkpoint in the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, **152**, 509-518.
- Hardwick, K.G. and Murray, A.W. (1995) Mad1p, a phosphoprotein component of the spindle assembly checkpoint in budding yeast. *J Cell Biol*, **131**, 709-720.
- Hardwick, K.G., Weiss, E., Luca, F.C., Winey, M. and Murray, A.W. (1996) Activation of the budding yeast spindle assembly checkpoint without mitotic spindle disruption. *Science*, **273**, 953-956.
- Hartwell, L.H. and Weinert, T.A. (1989) Checkpoints: controls that ensure the order of cell cycle events. *Science*, **246**, 629-634.
- Hastie, C.J., Vazquez-Martin, C., Philp, A., Stark, M.J. and Cohen, P.T. (2006) The *Saccharomyces cerevisiae* orthologue of the human protein phosphatase 4 core regulatory subunit R2 confers resistance to the anticancer drug cisplatin. *FEBS J*, **273**, 3322-3334.
- Herzberg, K., Bashkirov, V.I., Rolfsmeier, M., Haghazari, E., McDonald, W.H., Anderson, S., Bashkirova, E.V., Yates, J.R., 3rd and 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.
- Hisamoto, N., Frederick, D.L., Sugimoto, K., Tatchell, K. and Matsumoto, K. (1995) The EGP1 gene may be a positive regulator of protein phosphatase type 1 in the growth control of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*, **15**, 3767-3776.
- Hisamoto, N., Sugimoto, K. and Matsumoto, K. (1994) The Glc7 type 1 protein phosphatase of *Saccharomyces cerevisiae* is required for cell cycle progression in G2/M. *Mol Cell Biol*, **14**, 3158-3165.
- Hochwagen, A. and Amon, A. (2006) Checking your breaks: surveillance mechanisms of meiotic recombination. *Curr Biol*, **16**, R217-228.

- Hochwagen, A., Tham, W.H., Brar, G.A. and Amon, A. (2005) The FK506 binding protein Fpr3 counteracts protein phosphatase 1 to maintain meiotic recombination checkpoint activity. *Cell*, **122**, 861-873.
- Howell, B.J., Moree, B., Farrar, E.M., Stewart, S., Fang, G. and Salmon, E.D. (2004) Spindle checkpoint protein dynamics at kinetochores in living cells. *Curr Biol*, **14**, 953-964.
- Hoyt, M.A., Totis, L. and Roberts, B.T. (1991) *S. cerevisiae* genes required for cell cycle arrest in response to loss of microtubule function. *Cell*, **66**, 507-517.
- Hsu, J.Y., Sun, Z.W., Li, X., Reuben, M., Tatchell, K., Bishop, D.K., Grushcow, J.M., Brame, C.J., Caldwell, J.A., Hunt, D.F., Lin, R., Smith, M.M. and Allis, C.D. (2000) Mitotic phosphorylation of histone H3 is governed by Ipl1/aurora kinase and Glc7/PP1 phosphatase in budding yeast and nematodes. *Cell*, **102**, 279-291.
- Hsu, L.C. and White, R.L. (1998) BRCA1 is associated with the centrosome during mitosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 12983-12988.
- Hu, F. and Elledge, S.J. (2002) Bub2 is a cell cycle regulated phospho-protein controlled by multiple checkpoints. *Cell Cycle*, **1**, 351-355.
- Hu, F., Wang, Y., Liu, D., Li, Y., Qin, J. and Elledge, S.J. (2001) Regulation of the Bub2/Bfa1 GAP complex by Cdc5 and cell cycle checkpoints. *Cell*, **107**, 655-665.
- Huang, M., Zhou, Z. and Elledge, S.J. (1998) The DNA replication and damage checkpoint pathways induce transcription by inhibition of the Crt1 repressor. *Cell*, **94**, 595-605.
- Hwang, L.H., Lau, L.F., Smith, D.L., Mistrot, C.A., Hardwick, K.G., Hwang, E.S., Amon, A. and Murray, A.W. (1998) Budding yeast Cdc20: a target of the spindle checkpoint. *Science*, **279**, 1041-1044.
- Ira, G., Pelliccioli, A., Balijja, A., Wang, X., Fiorani, S., Carotenuto, W., Liberi, G., Bressan, D., Wan, L., Hollingsworth, N.M., Haber, J.E. and Foiani, M. (2004) DNA end resection, homologous recombination and DNA damage checkpoint activation require CDK1. *Nature*, **431**, 1011-1017.
- Ishii, K., Kumada, K., Toda, T. and Yanagida, M. (1996) Requirement for PP1 phosphatase and 20S cyclosome/APC for the onset of anaphase is lessened by the dosage increase of a novel gene *sds23+*. *Embo J*, **15**, 6629-6640.
- Jullien, D., Vagnarelli, P., Earnshaw, W.C. and Adachi, Y. (2002) Kinetochores localisation of the DNA damage response component 53BP1 during mitosis. *J Cell Sci*, **115**, 71-79.
- Karess, R. (2005) Rod-Zw10-Zwilch: a key player in the spindle checkpoint. *Trends Cell Biol*, **15**, 386-392.
- 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**, 1078-1083.
- Keogh, M.C., Kim, J.A., Downey, M., Fillingham, J., Chowdhury, D., Harrison, J.C., Onishi, M., Datta, N., Galicia, S., Emili, A., Lieberman, J., Shen, X., Buratowski, S., Haber, J.E., Durocher, D., Greenblatt, J.F. and Krogan, N.J. (2006) A phosphatase complex that dephosphorylates gammaH2AX regulates DNA damage checkpoint recovery. *Nature*, **439**, 497-501.
- Kim, S.H., Lin, D.P., Matsumoto, S., Kitazono, A. and Matsumoto, T. (1998) Fission yeast Slp1: an effector of the Mad2-dependent spindle checkpoint. *Science*, **279**, 1045-1047.
- Kitagawa, K., Abdulle, R., Bansal, P.K., Cagney, G., Fields, S. and Hieter, P. (2003) Requirement of Skp1-Bub1 interaction for kinetochore-mediated activation of the spindle checkpoint. *Mol Cell*, **11**, 1201-1213.
- Kitazono, A.A., Garza, D.A. and Kron, S.J. (2003) Mutations in the yeast cyclin-dependent kinase Cdc28 reveal a role in the spindle assembly checkpoint. *Mol Genet Genomics*, **269**, 672-684.
- Knab, A.M., Fertala, J. and Bjornsti, M.A. (1993) Mechanisms of camptothecin resistance in yeast DNA topoisomerase I mutants. *J Biol Chem*, **268**, 22322-22330.
- Knaus, M., Cameroni, E., Pedruzzi, I., Tatchell, K., De Virgilio, C. and Peter, M. (2005) The Bud14p-Glc7p complex functions as a cortical regulator of dynein in budding yeast. *Embo J*, **24**, 3000-3011.
- Kondo, T., Wakayama, T., Naiki, T., Matsumoto, K. and Sugimoto, K. (2001) Recruitment of Mec1 and Ddc1 checkpoint proteins to double-strand breaks through distinct mechanisms. *Science*, **294**, 867-870.
- Kozubowski, L., Panek, H., Rosenthal, A., Bloecher, A., DeMarini, D.J. and Tatchell, K. (2003) A Bni4-Glc7 phosphatase complex that recruits chitin synthase to the site of bud emergence. *Mol Biol Cell*, **14**, 26-39.
- Krishnan, V., Nirantar, S., Crasta, K., Cheng, A.Y. and Surana, U. (2004) DNA replication checkpoint prevents precocious chromosome segregation by regulating spindle behavior. *Mol Cell*, **16**, 687-700.
- Krogh, B.O. and Symington, L.S. (2004) Recombination proteins in yeast. *Annu Rev Genet*, **38**, 233-271.
- Latif, C., Elzen, N.R. and O'Connell, M.J. (2004) DNA damage checkpoint maintenance through sustained Chk1 activity. *J Cell Sci*, **117**, 3489-3498.
- Lee, S.E., Jensen, S., Frenz, L.M., Johnson, A.L., Fesquet, D. and Johnston, L.H. (2001a) The Bub2-dependent mitotic pathway in yeast acts every cell cycle and regulates cytokinesis. *J Cell Sci*, **114**, 2345-2354.
- Lee, S.E., Moore, J.K., Holmes, A., Umezumi, K., Kolodner, R.D. and Haber, J.E. (1998) *Saccharomyces* Ku70, mre11/rad50 and RPA proteins regulate adaptation to G2/M arrest after DNA damage. *Cell*, **94**, 399-409.
- Lee, S.E., Pelliccioli, A., Malkova, A., Foiani, M. and Haber, J.E. (2001b) The *Saccharomyces* recombination protein Tid1p is required for adaptation from G2/M arrest induced by a double-strand break. *Curr Biol*, **11**, 1053-1057.
- Lee, S.E., Pelliccioli, A., Vaze, M.B., Sugawara, N., Malkova, A., Foiani, M. and Haber, J.E. (2003) Yeast Rad52 and Rad51 recombination proteins define a second pathway of DNA damage assessment in response to a single

- double-strand break. *Mol Cell Biol*, **23**, 8913-8923.
- Lenssen, E., James, N., Pedruzzi, I., Dubouloz, F., Cameroni, E., Bisig, R., Maillet, L., Werner, M., Roosen, J., Petrovic, K., Winderickx, J., Collart, M.A. and De Virgilio, C. (2005) The Ccr4-Not complex independently controls both Msn2-dependent transcriptional activation--via a newly identified Glc7/Bud14 type I protein phosphatase module--and TFIID promoter distribution. *Mol Cell Biol*, **25**, 488-498.
- Leroy, C., Lee, S.E., Vaze, M.B., Ochsenbier, F., Guerois, R., Haber, J.E. and Marsolier-Kergoat, M.C. (2003) PP2C phosphatases Ptc2 and Ptc3 are required for DNA checkpoint inactivation after a double-strand break. *Mol Cell*, **11**, 827-835.
- Lew, D.J. and Burke, D.J. (2003) The spindle assembly and spindle position checkpoints. *Annu Rev Genet*, **37**, 251-282.
- Li, R. (1999) Bifurcation of the mitotic checkpoint pathway in budding yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 4989-4994.
- Li, R. and Murray, A.W. (1991) Feedback control of mitosis in budding yeast. *Cell*, **66**, 519-531.
- Li, X. and Cai, M. (1997) Inactivation of the cyclin-dependent kinase Cdc28 abrogates cell cycle arrest induced by DNA damage and disassembly of mitotic spindles in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*, **17**, 2723-2734.
- Li, X. and Nicklas, R.B. (1995) Mitotic forces control a cell-cycle checkpoint. *Nature*, **373**, 630-632.
- Li, Y., Bachant, J., Alcasabas, A.A., Wang, Y., Qin, J. and Elledge, S.J. (2002) The mitotic spindle is required for loading of the DASH complex onto the kinetochore. *Genes Dev*, **16**, 183-197.
- Li, Y., Gorbea, C., Mahaffey, D., Rechsteiner, M. and Benzra, R. (1997) MAD2 associates with the cyclosome/anaphase-promoting complex and inhibits its activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 12431-12436.
- Liberi, G., Chiolo, I., Pelliccioli, A., Lopes, M., Plevani, P., Muzi-Falconi, M. and Foiani, M. (2000) Srs2 DNA helicase is involved in checkpoint response and its regulation requires a functional Mec1-dependent pathway and Cdk1 activity. *Embo J*, **19**, 5027-5038.
- Limoli, C.L., Giedzinski, E., Bonner, W.M. and Cleaver, J.E. (2002) UV-induced replication arrest in the xeroderma pigmentosum variant leads to DNA double-strand breaks, gamma-H2AX formation, and Mre11 relocalization. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 233-238.
- 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**, 699-713.
- Liu, Y., Vidanes, G., Lin, Y.C., Mori, S. and Siede, W. (2000) Characterization of a *Saccharomyces cerevisiae* homologue of *Schizosaccharomyces pombe* Chk1 involved in DNA-damage-induced M-phase arrest. *Mol Gen Evol*, **262**, 1132-1146.
- Liu, Y., Virshup, D.M., White, R.L. and Hsu, L.C. (2002) Regulation of BRCA1 phosphorylation by interaction with protein phosphatase 1alpha. *Cancer Res*, **62**, 6357-6361.
- Longhese, M.P., Paciotti, V., Frascini, R., Zaccarini, R., Plevani, P. and Lucchini, G. (1997) The novel DNA damage checkpoint protein ddc1p is phosphorylated periodically during the cell cycle and in response to DNA damage in budding yeast. *Embo J*, **16**, 5216-5226.
- Lopes, M., Cotta-Ramusino, C., Pelliccioli, 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**, 557-561.
- Lu, X., Nannenga, B. and Donehower, L.A. (2005) PPM1D dephosphorylates Chk1 and p53 and abrogates cell cycle checkpoints. *Genes Dev*, **19**, 1162-1174.
- Ludlow, J.W. and Nelson, D.A. (1995) Control and activity of type-1 serine/threonine protein phosphatase during the cell cycle. *Semin Cancer Biol*, **6**, 195-202.
- Luo, X., Tang, Z., Xia, G., Wassmann, K., Matsumoto, T., Rizo, J. and Yu, H. (2004) The Mad2 spindle checkpoint protein has two distinct natively folded states. *Nat Struct Mol Biol*, **11**, 338-345.
- Lupardus, P.J. and Cimprich, K.A. (2004) Checkpoint adaptation; molecular mechanisms uncovered. *Cell*, **117**, 555-556.
- Ma, J.L., Lee, S.J., Duong, J.K. and Stern, D.F. (2006) Activation of the checkpoint kinase Rad53 by the phosphatidylinositol kinase-like kinase Mec1. *J Biol Chem*, **281**, 3954-3963.
- MacKelvie, S.H., Andrews, P.D. and Stark, M.J. (1995) The *Saccharomyces cerevisiae* gene SDS22 encodes a potential regulator of the mitotic function of yeast type 1 protein phosphatase. *Mol Cell Biol*, **15**, 3777-3785.
- Macris, M.A. and Sung, P. (2005) Multifaceted role of the *Saccharomyces cerevisiae* Srs2 helicase in homologous recombination regulation. *Biochem Soc Trans*, **33**, 1447-1450.
- Majka, J. and Burgers, P.M. (2003) Yeast Rad17/Mec3/Ddc1: a sliding clamp for the DNA damage checkpoint. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 2249-2254.
- Malmanche, N., Maia, A. and Sunkel, C.E. (2006) The spindle assembly checkpoint: preventing chromosome mis-segregation during mitosis and meiosis. *FEBS Lett*, **580**, 2888-2895.
- Margolis, S.S., Walsh, S., Weiser, D.C., Yoshida, M., Shenolikar, S. and Kornbluth, S. (2003) PP1 control of M phase entry exerted through 14-3-3-regulated Cdc25 dephosphorylation. *Embo J*, **22**, 5734-5745.
- Maringele, L. and Lydall, D. (2002) EXO1-dependent single-stranded DNA at telomeres activates subsets of DNA damage and spindle checkpoint pathways in budding yeast yku70Delta mutants. *Genes Dev*, **16**, 1919-1933.

- Marsolier, M.C., Roussel, P., Leroy, C. and Mann, C. (2000) Involvement of the PP2C-like phosphatase Ptc2p in the DNA checkpoint pathways of *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, **154**, 1523-1532.
- Martin, S.G., Laroche, T., Suka, N., Grunstein, M. and Gasser, S.M. (1999) Relocalization of telomeric Ku and SIR proteins in response to DNA strand breaks in yeast. *Cell*, **97**, 621-633.
- May, K.M. and Hardwick, K.G. (2006) The spindle checkpoint. *J Cell Sci*, **119**, 4139-4142.
- Mayer, M.L., Gygi, S.P., Aebersold, R. and Hieter, P. (2001) Identification of RFC(Ctf18p, Ctf8p, Dcc1p): an alternative RFC complex required for sister chromatid cohesion in *S. cerevisiae*. *Mol Cell*, **7**, 959-970.
- Melo, J. and Toczyski, D. (2002) A unified view of the DNA-damage checkpoint. *Curr Opin Cell Biol*, **14**, 237-245.
- Melo, J.A., Cohen, J. and Toczyski, D.P. (2001) Two checkpoint complexes are independently recruited to sites of DNA damage in vivo. *Genes Dev*, **15**, 2809-2821.
- Mikhailov, A., Cole, R.W. and Rieder, C.L. (2002) DNA damage during mitosis in human cells delays the metaphase/anaphase transition via the spindle-assembly checkpoint. *Curr Biol*, **12**, 1797-1806.
- Mortensen, E.M., Haas, W., Gygi, M., Gygi, S.P. and Kellogg, D.R. (2005) Cdc28-dependent regulation of the Cdc5/Polo kinase. *Curr Biol*, **15**, 2033-2037.
- Murray, A.W. (1992) Creative blocks: cell-cycle checkpoints and feedback controls. *Nature*, **359**, 599-604.
- Musacchio, A. and Hardwick, K.G. (2002) The spindle checkpoint: structural insights into dynamic signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **3**, 731-741.
- Naiki, T., Wakayama, T., Nakada, D., Matsumoto, K. and Sugimoto, K. (2004) Association of Rad9 with double-strand breaks through a Mec1-dependent mechanism. *Mol Cell Biol*, **24**, 3277-3285.
- Nakada, D., Matsumoto, K. and Sugimoto, K. (2003) ATM-related Tel1 associates with double-strand breaks through an Xrs2-dependent mechanism. *Genes Dev*, **17**, 1957-1962.
- Neecke, H., Lucchini, G. and Longhese, M.P. (1999) Cell cycle progression in the presence of irreparable DNA damage is controlled by a Mec1- and Rad53-dependent checkpoint in budding yeast. *Embo J*, **18**, 4485-4497.
- Nigavekar, S.S., Tan, Y.S. and Cannon, J.F. (2002) Glc8 is a glucose-repressible activator of Glc7 protein phosphatase-1. *Arch Biochem Biophys*, **404**, 71-79.
- Nitta, M., Kobayashi, O., Honda, S., Hirota, T., Kuninaka, S., Marumoto, T., Ushio, Y. and Saya, H. (2004) Spindle checkpoint function is required for mitotic catastrophe induced by DNA-damaging agents. *Oncogene*, **23**, 6548-6558.
- Nyberg, K.A., Michelson, R.J., Putnam, C.W. and Weinert, T.A. (2002) Toward maintaining the genome: DNA damage and replication checkpoints. *Annu Rev Genet*, **36**, 617-656.
- Ohkura, H., Adachi, Y., Kinoshita, N., Niwa, O., Toda, T. and Yanagida, M. (1988) Cold-sensitive and caffeine-supersensitive mutants of the *Schizosaccharomyces pombe* dis genes implicated in sister chromatid separation during mitosis. *Embo J*, **7**, 1465-1473.
- Ohkura, H., Kinoshita, N., Miyatani, S., Toda, T. and Yanagida, M. (1989) The fission yeast *dis2+* gene required for chromosome disjoining encodes one of two putative type 1 protein phosphatases. *Cell*, **57**, 997-1007.
- 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**, 1755-1767.
- Paciotti, V., Clerici, M., Lucchini, G. and Longhese, M.P. (2000) The checkpoint protein Ddc2, functionally related to *S. pombe* Rad26, interacts with Mec1 and is regulated by Mec1-dependent phosphorylation in budding yeast. *Genes Dev*, **14**, 2046-2059.
- Paciotti, V., Lucchini, G., Plevani, P. and Longhese, M.P. (1998) Mec1p is essential for phosphorylation of the yeast DNA damage checkpoint protein Ddc1p, which physically interacts with Mec3p. *Embo J*, **17**, 4199-4209.
- Palframan, W.J., Meehl, J.B., Jaspersen, S.L., Winey, M. and Murray, A.W. (2006) Anaphase inactivation of the spindle checkpoint. *Science*, **313**, 680-684.
- Palmos, P.L., Daley, J.M. and Wilson, T.E. (2005) Mutations of the Yku80 C terminus and Xrs2 FHA domain specifically block yeast nonhomologous end joining. *Mol Cell Biol*, **25**, 10782-10790.
- Pangilinan, F. and Spencer, F. (1996) Abnormal kinetochore structure activates the spindle assembly checkpoint in budding yeast. *Mol Biol Cell*, **7**, 1195-1208.
- Papamichos-Chronakis, M., Krebs, J.E. and Peterson, C.L. (2006) Interplay between Ino80 and Swr1 chromatin remodeling enzymes regulates cell cycle checkpoint adaptation in response to DNA damage. *Genes Dev*, **20**, 2437-2449.
- Paulovich, A.G., Margulies, R.U., Garvik, B.M. and Hartwell, L.H. (1997) RAD9, RAD17, and RAD24 are required for S phase regulation in *Saccharomyces cerevisiae* in response to DNA damage. *Genetics*, **145**, 45-62.
- Pedelini, L., Marquina, M., Arino, J., Casamayor, A., Sanz, L., Bollen, M., Sanz, P. and Garcia-Gimeno, M.A. (2006) Ypi1 and Sds22 proteins regulate the nuclear localization and function of yeast type 1 phosphatase Glc7. *J Biol Chem*.
- Peggie, M.W., MacKelvie, S.H., Bloecher, A., Knatko, E.V., Tatchell, K. and Stark, M.J. (2002) Essential functions of Sds22p in chromosome stability and nuclear localization of PP1. *J Cell Sci*, **115**, 195-206.
- Pelliccioli, A., Lee, S.E., Lucca, C., Foiani, M. and Haber, J.E. (2001) Regulation of *Saccharomyces* Rad53 checkpoint kinase during adaptation from DNA damage-induced G2/M arrest. *Mol Cell*, **7**, 293-300.
- Pelliccioli, 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**, 6561-6572.
- Peng, Z.Y., Trumbly, R.J. and Reimann, E.M. (1990) Purification and characterization of glycogen synthase from a glycogen-deficient strain of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*, **265**, 13871-13877.
- Petersen, L.N., Orren, D.K. and Bohr, V.A. (1995) Gene-specific and strand-specific DNA repair in the G1 and G2 phases of the cell cycle. *Mol Cell Biol*, **15**, 3731-3737.
- Petukhova, G., Sung, P. and Klein, H. (2000) Promotion of Rad51-dependent D-loop formation by yeast recombination factor Rdh54/Tid1. *Genes Dev*, **14**, 2206-2215.
- Pfander, B., Moldovan, G.L., Sacher, M., Hoegge, C. and Jentsch, S. (2005) SUMO-modified PCNA recruits Srs2 to prevent recombination during S phase. *Nature*, **436**, 428-433.
- Pinsky, B.A. and Biggins, S. (2005) The spindle checkpoint: tension versus attachment. *Trends Cell Biol*, **15**, 486-493.
- Pinsky, B.A., Kotwaliwale, C.V., Tatsutani, S.Y., Breed, C.A. and Biggins, S. (2006) Glc7/protein phosphatase 1 regulatory subunits can oppose the Ipl1/aurora protein kinase by redistributing Glc7. *Mol Cell Biol*, **26**, 2648-2660.
- Rancati, G., Crispo, V., Lucchini, G. and Piatti, S. (2005) Mad3/BubR1 phosphorylation during spindle checkpoint activation depends on both Polo and Aurora kinases in budding yeast. *Cell Cycle*, **4**, 972-980.
- Rieder, C.L., Cole, R.W., Khodjakov, A. and Sluder, G. (1995) The checkpoint delaying anaphase in response to chromosome monoorientation is mediated by an inhibitory signal produced by unattached kinetochores. *J Cell Biol*, **130**, 941-948.
- Roberts, B.T., Farr, K.A. and Hoyt, M.A. (1994) The *Saccharomyces cerevisiae* checkpoint gene BUB1 encodes a novel protein kinase. *Mol Cell Biol*, **14**, 8282-8291.
- Rotman, G. and Shiloh, Y. (1999) ATM: a mediator of multiple responses to genotoxic stress. *Oncogene*, **18**, 6135-6144.
- Rouse, J. and Jackson, S.P. (2000) LCD1: an essential gene involved in checkpoint control and regulation of the MEC1 signalling pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *Embo J*, **19**, 5801-5812.
- Rouse, J. and Jackson, S.P. (2002a) Interfaces between the detection, signaling, and repair of DNA damage. *Science*, **297**, 547-551.
- Rouse, J. and Jackson, S.P. (2002b) Lcd1p recruits Mec1p to DNA lesions in vitro and in vivo. *Mol Cell*, **9**, 857-869.
- Royou, A., Macias, H. and Sullivan, W. (2005) The *Drosophila* Grp/Chk1 DNA damage checkpoint controls entry into anaphase. *Curr Biol*, **15**, 334-339.
- Sanchez, Y., Bachant, J., Wang, H., Hu, F., Liu, D., Tetzlaff, M. and Elledge, S.J. (1999) Control of the DNA damage checkpoint by chk1 and rad53 protein kinases through distinct mechanisms. *Science*, **286**, 1166-1171.
- Sandell, L.L. and Zakian, V.A. (1993) Loss of a yeast telomere: arrest, recovery, and chromosome loss. *Cell*, **75**, 729-739.
- Santocanale, C. and Diffley, J.F. (1998) A Mec1- and Rad53-dependent checkpoint controls late-firing origins of DNA replication. *Nature*, **395**, 615-618.
- Sassoon, I., Severin, F.F., Andrews, P.D., Taba, M.R., Kaplan, K.B., Ashford, A.J., Stark, M.J., Sorger, P.K. and Hyman, A.A. (1999) Regulation of *Saccharomyces cerevisiae* kinetochores by the type 1 phosphatase Glc7p. *Genes Dev*, **13**, 545-555.
- Schmitt, A.P. and McEntee, K. (1996) Msn2p, a zinc finger DNA-binding protein, is the transcriptional activator of the multistress response in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 5777-5782.
- Searle, J.S., Schollaert, K.L., Wilkins, B.J. and Sanchez, Y. (2004) The DNA damage checkpoint and PKA pathways converge on APC substrates and Cdc20 to regulate mitotic progression. *Nat Cell Biol*, **6**, 138-145.
- Seeley, T.W., Wang, L. and Zhen, J.Y. (1999) Phosphorylation of human MAD1 by the BUB1 kinase in vitro. *Biochem Biophys Res Commun*, **257**, 589-595.
- Shah, J.V., Botvinick, E., Bonday, Z., Furnari, F., Berns, M. and Cleveland, D.W. (2004) Dynamics of centromere and kinetochore proteins; implications for checkpoint signaling and silencing. *Curr Biol*, **14**, 942-952.
- Shinohara, M., Shita-Yamaguchi, E., Buerstedde, J.M., Shinagawa, H., Ogawa, H. and Shinohara, A. (1997) Characterization of the roles of the *Saccharomyces cerevisiae* RAD54 gene and a homologue of RAD54, RDH54/TID1, in mitosis and meiosis. *Genetics*, **147**, 1545-1556.
- Sidorova, J.M. and Breeden, L.L. (1997) Rad53-dependent phosphorylation of Swi6 and down-regulation of CLN1 and CLN2 transcription occur in response to DNA damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev*, **11**, 3032-3045.
- Siede, W., Friedberg, A.S. and Friedberg, E.C. (1993) RAD9-dependent G1 arrest defines a second checkpoint for damaged DNA in the cell cycle of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **90**, 7985-7989.
- Siede, W. and Friedberg, E.C. (1990) Influence of DNA repair deficiencies on the UV sensitivity of yeast cells in different cell cycle stages. *Mutat Res*, **245**, 287-292.
- Sikorski, R.S. and Hieter, P. (1989) A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, **122**, 19-27.
- Smolka, M.B., Albuquerque, C.P., Chen, S.H., Schmidt, K.H., Wei, X.X., Kolodner, R.D. and Zhou, H. (2005)

- Dynamic changes in protein-protein interaction and protein phosphorylation probed with amine-reactive isotope tag. *Mol Cell Proteomics*, **4**, 1358-1369.
- Smolka, M.B., Chen, S.H., Maddox, P.S., Enserink, J.M., Albuquerque, C.P., Wei, X.X., Desai, A., Kolodner, R.D. and Zhou, H. (2006) An FHA domain-mediated protein interaction network of Rad53 reveals its role in polarized cell growth. *J Cell Biol*, **175**, 743-753.
- Sogo, J.M., Lopes, M. and Foiani, M. (2002) Fork reversal and ssDNA accumulation at stalled replication forks owing to checkpoint defects. *Science*, **297**, 599-602.
- Spencer, F. and Hieter, P. (1992) Centromere DNA mutations induce a mitotic delay in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **89**, 8908-8912.
- Stark, M.J. (1996) Yeast protein serine/threonine phosphatases: multiple roles and diverse regulation. *Yeast*, **12**, 1647-1675.
- Stern, B.M. and Murray, A.W. (2001) Lack of tension at kinetochores activates the spindle checkpoint in budding yeast. *Curr Biol*, **11**, 1462-1467.
- Stuart, J.S., Frederick, D.L., Varner, C.M. and Tatchell, K. (1994) The mutant type 1 protein phosphatase encoded by *glc7-1* from *Saccharomyces cerevisiae* fails to interact productively with the GAC1-encoded regulatory subunit. *Mol Cell Biol*, **14**, 896-905.
- Sudakin, V., Chan, G.K. and Yen, T.J. (2001) Checkpoint inhibition of the APC/C in HeLa cells is mediated by a complex of BUBR1, BUB3, CDC20, and MAD2. *J Cell Biol*, **154**, 925-936.
- Sugimoto, I., Murakami, H., Tonami, Y., Moriyama, A. and Nakanishi, M. (2004) DNA replication checkpoint control mediated by the spindle checkpoint protein Mad2p in fission yeast. *J Biol Chem*, **279**, 47372-47378.
- Sun, Z., Fay, D.S., Marini, F., Foiani, M. and Stern, D.F. (1996) Spk1/Rad53 is regulated by Mec1-dependent protein phosphorylation in DNA replication and damage checkpoint pathways. *Genes Dev*, **10**, 395-406.
- Sun, Z., Hsiao, J., Fay, D.S. and Stern, D.F. (1998) Rad53 FHA domain associated with phosphorylated Rad9 in the DNA damage checkpoint. *Science*, **281**, 272-274.
- Sweeney, F.D., Yang, F., Chi, A., Shabanowitz, J., Hunt, D.F. and Durocher, D. (2005) *Saccharomyces cerevisiae* Rad9 acts as a Mec1 adaptor to allow Rad53 activation. *Curr Biol*, **15**, 1364-1375.
- Syljuasen, R.G., Jensen, S., Bartek, J. and Lukas, J. (2006) Adaptation to the ionizing radiation-induced G2 checkpoint occurs in human cells and depends on checkpoint kinase 1 and Polo-like kinase 1 kinases. *Cancer Res*, **66**, 10253-10257.
- Takada, S., Kelkar, A. and Theurkauf, W.E. (2003) Drosophila checkpoint kinase 2 couples centrosome function and spindle assembly to genomic integrity. *Cell*, **113**, 87-99.
- Tan, Y.S., Morcos, P.A. and Cannon, J.F. (2003) Pho85 phosphorylates the Glc7 protein phosphatase regulator Glc8 in vivo. *J Biol Chem*, **278**, 147-153.
- Tanaka, T.U., Rachidi, N., Janke, C., Pereira, G., Galova, M., Schiebel, E., Stark, M.J. and Nasmyth, K. (2002) Evidence that the Ipl1-Sli15 (Aurora kinase-INCENP) complex promotes chromosome bi-orientation by altering kinetochore-spindle pole connections. *Cell*, **108**, 317-329.
- Tang, Z., Bharadwaj, R., Li, B. and Yu, H. (2001) Mad2-Independent inhibition of APCCdc20 by the mitotic checkpoint protein BubR1. *Dev Cell*, **1**, 227-237.
- Taylor, S.S. and McKeon, F. (1997) Kinetochore localization of murine Bub1 is required for normal mitotic timing and checkpoint response to spindle damage. *Cell*, **89**, 727-735.
- Teo, S.H. and Jackson, S.P. (2001) Telomerase subunit overexpression suppresses telomere-specific checkpoint activation in the yeast *yku80* mutant. *EMBO Rep*, **2**, 197-202.
- 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**, 1323-1336.
- Tinker-Kulberg, R.L. and Morgan, D.O. (1999) Pds1 and Esp1 control both anaphase and mitotic exit in normal cells and after DNA damage. *Genes Dev*, **13**, 1936-1949.
- Toczyski, D.P., Galgoczy, D.J. and Hartwell, L.H. (1997) CDC5 and CKII control adaptation to the yeast DNA damage checkpoint. *Cell*, **90**, 1097-1106.
- Toh, G.W., O'Shaughnessy, A.M., Jimeno, S., Dobbie, I.M., Grenon, M., Maffini, S., O'Rourke, A. and Lowndes, N.F. (2006) Histone H2A phosphorylation and H3 methylation are required for a novel Rad9 DSB repair function following checkpoint activation. *DNA Repair (Amst)*, **5**, 693-703.
- 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**, 699-706.
- Tsvetkov, L., Xu, X., Li, J. and Stern, D.F. (2003) Polo-like kinase 1 and Chk2 interact and co-localize to centrosomes and the midbody. *J Biol Chem*, **278**, 8468-8475.
- Tu, J. and Carlson, M. (1995) REG1 binds to protein phosphatase type 1 and regulates glucose repression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Embo J*, **14**, 5939-5946.
- Tu, J., Song, W. and Carlson, M. (1996) Protein phosphatase type 1 interacts with proteins required for meiosis and other cellular processes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*, **16**, 4199-4206.
- Tung, H.Y., Wang, W. and Chan, C.S. (1995) Regulation of chromosome segregation by Glc8p, a structural homolog of mammalian inhibitor 2 that functions as both an activator and an inhibitor of yeast protein phosphatase 1. *Mol Cell Biol*, **15**, 6064-6074.

- Uhlmann, F., Lottspeich, F. and Nasmyth, K. (1999) Sister-chromatid separation at anaphase onset is promoted by cleavage of the cohesin subunit Scc1. *Nature*, **400**, 37-42.
- Usui, T., Ogawa, H. and Petrini, J.H. (2001) A DNA damage response pathway controlled by Tel1 and the Mre11 complex. *Mol Cell*, **7**, 1255-1266.
- Vaze, M.B., Pelliccioli, A., Lee, S.E., Ira, G., Liberi, G., Arbel-Eden, A., Foiani, M. and Haber, J.E. (2002) Recovery from checkpoint-mediated arrest after repair of a double-strand break requires Srs2 helicase. *Mol Cell*, **10**, 373-385.
- Venclovas, C. and Thelen, M.P. (2000) Structure-based predictions of Rad1, Rad9, Hus1 and Rad17 participation in sliding clamp and clamp-loading complexes. *Nucleic Acids Res*, **28**, 2481-2493.
- Vialard, J.E., Gilbert, C.S., Green, C.M. and Lowndes, N.F. (1998) The budding yeast Rad9 checkpoint protein is subjected to Mec1/Tel1-dependent hyperphosphorylation and interacts with Rad53 after DNA damage. *Embo J*, **17**, 5679-5688.
- Visintin, R., Stegmeier, F. and Amon, A. (2003) The role of the polo kinase Cdc5 in controlling Cdc14 localization. *Mol Biol Cell*, **14**, 4486-4498.
- Wang, H., Liu, D., Wang, Y., Qin, J. and Elledge, S.J. (2001) Pds1 phosphorylation in response to DNA damage is essential for its DNA damage checkpoint function. *Genes Dev*, **15**, 1361-1372.
- Wang, R.H., Yu, H. and Deng, C.X. (2004) A requirement for breast-cancer-associated gene 1 (BRCA1) in the spindle checkpoint. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 17108-17113.
- Wang, Y., Hu, F. and Elledge, S.J. (2000) The Bfa1/Bub2 GAP complex comprises a universal checkpoint required to prevent mitotic exit. *Curr Biol*, **10**, 1379-1382.
- Wei, J.H., Chou, Y.F., Ou, Y.H., Yeh, Y.H., Tyan, S.W., Sun, T.P., Shen, C.Y. and Shieh, S.Y. (2005) TTK/hMps1 participates in the regulation of DNA damage checkpoint response by phosphorylating CHK2 on threonine 68. *J Biol Chem*, **280**, 7748-7757.
- Weinert, T.A. and Hartwell, L.H. (1988) The RAD9 gene controls the cell cycle response to DNA damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *Science*, **241**, 317-322.
- Weinert, T.A. and Hartwell, L.H. (1993) Cell cycle arrest of cdc mutants and specificity of the RAD9 checkpoint. *Genetics*, **134**, 63-80.
- Weinert, T.A., Kiser, G.L. and Hartwell, L.H. (1994) Mitotic checkpoint genes in budding yeast and the dependence of mitosis on DNA replication and repair. *Genes Dev*, **8**, 652-665.
- Weiss, E. and Winey, M. (1996) The *Saccharomyces cerevisiae* spindle pole body duplication gene MPS1 is part of a mitotic checkpoint. *J Cell Biol*, **132**, 111-123.
- Wera, S. and Hemmings, B.A. (1995) Serine/threonine protein phosphatases. *Biochem J*, **311** (Pt 1), 17-29.
- Wu, H.I., Brown, J.A., Dorie, M.J., Lazzeroni, L. and Brown, J.M. (2004) Genome-wide identification of genes conferring resistance to the anticancer agents cisplatin, oxaliplatin, and mitomycin C. *Cancer Res*, **64**, 3940-3948.
- Wysocki, R., Javaheri, A., Kristjansdottir, K., Sha, F. and Kron, S.J. (2006) CDK Pho85 targets CDK inhibitor Sic1 to relieve yeast G1 checkpoint arrest after DNA damage. *Nat Struct Mol Biol*, **13**, 908-914.
- Yamaguchi, S., Decottignies, A. and Nurse, P. (2003) Function of Cdc2p-dependent Bub1p phosphorylation and Bub1p kinase activity in the mitotic and meiotic spindle checkpoint. *Embo J*, **22**, 1075-1087.
- Yamamoto, A., Guacci, V. and Koshland, D. (1996a) Pds1p is required for faithful execution of anaphase in the yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol*, **133**, 85-97.
- Yamamoto, A., Guacci, V. and Koshland, D. (1996b) Pds1p, an inhibitor of anaphase in budding yeast, plays a critical role in the APC and checkpoint pathway(s). *J Cell Biol*, **133**, 99-110.
- Yamano, H., Ishii, K. and Yanagida, M. (1994) Phosphorylation of dis2 protein phosphatase at the C-terminal cdc2 consensus and its potential role in cell cycle regulation. *Embo J*, **13**, 5310-5318.
- Yeong, F.M., Lim, H.H., Padmashree, C.G. and Surana, U. (2000) Exit from mitosis in budding yeast: biphasic inactivation of the Cdc28-Clb2 mitotic kinase and the role of Cdc20. *Mol Cell*, **5**, 501-511.
- 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**, 575-588.
- Yoshida, S., Kono, K., Lowery, D.M., Bartolini, S., Yaffe, M.B., Ohya, Y. and Pellman, D. (2006) Polo-like kinase Cdc5 controls the local activation of Rho1 to promote cytokinesis. *Science*, **313**, 108-111.
- Yu, H. (2006) Structural activation of Mad2 in the mitotic spindle checkpoint: the two-state Mad2 model versus the Mad2 template model. *J Cell Biol*, **173**, 153-157.
- Zachos, G., Black, E.J., Walker, M., Scott, M.T., Vagnarelli, P., Earnshaw, W.C. and Gillespie, D.A. (2007) Chk1 is required for spindle checkpoint function. *Dev Cell*, **12**, 247-260.
- Zhou, B.B. and Elledge, S.J. (2000) The DNA damage response: putting checkpoints in perspective. *Nature*, **408**, 433-439.
- Zhou, Z. and Elledge, S.J. (1992) Isolation of crt mutants constitutive for transcription of the DNA damage inducible gene RNR3 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, **131**, 851-866.
- Zhou, Z. and Elledge, S.J. (1993) DUN1 encodes a protein kinase that controls the DNA damage response in yeast. *Cell*, **75**, 1119-1127.

Zou, L. and Elledge, S.J. (2003) Sensing DNA damage through ATRIP recognition of RPA-ssDNA complexes.  
*Science*, **300**, 1542-1548.





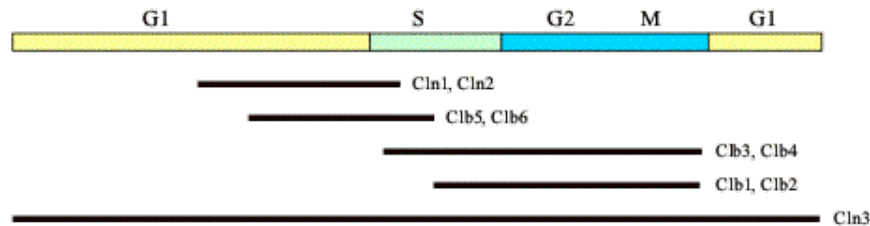
# ANNEXES

## Abréviations

<b>Abréviation</b>	<b>Signification</b>
$\alpha$ F	$\alpha$ -facteur
4-NQO	4-NitroQuinoline 1-Oxide
5-FOA	« 5-FluoroOrotic Acid »
ADN	Acide DésoxyriboNucléique
APC	« Anaphase Promoting Complex »
as	« Analog-Sensitive »
ATP	Adénosine TriPhosphate
CAR	« Contractile Actin Ring »
CDB	Cassure Double-Brin
CDE	« Centromeric DNA Element »
CDK	« Cyclin-Dependent Kinase »
CIP	Calf Intestine Phosphatase
CPDs	« Cyclobutane Pyrimidine Dimers »
Cpt	camptothécine
DAPI	4',6-DiAmidino-2-PhénylIndole
dNTP	déoxyNucléotide TriPhosphate
FACS	« Fluorescence-Activating Cell Sorting »
FEAR	« cdc Fourteen Early Anaphase Release »
FHA	« ForkHead Associated »
GAP	« GTPase Activating Protein »
GDP	Guanine DiPhosphate
GEF	« Guanine nucleotide Exchange Factor »
GFP	« Green Fluorescent Protein »
GST	Glutathione S-Transférase
GTP	Guanine TriPhosphate
HR	« Homologous Recombination »
HU	hydroxyurée
I-1	« Inhibitor-1 »
I-2	« Inhibitor-2 »
kb	kilobase
MCC	« Mitotic Checkpoint Complex »
MEFs	« Mouse Embryonic Fibroblast »
MEN	« Mitotic Exit Network »
MMR	« MisMatch Repair »
MMS	Méthyl Méthane Sulfonate
MRX	Mre11-Rad50-Xrs2
NER	« Nucleotide Excision Repair »
NHEJ	« Non-Homologous End Joining »
Noc	Nocodazole
ONP	Ortho Nitro Phénol

ONPG	Ortho Nitro Phényl Galactopyranoside
PCNA	« Proliferating Cell Nuclear Antigen »
PI3K	« Phosphoinositide-3 Kinase »
PP1	protéine phosphatase de type 1
PP2	protéine phosphatase de type 2
PP2A	protéine phosphatase de type 2A
PP2B	protéine phosphatase de type 2B
PP2C	protéine phosphatase de type 2C
PP4	protéine phosphatase de type 4
PP5	protéine phosphatase de type 5
PP6	protéine phosphatase de type 6
PPM	protéine phosphatase de type M
PPP	protéine phosphatase de type P
PPZ	protéine phosphatase de type Z
PRP	« Post-Replication Repair »
PSP	phosphosérine/thréonine phosphatase
PTP	phosphotyrosine phosphatase
RFC	« Replication Factor C »
RNR	RiboNucléotide Réductase
RPA	« Replication Protein A »
RZZ	Rod-Zw10-Zwilch
SCD	« SQ/TQ Cluster Domain »
SPB	« Spindle Pole Body »
SSA	« Single Strand Annealing »
STRE	« STress Response Element »
TPR	« Tetratricopeptides Repeats »
Ub	Ubiquitine
WT	« Wild-Type »

## Cdc28 et les cyclines



### Cdc28 et les cyclines.

Il existe trois grands types de cyclines: les cyclines de la phase G1 (Cln1, Cln2, Cln3), les cyclines de la phase S (Clb5, Clb6) et les cyclines mitotiques (Clb1, Clb2, Clb3, Clb4). L'activité kinase du complexe Cdc28/cycline est très différente selon la cycline complexée : les complexes Cdc28/Clb ont l'activité kinase la plus forte, viennent ensuite les complexes Cdc28/Cln1 et Cdc28/Cln2. Le complexe Cdc28/Cln3 possède l'activité kinase la plus faible. En phase G1, l'accumulation de Cln3 induit l'accumulation de Cln1 et Cln2. Ces dernières sont responsables du déclenchement de la réplication, de la duplication du SPB et de l'émergence du bourgeon. L'activation des complexes Cdc28/cyclines G1 permet le passage de la transition G1/S. Clb5 et Clb6 sont responsables de l'initiation et du maintien de la réplication. Clb3 et Clb4 sont responsables de la séparation des SPBs. Clb1 et Clb2 sont nécessaires à l'élongation du fuseau et à de nombreux processus mitotiques. La destruction des cyclines mitotiques et l'inactivation de Cdc28 sont essentielles pour la cytokinèse et la sortie de mitose.

## Souches de levure utilisées dans l'étude

Souche	Génotype	
YPH499	<i>MATa ade2-101 his3-Δ200 leu2-Δ1 trp1-Δ63 ura3-52 lys2-801</i>	(Sikorski and Hieter, 1989)
YPH500	<i>MATα ade2-101 his3-Δ200 leu2-Δ1 trp1-Δ63 ura3-52 lys2-801</i>	(Sikorski and Hieter, 1989)
JKM139	<i>MATa hoΔ hmlΔ ::ADE1 hmrΔ ::ADE1 ade3 ::pGAL-HO lys5 leu2-3,112 ura3-52 trp1 ::hisG</i>	(Lee et al., 1998)
JKM179	<i>MATα hoΔ hmlΔ ::ADE1 hmrΔ ::ADE1 ade3 ::pGAL-HO lys5 leu2-3,112 ura3-52 trp1 ::hisG</i>	(Lee et al., 1998)
Y300	<i>MATa can1-100 ade2-1 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1</i>	(Allen et al., 1994)
YMV2	<i>MATaΔ ::hisG hoΔ hmlΔ ::ADE1 hmrΔ ::ADE1 ade3 ::pGAL-HO lys5 ade1 ura3-52 leu2 ::HOcs his4 ::URA3-leu2(XhoI to Asp718I)-his4</i>	(Vaze et al., 2002)
DLY640	<i>MATa ade2-1 trp1-1 can1-100 leu2-3,112 ura3 GAL+ psi+ ssd1-d2 RAD5</i>	(David Lydall)
MCM001	YPH499	
MCM181	YPH499 <i>rad17Δ ::kanMX</i>	
MCM182	YPH499 <i>mec1Δ ::HIS3 + pGAP-RNR1 (2μm TRP1)</i>	
MCM185	YPH499 <i>bar1Δ<sup>1</sup> ::LEU2</i>	
MCM215	YPH499 <i>bar1Δ ::LEU2 rad9Δ ::kanMX</i>	
MCM259	YPH499 <i>bar1Δ ::LEU2 rad53Δ ::kanMX + pGAP-RNR1 (2μm TRP1)</i>	
MCM261	JKM139 <i>bar1Δ ::TRP1</i>	
MCM263	JKM139 <i>bar1Δ ::TRP1 yku80Δ ::kanMX</i>	
MCM275	YPH499 <i>rad17Δ ::kanMX rad9Δ ::KIURA3</i>	
MCM302	JKM139 <i>bar1Δ ::TRP1 ptc2Δ ::KIURA3</i>	
MCM322	JKM139 <i>bar1Δ ::TRP1 ptc2Δ ::KIURA3 ptc3Δ ::kanMX 5-FOA<sup>R</sup></i>	
MCM336	JKM139	
MCM338	YMV2	
MCM339	YMV2 <i>ptc2Δ ::NAT</i>	
MCM346	JKM139 <i>srs2Δ ::LEU2</i>	
MCM347	JKM139 <i>tid1Δ ::URA3</i>	
MCM348	JKM139 <i>rad51Δ ::LEU2</i>	
MCM384	JKM139 <i>bar1Δ ::TRP1 chk1Δ ::kanMX</i>	
MCM403	YPH499 <i>bar1Δ ::LEU2 RAD9-myc ::his5+</i>	
MCM413	JKM139 <i>ptc2Δ ::KIURA3</i>	
MCM426	JKM179 <i>ade1-100 cdc5-ad</i>	
MCM449	JKM139 <i>ckb1Δ ::KIURA3</i>	
MCM458	JKM139 <i>ckb2Δ ::kanMX</i>	

<sup>1</sup> *BARI* code pour une protéase capable de dégrader l'α-facteur. Sa délétion permet d'utiliser une quantité plus restreinte d'α-facteur pour synchroniser les cellules en G1.

MCM694	JKM139 <i>bar1Δ ::TRP1 yku80Δ ::KIURA3</i>
L20	JKM139 <i>mad1Δ ::kanMX</i>
L21	JKM139 <i>mad1Δ ::kanMX</i>
L25	JKM139 <i>mad2Δ ::kanMX</i>
L26	JKM139 <i>mad2Δ ::kanMX</i>
L31	JKM139 <i>bar1Δ ::TRP1 yku80Δ ::KIURA3 mad2Δ ::kanMX</i>
L34	JKM179 <i>tid1Δ ::URA3 mad2Δ ::kanMX</i>
L36	JKM139 <i>ckb1Δ ::KIURA3 mad2Δ ::kanMX</i>
L45	JKM139 <i>bar1::TRP1 mad2Δ ::kanMX</i>
L48	YPH499 <i>bar1Δ ::LEU2 mad2Δ ::kanMX</i>
L49	YPH499 <i>tetO-RAD53-GFP ::TRP1 (souche CHKY001-5)</i>
L51	YPH499 <i>tetO-RAD53-GFP ::TRP1 mad1Δ ::kanMX</i>
L52	YPH499 <i>tetO-RAD53-GFP ::TRP1 mad2Δ ::kanMX</i>
L54	JKM139 <i>glc7Δ ::kanMX + p414MET25/GLC7 (CEN TRP1)</i>
L59	JKM139 <i>MAD1-myc ::kanMX</i>
L62	JKM139 <i>HO inc MAD1-myc ::kanMX (HO inc : site HO détruit par une religation NHEJ imparfaite)</i>
L64	YPH499 <i>bar1Δ ::LEU2</i>
L72	JKM139 <i>CHK1-myc ::kanMX</i>
L73	JKM139 <i>CHK1-myc ::kanMX</i>
L75	JKM139 <i>bar1::TRP1 chk1Δ::kanMX ptc2Δ ::KIURA3</i>
L78	YPH499 <i>bar1Δ::LEU2 RAD9-myc::his5<sup>+</sup> mad2Δ ::kanMX</i>
L81	YPH499 <i>bar1Δ ::LEU2 rad53Δ::kanMX MAD1-myc ::his5<sup>+</sup> + pGAP-RNR1 (2μm TRP1)</i>
L108	YPH499 <i>bar1Δ::LEU2 RAD9-myc ::his5<sup>+</sup> bub2Δ ::kanMX</i>
L114	YPH499 <i>bar1Δ ::LEU2 rad53Δ ::kanMX mad2Δ ::his5<sup>+</sup> + pGAP-RNR1 (2μm TRP1)</i>
L115	YPH499 <i>bar1Δ ::LEU2 rad53Δ ::kanMX mad2Δ ::his5<sup>+</sup> + pGAP-RNR1 (2μm TRP1)</i>
L138	YPH500 <i>bar1Δ::LEU2 RAD9-myc ::his5<sup>+</sup> mec1Δ::HIS3 tel1Δ ::KIURA3 + pGAP-RNR1 (2μm TRP1)</i>
L140	YPH499 <i>bar1Δ::LEU2 RAD9-myc ::his5<sup>+</sup> mec1Δ::HIS3 tel1Δ ::KIURA3 + pGAP-RNR1 (2μm TRP1)</i>
L141	YPH499 <i>bar1Δ::LEU2 RAD9-myc ::his5<sup>+</sup> mec1Δ::HIS3 + pGAP-RNR1 (2μm TRP1)</i>
L145	YPH499 <i>bar1Δ ::LEU2 rad53Δ ::kanMX RAD9-myc ::his5<sup>+</sup> + pGAP-RNR1 (2μm TRP1)</i>
L149	YPH499 <i>bar1Δ ::LEU2 RAD9-myc ::his5<sup>+</sup> tel1Δ ::KIURA3</i>
L153	YPH499 <i>bar1Δ ::LEU2 rad53Δ ::kanMX + pGAP-RNR1 (2μm TRP1)</i>
L157	YPH499 <i>bar1Δ ::LEU2 rad9D::kanMX</i>
L171	JKM139 <i>bar1::TRP1 yku80D::kanMX chk1Δ ::KIURA3</i>
L183	YPH499 <i>bar1Δ ::LEU2 mad2Δ ::his5<sup>+</sup></i>
L184	YPH499 <i>bar1Δ ::LEU2 mad2Δ ::his5<sup>+</sup></i>
L195	JKM139 <i>ptc2Δ ::kanMX</i>
L196	JKM139 <i>ptc2Δ ::kanMX</i>
L197	W303 <i>bar1Δ cdc28-as</i> (Bishop et al., 2000)
L199	YPH499 <i>bar1Δ ::LEU2 pds1Δ ::KIURA3</i>

L202	YPH499 <i>bar1Δ ::LEU2 PDS1-myc ::KIURA3</i>
L204	YPH499 <i>bar1Δ ::LEU2 rad9Δ ::kanMX mad2Δ ::his5<sup>+</sup></i>
L205	YPH499 <i>bar1Δ ::LEU2 rad9Δ ::kanMX mad2Δ ::his5<sup>+</sup></i>
L208	Y300 <i>bar1Δ ::TRP1</i>
L215	YPH499 <i>bar1Δ ::LEU2 PDS1-myc ::KIURA3 mad2Δ ::kanMX</i>
L218	JKM139 <i>chk1Δ ::TRP1</i>
L220	JKM139 <i>ptc2Δ ::kanMX chk1Δ ::TRP1</i>
L221	JKM139 <i>ptc2Δ ::kanMX chk1Δ ::TRP1</i>
L226	DLY640 <i>bar1::hisG cdc15-2</i>
L228	DLY640 <i>bar1Δ ::LEU2</i>
L230	JKM139 <i>bar1Δ ::LEU2</i>
L232	JKM139 <i>chk1Δ ::TRP1 bar1Δ ::LEU2</i>
L234	JKM139 <i>ptc2Δ ::kanMX bar1Δ ::LEU2</i>
L236	JKM139 <i>ptc2Δ ::kanMX bar1Δ ::LEU2 chk1Δ ::TRP1</i>
L241	YPH499 <i>bar1Δ ::LEU2 bub1Δ ::kanMX</i>
L243	YPH499 <i>bar1Δ ::LEU2 rad9Δ ::kanMX PDS1-myc ::KIURA3</i>
L256	YPH499 <i>bar1Δ ::LEU2 rad9Δ ::kanMX</i>
L262	JKM139 <i>HO inc glc7Δ ::kanMX + p414MET25/GLC7 (CEN TRP1) (HO inc : site HO détruit par une religation NHEJ imparfaite)</i>
L266	Y300 <i>bar1Δ ::TRP1 mad2Δ ::kanMX</i>
L273	YPH499 <i>bar1Δ ::LEU2 mad2Δ ::kanMX pds1Δ ::KIURA3</i>
L275	JKM139 <i>ptc2Δ ::KIURA3 mad2Δ ::kanMX</i>
L276	JKM139 <i>ptc2Δ ::KIURA3 mad2Δ ::kanMX</i>
L279	JKM139 <i>ptc2Δ ::KIURA3 mad1Δ ::kanMX</i>
L280	JKM139 <i>ptc2Δ ::KIURA3 mad1Δ ::kanMX</i>
L281	YPH499 <i>bar1Δ ::LEU2 ptc2Δ ::KIURA3 ptc3Δ ::kanMX</i>
L286	YPH499 <i>bar1Δ ::LEU2 RAD9-myc ::his5<sup>+</sup> ? mec1Δ ::HIS3 tel1Δ ::KIURA3 sml1Δ ::kanMX</i>
L288	YPH499 <i>bar1Δ ::LEU2 pph3Δ ::KIURA3</i>
L289	YPH499 <i>bar1Δ ::LEU2 pph3Δ ::KIURA3</i>
L298	YPH499 <i>bar1Δ ::LEU2 rad53Δ ::kanMX rad9Δ ::kanMX + pGAP-RNR1 (2μm TRP1)</i>
L299	YPH499 <i>bar1Δ ::LEU2 rad53Δ ::kanMX rad9Δ ::kanMX + pGAP-RNR1 (2μm TRP1)</i>
L300	<i>MATa bar1Δ ::TRP1 RAD9-myc ::his5<sup>+</sup> mps1-1</i>
L305	YPH499 <i>bar1Δ ::LEU2 rad53Δ ::kanMX + pGAP-RNR1 (2μm TRP1)</i>

## Table des figures

### INTRODUCTION

- **Figure n°I1** : (pages 12-13) Le cycle cellulaire chez les eucaryotes et chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*.
- **Figure n°I2** : (page 15) Mécanisme de résection des extrémités des cassures double-brin.
- **Figure n°I3** : (page 16) Les protéines des checkpoints de l'ADN chez les eucaryotes.
- **Figure n°I4** : (page 19) Rôle de l'adaptateur Rad9 dans l'activation du checkpoint de l'ADN.
- **Figure n°I5** : (page 21) Les protéines des checkpoints de l'ADN intervenant dans la réponse aux stress génotoxique ou réplicatif selon la phase du cycle.
- **Figure n°I6** : (page 22) Modèle d'activation du checkpoint de l'ADN en G2/M en cas de cassure double-brin de l'ADN.
- **Figure n°I7** : (page 23) Les réponses engendrées par l'activation des checkpoints de l'ADN.
- **Figure n°I8** : (page 24) Le mécanisme de réparation d'une cassure double-brin de l'ADN par recombinaison homologue.
- **Figure n°I9** : (page 28) La dégradation de Pds1 et la transition métaphase/anaphase.
- **Figure n°I10** : (page 29) Le réseau MEN est ciblé en cas de dommages du fuseau ou de dommages de l'ADN.
- **Figure n°I11** : (page 37) Les phénomènes d'adaptation et de rétablissement.
- **Figure n°I12** : (page 39) Pho85/Pho80 promeut l'adaptation en G1.
- **Figure n°I13** : (page 42) Le mécanisme de réparation par « Single Strand Annealing » (SSA).
- **Figure n°I14** : (page 49) L'attachement des chromosomes au fuseau mitotique.
- **Figure n°I15** : (page 60) Les blocages induits par le checkpoint du fuseau au cours de la mitose.
- **Figure n°I16** : (page 62) Mad2, Mad1, Bub1 et Mad3 font partie d'une voie distincte de Bub2 impliquée dans la réponse aux dommages du fuseau.
- **Figure n°I17** : (pages 64-65) Les deux voies du checkpoint du fuseau et leurs liens avec les blocages de l'anaphase et de la sortie de mitose.
- **Figure n°I18** : (page 67) Mad2 inhibe la dégradation de Pds1 et l'initiation de l'anaphase.
- **Figure n°I19** : (page 72) Activation de Mad2 aux kinétochores des chromatides non attachées.
- **Figure n°I20** : (pages 77-78) Classification des phosphatases chez les eucaryotes.
- **Figure n°I21** : (page 81) Séquences de liaison putatives à Glc7 de quelques sous-unités régulatrices.
- **Figure n°I22** : (page 84) La méiose et le stade pachytène.
- **Figure n°I23** : (page 92) Glc7 s'oppose à l'action d'Ipl1 au cours processus mitotiques.

### RÉSULTATS ET DISCUSSION- Glc7 et les checkpoints de l'ADN

- **Figure n°G1** : (page 102) La souche JKM139 et l'étude de l'adaptation.
- **Figure n°G2** : (page 104) Crible visant à identifier de nouvelles phosphatases impliquées dans l'inactivation des checkpoints de l'ADN.
- **Figure n°G3** : (page 106) Effet de la surexpression de *GLC7* sur l'adaptation des mutants *ptc2Δ ptc3Δ* et *ptc2Δ*.
- **Figure n°G4** : (pages 110-111) Effet de la surexpression de *GLC7* sur les mutants d'adaptation.
- **Figure n°G5** : (pages 112-113) Effet de la surexpression de *GLC7* sur la phosphorylation de Rad53 et la reprise du cycle chez les mutants *ptc2Δ* et *ptc2Δ ptc3Δ*.
- **Figure n°G6** : (pages 114-115) Effet de la surexpression de *GLC7* sur l'adaptation chez la souche sauvage.
- **Figure n°G7** : (page 117) Effet de la surexpression de *GLC7* sur le rétablissement.
- **Figure n°G8** : (page 118) Effet de la déplétion en Glc7 sur la phosphorylation de Rad53 et la reprise du cycle après cassure HO.
- **Figure n°G9** : (pages 121-122) Influence de la surexpression de *GLC7* sur la réponse à la camptothécine chez le mutant *ptc2Δ*.
- **Figure n°G10** : (pages 124-126) Influence de la délétion de *CHK1* sur l'adaptation et l'état de phosphorylation de Rad53 après cassure HO.
- **Figure n°G11** : (page 127) Effets comparés de la surexpression de *GLC7* et de la délétion de *CHK1* sur l'adaptation après cassure HO.
- **Figure n°G12** : (pages 128-129) Effets comparés de la surexpression de *GLC7* et de la délétion de *CHK1* sur la réponse à la camptothécine.
- **Figure n°G13** : (pages 130-131) Influence de la surexpression de *GLC7* sur l'état de phosphorylation de Chk1.



- **Figure n°G14 :** (page 133) Hypothèse sur la voie permettant à Glc7 d'influencer l'inactivation des checkpoints de l'ADN.
- **Figure n°G15 :** (pages 134-135) Influence de la délétion de *MAD2* sur l'adaptation après cassure HO.
- **Figure n°G16 :** (pages 136-137) Influence de la délétion de *MAD2* sur l'état de phosphorylation de Rad53 et la reprise du cycle après cassure HO.
- **Figure n°G17 :** (pages 137-138) Checkpoint du fuseau et checkpoint de l'ADN.
- **Figure n°G18 :** (pages 139-140) Effets comparés de la surexpression de *GLC7* et de la délétion de *MAD2* sur la réponse à la camptothécine et à l'allèle *tetO-RAD53-GFP*.

#### FIGURES DE L'ARTICLE (Clemenson and Marsolier-Kergoat, 2006)

- **Figure 1 :** (page 156) Activation of the spindle assembly checkpoint triggers changes in the phosphorylation states of Rad53 and Rad9.
- **Figure 2 :** (page 157) Nocodazole-induced phosphorylations of Rad53 and Rad9 are independent of the other components of the DNA checkpoints.
- **Figure 3 :** (pages 158-159) Nocodazole-induced phosphorylations of Rad53 and Rad9 depend on the components of the spindle assembly checkpoint.
- **Figure 4 :** (page 160) Rad53 dephosphorylation upon nocodazole treatment is delayed in *pph3Δ* cells.
- **Figure 5 :** (page 161) Nocodazole treatment accelerates Rad53 inactivation after DNA damage.
- **Figure 6 :** (page 162) PPH3 deletion strongly affects Rad53 dephosphorylation after UV irradiation.

#### RÉSULTATS ET DISCUSSION- Checkpoints de l'ADN et checkpoint du fuseau

- **Figure n°M1 :** (pages 163-164) Les modifications de Rad9 et Rad53 induites par le nocodazole dans la littérature.
- **Figure n°M2 :** (page 165) Le doublet de Rad53 n'est pas visible dans des cellules arrêtées en télophase.
- **Figure n°M3 :** (page 171) Influence de l'inhibition de Cdc28 sur la phosphorylation de Rad53 induite par le nocodazole.
- **Figure n°M4 :** (pages 173-174) Les délétions de *RAD9* ou *RAD53* n'induisent pas d'hypersensibilité au bénomyle.
- **Figure n°M5 :** (page 175) *RAD53* n'est pas nécessaire à la mise en place du checkpoint du fuseau.
- **Figure n°M6 :** (page 176) Etude de Pds1 suite à un traitement au nocodazole chez le mutant *rad9Δ*.
- **Figure n°M7 :** (page 179) L'activation du checkpoint du fuseau accélère la désactivation de Rad53 lors d'une irradiation aux UV.
- **Figure n°M8 :** (pages 181-182) Influence d'un traitement au nocodazole sur la réponse à d'autres stress génotoxiques.
- **Figure n°M9 :** (pages 184-185) Influence de différents points d'arrêt du cycle sur la réponse aux UV.
- **Figure n°M10 :** (page 186) Influence de la surexpression de *PDS1-mdb* et du nocodazole sur la réponse aux UV.
- **Figure n°M11 :** (pages 187-188) Influence de la délétion de *PDS1* et du nocodazole sur la réponse aux UV.
- **Figure n°M12 :** (pages 193-194) 53BP1 est localisée au niveau des kinétochores non attachés et est phosphorylée en cas d'activation du checkpoint du fuseau.
- **Figure n°M13 :** (pages 194-195) Modèle d'activation de Chk2 chez les mammifères.
- **Figure n°M14 :** (page 198) Etude de la phosphorylation de Rad53 dans une souche portant la fusion SCC1-TEV après une irradiation UV.
- **Figure n°M15 :** (page 208) Le mutant *pph3Δ* est sensible au bénomyle et à la camptothécine.

## **Article**



# The Spindle Assembly Checkpoint Regulates the Phosphorylation State of a Subset of DNA Checkpoint Proteins in *Saccharomyces cerevisiae*<sup>∇</sup>

Céline Clémenson and Marie-Claude Marsolier-Kergoat\*

Service de Biochimie et de Génétique Moléculaire, CEA/Saclay, 91191 Gif-sur-Yvette, France

Received 20 February 2006/Returned for modification 17 April 2006/Accepted 3 October 2006

**The DNA and the spindle assembly checkpoints play key roles in maintaining genomic integrity by coordinating cell responses to DNA lesions and spindle dysfunctions, respectively. These two surveillance pathways seem to operate mostly independently of one another, and little is known about their potential physiological connections. Here, we show that in *Saccharomyces cerevisiae*, the activation of the spindle assembly checkpoint triggers phosphorylation changes in two components of the DNA checkpoint, Rad53 and Rad9. These modifications are independent of the other DNA checkpoint proteins and are abolished in spindle checkpoint-defective mutants, hinting at specific functions for Rad53 and Rad9 in the spindle damage response. Moreover, we found that after UV irradiation, Rad9 phosphorylation is altered and Rad53 inactivation is accelerated when the spindle checkpoint is activated, which suggests the implication of the spindle checkpoint in the regulation of the DNA damage response.**

The DNA and the spindle assembly checkpoints are surveillance pathways in charge of a common task: the proper transmission of genetic material. This task involves checking for (i) the complete and accurate replication of nuclear DNA, (ii) the absence of DNA lesions, and (iii) the equal repartition of the sister chromatids in the daughter cells. The DNA checkpoints are activated in cases of DNA damage or replication defects. They do not seem to be sensitive to incomplete DNA replication per se but rather to pathological DNA structures resulting from stalled replication forks or DNA lesions. They comprise different proteins able to sense these pathological structures and/or to transduce a signal, mostly via phosphorylation cascades. In *Saccharomyces cerevisiae*, their main components include the kinases Mec1, Tel1, Rad53, Dun1, and Chk1, along with adaptors (Rad9 and Mrc1) mediating their interactions (for a review, see reference 39).

The primary defect that activates the spindle assembly checkpoint remains unclear (48). This checkpoint seems to check for the accurate segregation of the chromatids by monitoring either the attachment of microtubules to kinetochores (the protein complexes that assemble at the centromeres) or the tension that is exerted at kinetochores upon bipolar attachment (for reviews, see references 26, 33, and 43). The spindle assembly checkpoint is thus sensitive to defects altering all aspects of the spindle function. Drugs or mutations affecting microtubule polymerization, spindle pole body duplication, microtubule motors, kinetochore components, or DNA centromeric sequences arrest cells in mitosis by spindle assembly checkpoint-dependent mechanisms or are synthetically lethal with mutations of spindle assembly checkpoint genes (19, 21, 34, 45). Its core components were first identified through ge-

netic screens in yeast (21, 34) and consist of the Mad1, Mad2, Mad3, Bub1, and Bub3 proteins and the Mps1 kinase (70).

The DNA checkpoint can be activated at any point of the cell cycle depending on the nature of DNA lesions and on the phase when DNA damage occurs, whereas the activation of the spindle assembly checkpoint is restricted to G<sub>2</sub>/mitosis (G<sub>2</sub>/M). The two checkpoints have in common the ability to block both the metaphase/anaphase transition and the exit from mitosis. The progression from metaphase to anaphase is triggered by the degradation of the securin Pds1, which depends on the anaphase promoting complex (APC) (for a review, see reference 44). Upon checkpoint activation, Pds1 is stabilized and sequesters the separin Esp1 into an inactive complex, thus precluding the release of the cohesin Mcd1/Scc1 from the chromosomes and sister chromatid separation (2, 3, 14, 50). The stabilization of Pds1 also concurs to inhibit mitotic exit (8, 56, 62). Exit from mitosis is regulated in *S. cerevisiae* by the mitotic exit network (MEN), which includes the phosphatase Cdc14; the kinases Cdc5, Cdc15, Dbf2, and Dbf20; the GTPase Tem1; and the two-component GTPase-activating protein Bub2/Bfa1 (4, 24, 41). The Bub2/Bfa1 complex inhibits Tem1, whose activation promotes APC-dependent destruction of B-type cyclins, activation of the Cdk1 inhibitor Sic1, and mitotic exit (5, 47, 53, 66). *BFA1* and *BUB2* are required to prevent mitotic exit after activation of the DNA or the spindle assembly checkpoints (21, 67).

Whereas the DNA checkpoint was characterized from the beginning as a pathway responding to DNA damage (69), the fact that the spindle assembly checkpoint contributes to the cell response to DNA damage and replication defect was only lately acknowledged. Stern and Murray have elegantly demonstrated that Pds1 is stabilized in a Mad2-dependent manner in a *cdc6* mutant undergoing anaphase without prior DNA replication (57), which suggests that the spindle assembly checkpoint can respond to the lack of tension at kinetochores induced by defective DNA replication. Mutations in centromeric

\* Corresponding author. Mailing address: Service de Biochimie et de Génétique Moléculaire, CEA/Saclay, 91191 Gif-sur-Yvette, France. Phone: 00-33-1-69-08-83-54. Fax: 00-33-1-69-08-47-12. E-mail: mcmk@cea.fr.

<sup>∇</sup> Published ahead of print on 23 October 2006.

DNA that impair kinetochore attachment were shown to induce a spindle assembly checkpoint-dependent mitotic delay (45, 55), which suggested that lesions affecting centromeric DNA could also be detected by the spindle assembly checkpoint via their effects on kinetochore structure. Several studies have subsequently shown that the spindle assembly checkpoint is involved in cell cycle arrest following DNA damage in yeast, *Drosophila*, and mammalian cells (7, 10, 13, 15, 36, 40, 49, 58). Thus, Collura et al. have demonstrated that in *Schizosaccharomyces pombe*, the Chk1 pathway causes a Mad2-dependent delay at the metaphase-to-anaphase transition, when cells enter mitosis after camptothecin treatment (10). In budding yeast cells with a defective DNA checkpoint, Mad2 contributes to the residual G<sub>2</sub>/M arrests induced by the DNA-alkylating agent methyl methanesulfonate or by mutations in genes encoding DNA polymerase subunits or components of the pre-replicative complex (15). Similarly, Clerici et al. have shown that the absence of Mad2 results in advanced nuclear division of *rad53Δ chk1Δ* cells and in a partial suppression of the metaphase arrest of *mec1Δ* cells after UV irradiation (7). In *S. cerevisiae*, Mad2 seems to have an effect on the DNA damage response mostly in the absence of a functional DNA checkpoint and therefore independently from it. Mad2 influences in cases of DNA damage could be explained in two ways. First, the spindle assembly checkpoint could be activated as a consequence of DNA lesions (DNA lesions affecting centromeric sequences could lead to defective kinetochore structures, or DNA damage could prevent replication of the centromeres). Second, Mad2 could have a constitutive, inhibitory activity regarding the APC that would be efficiently offset by APC activation during an unperturbed cell cycle but not after DNA damage, even in the absence of core components of the DNA checkpoint. In the latter case, the deletion of *MAD2* would suppress Mad2-constitutive inhibition of the APC and the G<sub>2</sub>/M arrest observed in DNA checkpoint-deficient cells upon DNA damage. However, this hypothesis implies that DNA lesions affect APC activation independently of the known components of the DNA checkpoint, so it appears more logical to presume that the spindle assembly checkpoint is activated as a result of DNA lesions. This assumption is also in agreement with observations made for mammalian and in *Drosophila* cells (40, 49).

Reciprocally, several studies have demonstrated strong connections between the DNA checkpoint and the spindle apparatus. In syncytial *Drosophila* embryos, DmChk2 (the Rad53 homolog in *Drosophila melanogaster*) localizes to centrosomes and spindle microtubules. Furthermore, localization of DmChk2 to these structures increases upon DNA damage and a DmChk2-dependent pathway disrupts spindle assembly and chromosome segregation in response to DNA lesions, eliminating defective nuclei from the embryonic precursor pool (61). Similarly, subpopulations of Chk2 phosphorylated at Thr-68 and Thr-26 or Ser-28 localize to centrosomes throughout the cell cycle and to midbodies in human cells in the absence of DNA damage and independently of ATM, the human homolog of Mec1/Tel1 (63). 53BP1, presumably a mammalian homolog of Rad9, localizes to kinetochores specifically in mitotic cells and is hyperphosphorylated during mitosis under conditions where the spindle checkpoint is activated (25). This observation also suggests cross talks between the DNA and the spindle checkpoint

in mammalian cells. ATM was shown to be involved in centrosome amplification induced by DNA damage in chicken DT40 cells (12). This mechanism was interpreted as promoting mitotic catastrophe and ensuring the death of cells evading the DNA checkpoint. Finally, Krishnan and collaborators have demonstrated that in budding yeast, Rad53- and Mec1-dependent pathways directly modulate spindle dynamics in response to stalled replication forks by controlling the levels of microtubule-associated proteins (29). These examples show that in many cases, proteins of the DNA checkpoint colocalize with or can act on spindle components.

Both the DNA and the spindle assembly checkpoints thus seem able to detect DNA damage and replication defects by monitoring distinct parameters (the presence of pathological DNA structures and the absence of bipolar attachment, respectively), both checkpoints, when activated, block the metaphase/anaphase transition and the mitotic exit, and both checkpoints have physiological connections with the spindle apparatus. Given these common features, interregulations of the DNA and the spindle assembly checkpoint were conceivable. Here, we show that the activation of the spindle assembly checkpoint induces changes in Rad53 and Rad9 phosphorylation states. These modifications are independent of all the DNA checkpoint proteins that we tested and are abolished by the deletion of *MAD2*, which suggests that Rad53 and Rad9 could perform specific functions in the spindle damage response. We tested whether the influence of the spindle assembly checkpoint on the phosphorylation states of Rad9 and Rad53 could play a part in the DNA damage response, and we found that in cases of DNA damage, spindle checkpoint activation modifies the phosphorylation of Rad9 and significantly accelerates the inactivation of Rad53.

## MATERIALS AND METHODS

**Strains, plasmids, and media.** Strains used in this study are listed in Table 1. All strains (except MCM336 and L208) are congenic with YPH499 (54). Standard molecular biology and molecular genetic techniques, such as gene disruption, tetrad dissection, and PCR-based tagging or disruption of chromosomal genes, were used to construct the strains. PCR-based genotyping was used to confirm gene disruption. The *mps1-1* strain L300 was obtained by crossing L125 (as YPH500, *bar1Δ::LEU2 RAD9-myc::his5<sup>+</sup>*) with strain 290 (*MATa ura3-52 his3-Δ200 trp1-Δ1 mps1-1*), kindly provided by Mark Winey. Further details are available upon request.

p416GAL1/MPS1, a *URA3*-marked, centromeric plasmid harboring the *MPS1* gene under the control of a galactose-inducible promoter, was constructed by cloning the PCR-amplified coding sequence of *MPS1* into the XmaI and XhoI sites of the p416GAL1 vector (42). pBAD70 is a generous gift from Steve Elledge and is described in reference 11. The pOC57-HA plasmid (*CEN URA3 pGAL1-pds1-mdb-HA*), described in reference 1, was kindly provided by Orna Cohen-Fix.

Yeast cells were grown in YP medium (1% yeast extract, 2% Bacto peptone) supplemented with 2% glucose unless indicated otherwise. For the overexpression of *MPS1* and *pds1-mdb*, cells were grown in selective medium containing 2% raffinose or in YP medium supplemented with 2% galactose.

**Other techniques.** Nocodazole and  $\alpha$ -factor were used at final concentrations of 15  $\mu$ g/ml and 0.5  $\mu$ M, respectively. Analysis of Rad53 and Rad9 phosphorylation was performed as described previously (31, 37), except that gels were run for a longer time in order to clearly observe Rad53 nocodazole-induced modification. The in situ Rad53 autophosphorylation assay was carried out as described in reference 46.

For flow cytometric DNA analysis, cells were fixed in 70% ethanol-30% 1 M sorbitol. Cells were then washed in phosphate-buffered saline (PBS; Sigma), incubated with 0.25 mg/ml RNase for 1 hour at 50°C, washed again, and resuspended in PBS containing 50  $\mu$ g/ml propidium iodide. Cells were diluted 1:10 into PBS, and DNA analysis was performed on a Becton Dickinson FACSscan.

For the Rad53 dephosphorylation assay, total protein extracts (about 20  $\mu$ g

TABLE 1. Yeast strains used in this study

Strain	Genotype	Source or reference
MCM001 (YPH499)	<i>MATa ura3-52 lys2-801 ade2-101 trp1-Δ63 his3-Δ200 leu2-Δ1</i>	54
MCM181	<i>rad17Δ::kanMX<sup>a</sup></i>	This study
MCM182	<i>mec1Δ::HIS3 + pBAD70 (2μm TRP1 RNR1)<sup>a</sup></i>	This study
MCM185	<i>bar1Δ::LEU2<sup>a</sup></i>	32
MCM215	<i>bar1Δ::LEU2 rad9Δ::kanMX<sup>a</sup></i>	32
MCM275	<i>rad17Δ::kanMX rad9Δ::KIURA3<sup>a</sup></i>	This study
MCM403	<i>bar1Δ::LEU2 RAD9-myc::his5<sup>+</sup><sup>a</sup></i>	This study
L48	<i>bar1Δ::LEU2 mad2Δ::kanMX<sup>a</sup></i>	This study
L183	<i>bar1Δ::LEU2 mad2Δ::his5<sup>+</sup><sup>a</sup></i>	This study
L78	<i>bar1Δ::LEU2 RAD9-myc::his5<sup>+</sup> mad2Δ::kanMX<sup>a</sup></i>	This study
L108	<i>bar1Δ::LEU2 RAD9-myc::his5<sup>+</sup> bub2Δ::kanMX<sup>a</sup></i>	This study
L138	<i>Matα bar1Δ::LEU2 RAD9-myc::his5<sup>+</sup> mec1Δ::HIS3 tel1Δ::KIURA3 + pBAD70 (2μm TRP1 RNR1)<sup>a</sup></i>	This study
L140	<i>bar1Δ::LEU2 RAD9-myc::his5<sup>+</sup> mec1Δ::HIS3 tel1Δ::KIURA3 + pBAD70 (2μm TRP1 RNR1)<sup>a</sup></i>	This study
L141	<i>bar1Δ::LEU2 RAD9-myc::his5<sup>+</sup> mec1Δ::HIS3 + pBAD70 (2μm TRP1 RNR1)<sup>a</sup></i>	This study
L145	<i>bar1Δ::LEU2 rad53Δ::kanMX RAD9-myc::his5<sup>+</sup> + pBAD70 (2μm TRP1 RNR1)<sup>a</sup></i>	This study
L149	<i>bar1Δ::LEU2 RAD9-myc::his5<sup>+</sup> tel1Δ::KIURA3<sup>a</sup></i>	This study
L153	<i>bar1Δ::LEU2 rad53Δ::kanMX + pBAD70 (2μm TRP1 RNR1)<sup>a</sup></i>	This study
L305	<i>bar1Δ::LEU2 rad53Δ::kanMX + pBAD70 (2μm TRP1 RNR1)<sup>a</sup></i>	This study
L157	<i>bar1Δ::LEU2 rad9Δ::kanMX<sup>a</sup></i>	This study
L256	<i>bar1Δ::LEU2 rad9Δ::kanMX<sup>a</sup></i>	This study
L199	<i>bar1Δ::LEU2 pds1Δ::KIURA3<sup>a</sup></i>	This study
L241	<i>bar1Δ::LEU2 bub1Δ::kanMX<sup>a</sup></i>	This study
L281	<i>bar1Δ::LEU2 ptc2Δ::KIURA3 ptc3Δ::kanMX<sup>a</sup></i>	This study
L286	<i>bar1Δ::LEU2 mec1Δ::HIS3 tel1Δ::KIURA3 sml1Δ::kanMX<sup>a</sup></i>	This study
L289	<i>bar1Δ::LEU2 pph3Δ::KIURA3<sup>a</sup></i>	This study
L300	<i>mps1-1 bar1Δ::TRP1 RAD9-myc::his5<sup>+</sup></i>	This study
L208	<i>MATa can1-100 ade2-1 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 bar1Δ::TRP1</i>	This study
MCM336 (JKM139)	<i>MATa hoΔ hmlΔ::ADE1 hmrΔ::ADE1 ade3::pGAL-HO lys5 leu2-3,112 ura3-52 trp1::hisG</i>	30

<sup>a</sup> As YPH499.

proteins) were incubated at 37°C for 1 hour in the presence of 10 units of calf intestine phosphatase (Biolabs) according to the manufacturer's instructions and in the presence or absence of a set of phosphatase inhibitors (1 mM sodium orthovanadate, 1.5 mM *p*-nitrophenyl phosphate, 5 mM beta-glycerophosphate).

The amount of cyclobutane pyrimidine dimers after UV irradiation was assessed as follows. Genomic DNA (0.2 μg) was slot blotted onto a nylon transfer membrane (Hybond N+, Amersham). Thymidine dimers were detected with the TDM-2 monoclonal antibody (MBL) as the primary antibody and with anti-mouse antibody (Promega) as the secondary antibody. The blot was revealed by chemiluminescence (Amersham).

## RESULTS

**Activation of the spindle assembly checkpoint triggers changes in the phosphorylation states of Rad53 and Rad9 that do not occur during an unperturbed cell cycle.** The core components of the budding yeast DNA checkpoint include the phosphatidylinositol 3-kinase-related protein kinases Mec1 and Tel1 and two central transducers, the Chk1 and Rad53 kinases, that phosphorylate downstream effectors. Chk1 and Rad53 themselves get phosphorylated upon activation of the DNA checkpoint, and their phosphorylation states, detected as electrophoretic mobility shifts, are commonly used as markers to monitor the activation of this transduction pathway. The phosphorylations of Chk1 and Rad53 depend on Mec1 and Tel1 and also on so-called "adaptors," Rad9 in cases of DNA damage and Mrc1 in cases of replication blocks and DNA lesions during S phase. When DNA damage occurs, Rad9 also becomes highly phosphorylated on putative Mec1 consensus sites (52, 59, 65).

In order to reveal a potential influence of the spindle assembly checkpoint on the DNA checkpoint, we analyzed the elec-

trophoretic behaviors of Rad53, Chk1, and Rad9 upon nocodazole treatment. Nocodazole is a microtubule-depolymerizing chemical that binds to β-tubulin with high affinity. Nocodazole treatment activates the spindle assembly checkpoint but has not been reported to have any DNA-damaging effect. As shown in Fig. 1A, nocodazole treatment of exponentially growing cells led to modifications in the electrophoretic mobilities of Rad53 and Rad9. These modifications became visible after 1 hour of nocodazole treatment, at the time when cells were mostly synchronized in G<sub>2</sub>/M phase. Rad53 then appeared as a doublet while Rad9 forms were completely shifted upwards. In contrast, Chk1 migration seemed unaltered by nocodazole treatment (data not shown), which does not rule out the possibility that some nocodazole-induced modifications of Chk1 could be undetected by our electrophoretic assay.

A modification of Rad9 electrophoretic mobility upon nocodazole treatment has been reported by Vialard et al., who have demonstrated that it corresponds to a phosphorylation change (65). This phosphorylated state of Rad9 was considered (without further examination) a G<sub>2</sub>/M phase-specific alteration, independent of the nocodazole treatment that was then used to synchronize the cells (65). In contrast, when we analyzed α-factor-synchronized cells progressing through an entire cycle, we found that Rad9 and Rad53 nocodazole-induced modifications do not occur during an unperturbed cell cycle (Fig. 1B).

In order to exclude the possibility of previously unnoticed DNA-damaging effects of nocodazole, we artificially activated the spindle assembly checkpoint by overexpressing Mps1, an essential kinase required for spindle function (20, 70). Wild-type cells were grown overnight on raffinose medium and syn-

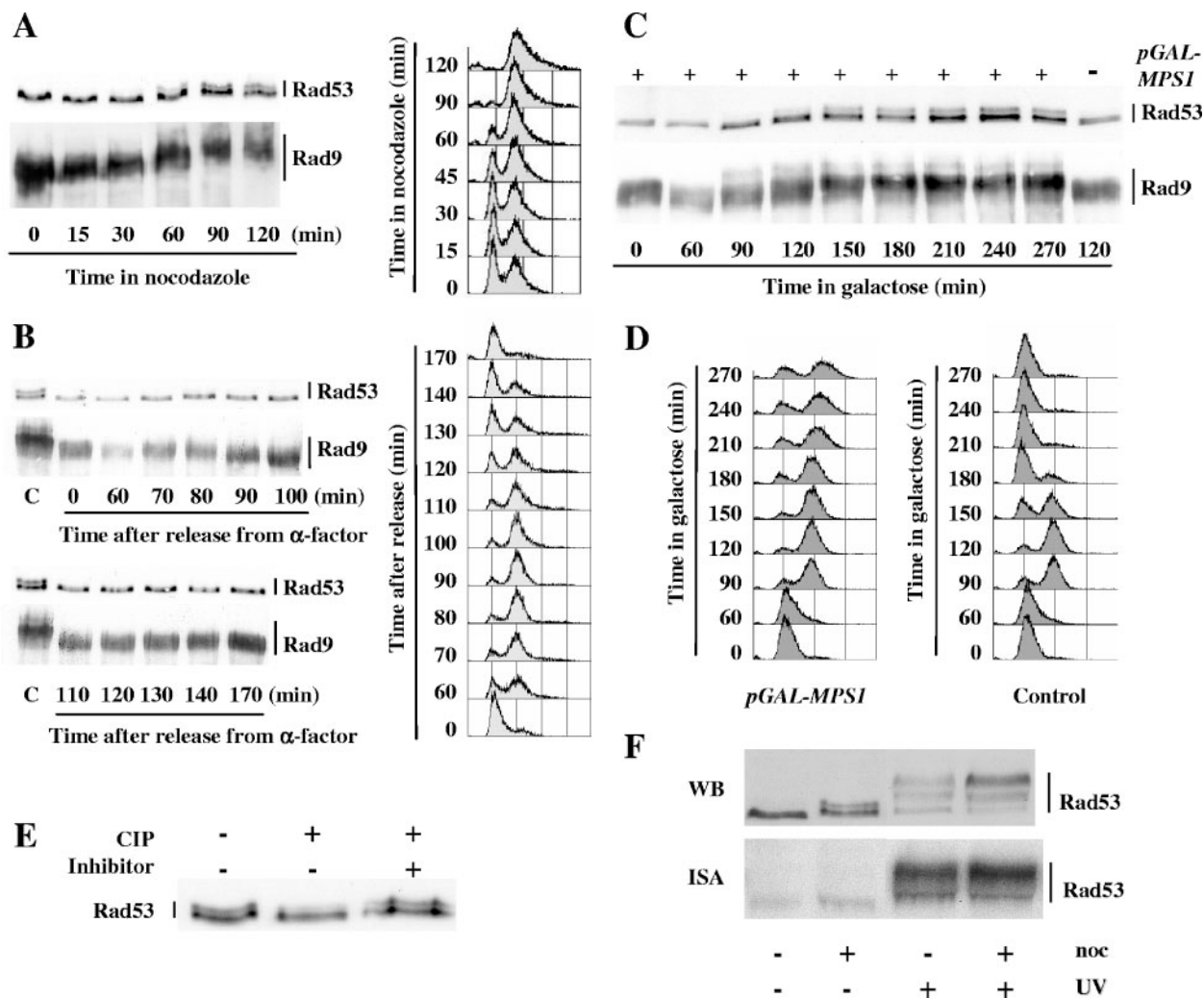


FIG. 1. Activation of the spindle assembly checkpoint triggers changes in the phosphorylation states of Rad53 and Rad9. (A) Nocodazole (15  $\mu$ g/ml) was added at time zero to an asynchronous culture of wild-type cells containing a *RAD9::myc* allele (MCM403). Aliquots were taken at the indicated times after addition of nocodazole and analyzed by FACS and by Western blotting using anti-Rad53 and anti-myc antibodies. (B) Exponentially growing wild-type cells harboring a *RAD9::myc* allele (MCM403) were synchronized in  $G_1$  phase with  $\alpha$ -factor, washed thrice, and released into fresh medium. When the majority of the cells had rebudded after release,  $\alpha$ -factor was added back to the culture to prevent a second cell cycle. Samples were collected at the indicated times after release from the  $\alpha$ -factor block and analyzed as described above by FACS and by Western blotting. Lanes C, extracts from MCM403 cells after a 2-hour nocodazole treatment. (C and D) Wild-type cells harboring a *RAD9::myc* allele (MCM403) and containing either the empty vector p416GAL1 (Control) or the p416GAL1/*MPS1* plasmid expressing *MPS1* under the control of a galactose-inducible promoter were grown to the exponential phase in raffinose medium, synchronized in  $G_1$  with  $\alpha$ -factor, washed thrice, and resuspended at time zero in galactose medium to induce *MPS1* expression. At 135 min,  $\alpha$ -factor was added back to the culture to prevent extra cell cycling. Aliquots were taken at the indicated times after galactose induction and analyzed by Western blotting (C) and by FACS (D) as described above. (E) Western blot analysis of total protein extracts from nocodazole-treated wild-type cells (MCM336) incubated in the presence (+) or absence (-) of calf intestine phosphatase (CIP) and in the presence (+) or absence (-) of phosphatase inhibitors. (F) Wild-type cells (MCM185) either treated with nocodazole (noc; 15  $\mu$ g/ml) for 90 min or left untreated were either immediately collected or UV irradiated (40 J/m<sup>2</sup>) and subsequently harvested. Whole-cell extracts were then analyzed by Western blotting (WB), and Rad53 autophosphorylation activity was assessed by an in situ renaturation assay (ISA).

chronized with  $\alpha$ -factor, and *Mps1* overexpression was induced from a pGAL-*MPS1* construct by addition of galactose. As shown in Fig. 1C and D, electrophoretic mobility changes for Rad53 and Rad9 similar to the ones observed after nocodazole treatment appeared about 2 h after galactose addition, at the time when most cells were in  $G_2/M$ .

We investigated the nature and activity of the modified form of Rad53 induced by nocodazole treatment. Incubating protein extract from nocodazole-treated wild-type cells with calf intes-

tine phosphatase resulted in the disappearance of the slower-migrating form of Rad53, establishing that it corresponds to a phosphorylation variant (Fig. 1E). Upon DNA damage, a large proportion of Rad53 phosphorylation changes are due to the autophosphorylation activity of Rad53 (46). In contrast, an in situ assay revealed similar, low autophosphorylation activities for Rad53 with or without nocodazole treatment (Fig. 1F). Figure 1F also illustrates that the modification of Rad53 induced by nocodazole treatment is quite different from the ones

observed after DNA damage. Vialard and collaborators have also reported differences in Rad9 phosphorylations resulting from nocodazole treatment or UV irradiation (65).

**Nocodazole-induced phosphorylations of Rad53 and Rad9 are independent of other components of the DNA checkpoints.** Rad17, Rad9, Tel1, and the Mec1/Ddc2 complex are upstream components of the DNA checkpoint that are required for maximal phosphorylation of Rad53 after DNA damage. Mec1/Ddc2 has a predominant function in the *S. cerevisiae* DNA checkpoint and has been proposed to detect processed DNA lesions via an interaction with replication protein A-coated single-strand DNA (71). Tel1 plays only a minor part in the budding yeast DNA checkpoint, and its functions, mostly redundant with those of Mec1/Ddc2, appear only in the absence of Mec1 (7, 51, 64). Rad17 is part of the Rad17/Mec3/Ddc1 complex, which presents structural similarities to PCNA and is loaded onto DNA double-strand breaks (DSBs), and presumably other kinds of DNA lesions, independently of Mec1 (for a review, see reference 39). It is generally assumed that the Rad17/Mec3/Ddc1 complex is involved in the activation of Mec1 at the sites of DNA lesions. As previously stated, Rad9 is an activator of Rad53. Upon DNA damage, Rad9 becomes highly phosphorylated in a Mec1/Tel1-dependent way, which triggers its binding to Rad53 via Rad53 FHA (forkhead-associated) domains (52, 59, 65). The resulting increase in the local Rad53 concentration on the Rad9 surface has been proposed to induce *trans* autophosphorylation and catalytic activation of Rad53 (17). Sweeney and collaborators also recently proposed that binding of Rad53 to Rad9 promotes recruitment of Rad53 to DNA lesions and its direct phosphorylation by Mec1, which would contribute to Rad53 activation and subsequent autophosphorylation (60).

Whereas the absence of *RAD17*, *RAD9*, or *MEC1* severely affects Rad53 phosphorylation after DNA damage (see, for example, reference 65), the phosphorylation of Rad53 after a 2-hour nocodazole treatment was similar in wild-type cells and in *rad9Δ*, *rad17Δ*, *rad9Δ rad17Δ*, *mec1Δ*, *tel1Δ*, and *mec1Δ tel1Δ* mutants (Fig. 2A). The effector kinase Chk1 functions in parallel with Rad53 and does not influence Rad53 phosphorylation upon DNA damage (50). We found that the nocodazole-induced phosphorylation of Rad53 was also independent of *CHK1* (data not shown). Since Rad53 phosphorylation upon DNA damage is completely abolished in *mec1Δ tel1Δ* cells, we analyzed more thoroughly nocodazole-induced Rad53 phosphorylation in these cells. Exponentially growing wild-type and *mec1Δ tel1Δ* cells were synchronized in G<sub>1</sub> with  $\alpha$ -factor and subsequently released into nocodazole-containing medium. As shown in Fig. 3A, Rad53 phosphorylation appeared in wild-type cells about 90 min after release from  $\alpha$ -factor arrest and was maintained until the end of the experiment. We confirmed that Rad53 phosphorylation in *mec1Δ tel1Δ* mutants was comparable to that in the wild type.

Upon DNA damage, Rad9 becomes phosphorylated in a Mec1/Tel1-dependent but Rad53-independent manner (65). In contrast, we found that the phosphorylation states of Rad9 after 2-hour nocodazole treatments were similar in wild-type cells and in *mec1Δ*, *tel1Δ*, and *mec1Δ tel1Δ* mutants (Fig. 2B).

In conclusion, we have shown that the phosphorylations of Rad53 and Rad9 after nocodazole treatment are independent of the major components of the DNA damage checkpoint.

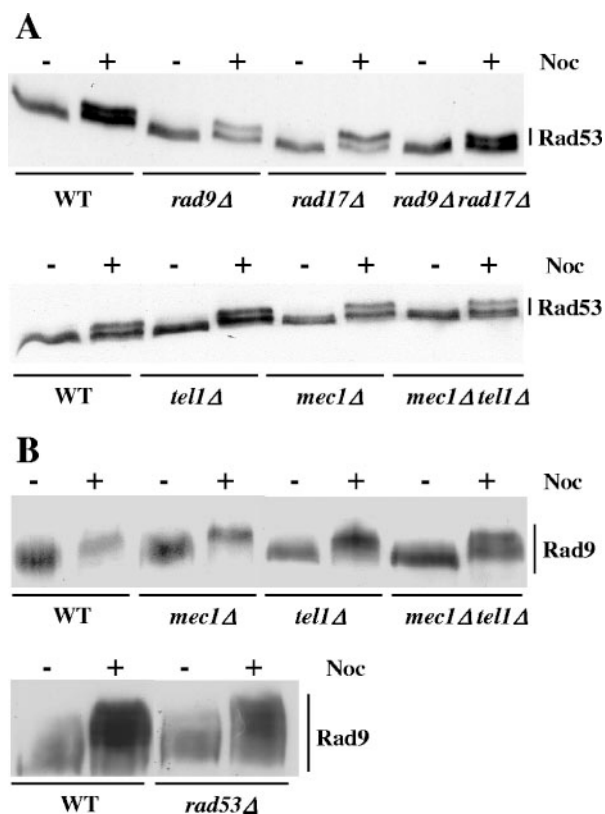


FIG. 2. Nocodazole-induced phosphorylations of Rad53 and Rad9 are independent of other components of the DNA checkpoints. (A) Asynchronous cultures of wild-type (WT) (MCM001) and *rad9Δ* (MCM215), *rad17Δ* (MCM181), *rad9Δ rad17Δ* (MCM275), *mec1Δ* (L141), *tel1Δ* (L149), and *mec1Δ tel1Δ* (L140) mutant strains were collected before (-) or after (+) a 2-h treatment with nocodazole (Noc; 15  $\mu$ g/ml). Total protein extracts were analyzed by Western blotting using anti-Rad53 antibodies. (B) Asynchronous cultures of wild-type (MCM403) and *mec1Δ* (L141), *tel1Δ* (L149), *mec1Δ tel1Δ* (L138), and *rad53Δ* (L145) mutant strains harboring the *RAD9::myc* allele were harvested before (-) or after (+) a 2-h treatment with nocodazole (Noc; 15  $\mu$ g/ml). Total protein extracts were analyzed by Western blotting using anti-myc antibodies.

Interestingly, Rad9, although strongly phosphorylated, is not required for nocodazole-induced Rad53 modification, and Rad9 phosphorylation does not bring about a hyperphosphorylated state for Rad53 comparable to the one observed after DNA damage.

**Nocodazole-induced phosphorylations of Rad53 and Rad9 depend on the components of the spindle assembly checkpoint.**

Nocodazole-induced Rad53 phosphorylation in mutants affected in components of the spindle assembly checkpoint (*mad2Δ* and *bub1Δ*) or in the MEN pathway (*bub2Δ*) was analyzed as described above. Wild-type, *mad2Δ*, *bub1Δ*, and *bub2Δ* cells were synchronized with  $\alpha$ -factor and released into nocodazole-containing medium. As shown in Fig. 3A, *mad2Δ* and *bub1Δ* cells, although momentarily arrested in G<sub>2</sub>/M by nocodazole (Fig. 3B), were completely defective in inducing Rad53 phosphorylation change. Nocodazole-induced Rad53 phosphorylation in *bub2Δ* mutants appeared at the same time as that in wild-type cells but was more transient and disappeared about 180 min after release from  $\alpha$ -factor arrest, at the



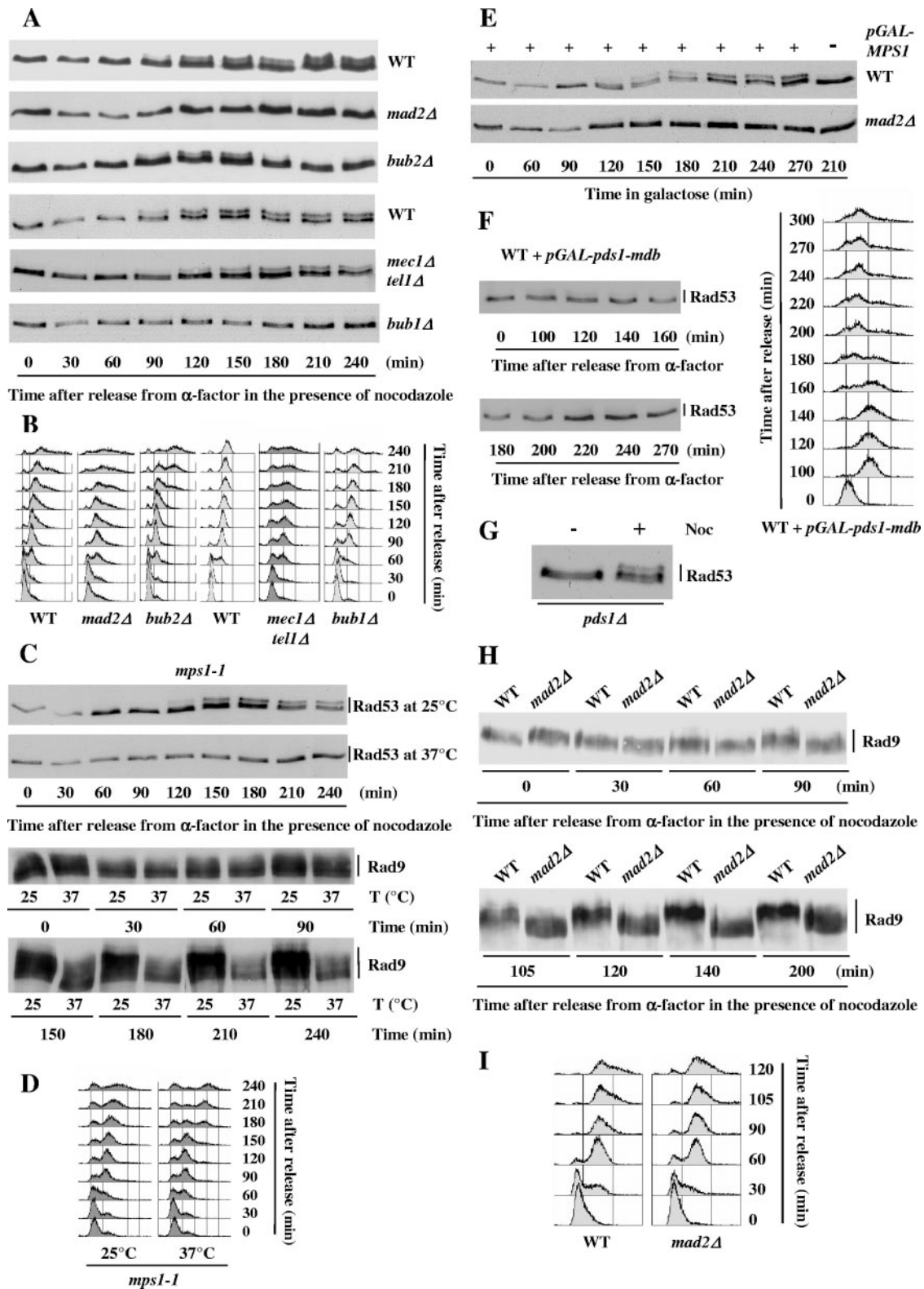


FIG. 3. Nocodazole-induced phosphorylations of Rad53 and Rad9 depend on the components of the spindle assembly checkpoint. (A and B) Wild-type (WT) (MCM185) and *mad2Δ* (L78), *bub1Δ* (L241), *bub2Δ* (L108), and *mec1Δ tel1Δ* (L286) mutant cells were arrested in G<sub>1</sub> with  $\alpha$ -factor, washed thrice, and released into nocodazole-containing medium. Cell aliquots were taken at the indicated times after release from the  $\alpha$ -factor block and analyzed by Western blotting using anti-Rad53 antibodies (A) and by FACS (B). (C and D) *mps1-1* (L300) cells were synchronized in G<sub>1</sub> with  $\alpha$ -factor at the permissive temperature (25°C), washed thrice, and released into nocodazole-containing medium at either the permissive (25°C) or the restrictive (37°C) temperature. Cell aliquots were taken at the indicated times after release from the  $\alpha$ -factor block and analyzed by Western blotting (C) and by FACS (D). (E) Wild-type (MCM403) and *mad2Δ* (L78) cells containing the p416GAL1/MPS1

time when cells were escaping the mitotic arrest (Fig. 3B). The disappearance of phosphorylated forms of Rad53 was most probably due to exit from anaphase. Indeed, we found that the Rad53 phosphorylation state was unaffected when *cdc15-2* mutants blocked in telophase at the restrictive temperature were treated with nocodazole (data not shown).

The spindle checkpoint kinase Mps1 could conceivably phosphorylate Rad53 upon nocodazole treatment. We thus tested whether nocodazole-induced Rad53 phosphorylation was dependent upon Mps1 functionality. *mps1-1* cells were synchronized with  $\alpha$ -factor at the permissive temperature and released into nocodazole-containing medium at the permissive (25°C) or restrictive (37°C) temperature. As shown in Fig. 3C, *mps1-1* cells were completely defective in inducing Rad53 phosphorylation change at the restrictive temperature, although they were transiently delayed in G<sub>2</sub>/M (Fig. 3D). If Rad53 were a direct substrate of Mps1, one could expect that Rad53 phosphorylation induced by *MPS1* overexpression should be independent of the other spindle checkpoint proteins. However, we found that *mad2Δ* cells were defective in inducing Rad53 phosphorylation change upon *MPS1* overexpression (Fig. 3E). Although we cannot rule out the hypothesis that a Mad2-dependent modification of Mps1 could be required for Mps1 activity toward Rad53, this result suggests that Rad53 is not a direct substrate of Mps1.

We have thus shown that the Rad53 phosphorylation changes observed upon nocodazole treatment or Mps1 overexpression depend on spindle assembly checkpoint components but are independent of the MEN protein Bub2. To further test the hypothesis that Rad53 modification results directly from spindle checkpoint activation and is not the indirect consequence of a persistent cell cycle arrest, we verified that a spindle checkpoint-independent G<sub>2</sub>/M arrest induced by the overexpression of an indestructible form of Pds1, Pds1-*mdb* (9), did not bring about similar changes in Rad53 electrophoretic mobility (Fig. 3F). We also observed that Pds1 is not required for Rad53 nocodazole-induced modification (Fig. 3G). Taken together, our data indicate that Rad53 modification upon nocodazole treatment is strictly dependent on and specific to the activation of the spindle assembly checkpoint.

Similar experiments showed that, whereas Rad9 phosphorylation appeared in wild-type cells about 90 min after the cells were released from  $\alpha$ -factor arrest into the nocodazole-containing medium and was maintained until the end of the experiment, *mad2Δ* cells were completely defective in inducing Rad9 phosphorylation in response to nocodazole (Fig. 3H and I). The fact that Rad53 and Rad9 are not modified upon

nocodazole treatment in *mad2Δ* cells also confirmed our previous observations that the nocodazole-induced modifications of Rad53 and Rad9 do not occur during an unperturbed cell cycle, in the absence of spindle checkpoint activation (Fig. 1B).

**The Pph3 phosphatase modulates Rad53 nocodazole-induced phosphorylation.** Three phosphatases have been shown to regulate the Rad53 phosphorylation state upon DNA damage. Leroy et al. have provided evidence that the PP2C phosphatases Ptc2 and Ptc3 bind the Rad53 FHA1 domain and directly dephosphorylate Rad53 after an HO-induced DSB (31). More recently, Keogh et al. have demonstrated that a three-protein complex including the Pph3 phosphatase dephosphorylates histone H2A, whose phosphorylation on Ser-129 is an early mark of DSB (27). They also showed that Pph3 indirectly affects Rad53 phosphorylation, as Rad53 inactivation following an HO-induced DSB is strongly delayed in *pph3Δ* cells in a way that is dependent on histone H2A Ser-129.

To test the potential regulation of Rad53 nocodazole-induced phosphorylation by Ptc2, Ptc3, and Pph3, we analyzed the reversion of Rad53 phosphorylation in wild-type, *ptc2Δ ptc3Δ*, and *pph3Δ* cells after nocodazole treatment. Wild-type and mutant cells were treated with nocodazole for 2.5 h and subsequently released from nocodazole arrest. We found that in wild-type and *ptc2Δ ptc3Δ* cells, nocodazole-induced Rad53 phosphorylation disappeared about 90 min after release but persisted, although diminished, in *pph3Δ* cells until the end of the experiment (Fig. 4A). Fluorescence-activated cell sorter (FACS) analysis showed that the wild-type, *ptc2Δ ptc3Δ*, and *pph3Δ* cells exited G<sub>2</sub>/M arrest with similar kinetics, ruling out the possibility of cell cycle effects on Rad53 phosphorylation (Fig. 4B). Since, to our knowledge, nocodazole treatment has never been described as inducing histone H2A phosphorylation, our data suggest that Rad53 might be a direct substrate of Pph3 upon spindle checkpoint activation.

**Rad53 inactivation after DNA damage is accelerated when the spindle checkpoint is activated.** Having established that the activation of the spindle assembly checkpoint can modify the phosphorylation of a subset of DNA checkpoint proteins, we looked for the physiological functions of these modifications. We envisioned two hypotheses: (i) since the spindle assembly checkpoint seems to respond to some kinds of DNA damage (either directly affecting the DNA centromeric sequence or indirectly resulting in the lack of centromeric sequence replication), its activation under genotoxic conditions could represent an extra way to monitor the extent of DNA damage and to finely tune the DNA damage response by modifying the phosphorylation states of Rad9 and Rad53, and (ii) Rad53 and

---

plasmid expressing *MPS1* under the control of a galactose-inducible promoter were grown to the exponential phase in raffinose medium, synchronized in G<sub>1</sub> with  $\alpha$ -factor, washed thrice, and resuspended at time zero in galactose medium to induce *MPS1* expression. At 135 min,  $\alpha$ -factor was added back to the culture to prevent extra cell cycling. Rad53 phosphorylation was analyzed by Western blotting using anti-Rad53 antibodies. (F) Wild-type (L208) cells containing the pOC57-HA plasmid expressing *pds1-mdb* under the control of a galactose-inducible promoter were grown to the exponential phase in raffinose medium, synchronized in G<sub>1</sub> with  $\alpha$ -factor, washed thrice, and resuspended at time zero in galactose medium to induce *pds1-mdb* expression. At 100 min,  $\alpha$ -factor was added back to the culture to prevent extra cell cycling. Rad53 phosphorylation was analyzed by Western blotting using anti-Rad53 antibodies. (G) An asynchronous culture of *pds1Δ* (L199) cells was collected before (-) or after (+) a 3-h treatment with nocodazole (Noc; 15  $\mu$ g/ml). Total protein extracts were analyzed by Western blotting using anti-Rad53 antibodies. (H and I) Wild-type (MCM403) and *mad2Δ* (L78) mutant cells carrying the *RAD9::myc* allele were arrested in G<sub>1</sub> with  $\alpha$ -factor, washed thrice, and released into nocodazole-containing medium. Samples were retrieved at the indicated times after release from the  $\alpha$ -factor block and analyzed by Western blotting using anti-myc antibodies (H) and by FACS (I).

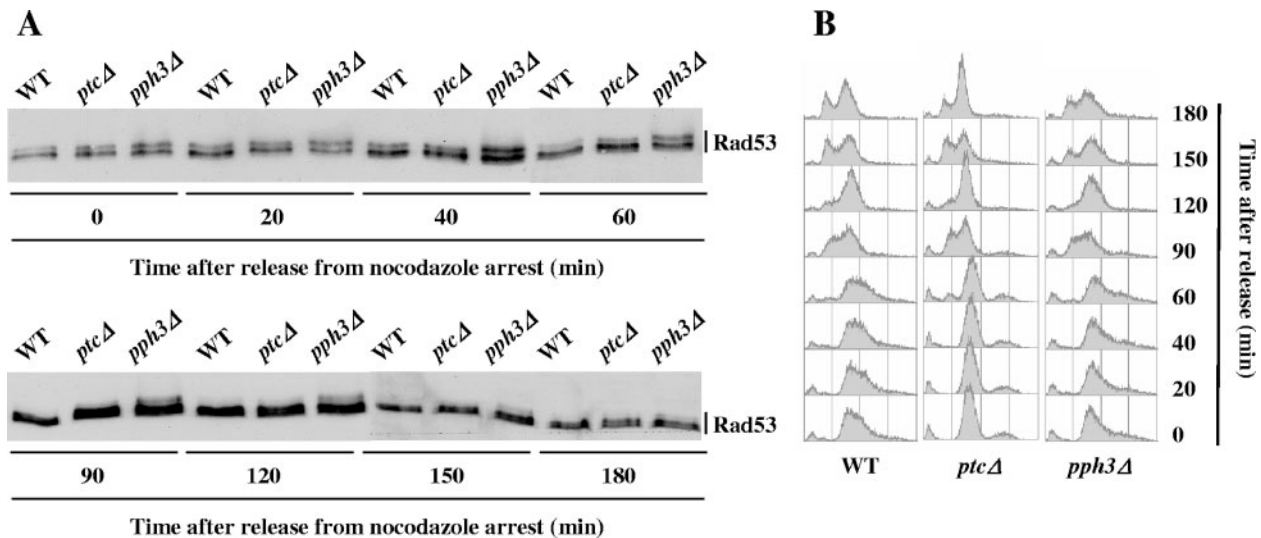


FIG. 4. Rad53 dephosphorylation upon nocodazole treatment is delayed in *pph3Δ* cells. Asynchronous cultures of wild-type (WT) (MCM185) and *ptc2Δ ptc3Δ* (*ptcΔ*, L281) and *pph3Δ* (L289) mutant strains were treated with nocodazole for 2.5 h and subsequently released from nocodazole arrest at time zero. Aliquots were harvested at the indicated time points and analyzed by Western blotting using anti-Rad53 antibodies (A) and by FACS (B).

Rad9 could be involved in some aspect of the spindle damage response.

In order to explore the first hypothesis, asynchronous cultures of wild-type and *mad2Δ* cells were synchronized in  $G_1$  by  $\alpha$ -factor treatment, released into S phase, and submitted to UV irradiation when cells were in  $G_2/M$ . We found no reproducible difference between the kinetics of Rad53 and Rad9 phosphorylation in wild-type and in *mad2Δ* cells in response to UV irradiation (Fig. 5A), confirming previous observations on UV-irradiated, synchronized wild-type and *mad2Δ* cells (7). The kinds of DNA lesions that activate the spindle checkpoint in *S. cerevisiae* are not well known, so in order to get the spindle checkpoint unequivocally activated in the presence of DNA damage, we pretreated wild-type and *mad2Δ* cells with nocodazole. Nocodazole-treated wild-type and *mad2Δ* cells were thus UV irradiated and further grown in nocodazole-containing medium. As shown in Fig. 5B, the extents of Rad53 phosphorylation were similar in wild-type and in *mad2Δ* cells during the first 40 min following UV irradiation. However, after 60 min, the amount of phosphorylated forms of Rad53 decreased more rapidly in wild-type than in *mad2Δ* cells, whereas FACS analysis indicates that in both strains, the majority of the cells were blocked in  $G_2/M$  (Fig. 5C). As expected, weaker Rad53 phosphorylation in wild-type cells was associated with a decrease in Rad53 autophosphorylation activity (data not shown). In contrast to that of Rad53, Rad9 hyperphosphorylation induced by UV irradiation was more intense in wild-type than in *mad2Δ* cells but disappeared in both strains around 90 min after irradiation (Fig. 5B).

In order to exclude the possibility that the slower inactivation of Rad53 in *mad2Δ* cells upon nocodazole treatment could be due to a defect in DNA repair, we verified that the extents and the kinetics of DNA repair were similar in wild-type and in *mad2Δ* cells by using an antibody against cyclobutane pyrimidine dimers (Fig. 5D). Nocodazole treatment thus accelerated Rad53 inactivation after UV irradiation in wild-type cells com-

pared to that in *mad2Δ* mutants, although both types of cells were blocked in mitosis, with comparable amounts of DNA lesions. We performed similar experiments using Mps1 overexpression to activate the spindle checkpoint prior to UV irradiation, and we also observed an acceleration of Rad53 inactivation in wild-type cells compared to that in *mad2Δ* mutants (data not shown).

In order to test whether the effect of the spindle checkpoint activation on Rad53 phosphorylation was specific to UV-induced DNA lesions, we performed the same analyses using phleomycin, a radiomimetic drug that produces DNA double-strand breaks. Wild-type and *mad2Δ* cells were synchronized with  $\alpha$ -factor and released into nocodazole-containing medium and, when synchronized in  $G_2/M$ , were treated with phleomycin for 1 hour (phleomycin was added at time zero). As shown in Fig. 5E, Rad53 phosphorylation levels were comparable in wild-type and *mad2Δ* cells during phleomycin treatment. However, removal of phleomycin at 60 min led to a rapid decrease in phosphorylated forms of Rad53 in wild-type cells, whereas Rad53 phosphorylation was maintained in *mad2Δ* mutants until the end of the experiment. These results are less conclusive than those for the UV experiment because the *mad2Δ* cells did not keep the same degree of synchronization as the wild-type cells (Fig. 5F). However, they suggest that activation of the spindle assembly checkpoint accelerates the inactivation of Rad53 following different kinds of DNA damage.

We tested the influence of the Ptc2, Ptc3, and Pph3 phosphatases on Rad53 dephosphorylation under conditions of simultaneous DNA and spindle checkpoint activation. Wild-type, *mad2Δ*, *ptc2Δ ptc3Δ*, and *pph3Δ* cells were pretreated with nocodazole and UV irradiated as described above. As shown in Fig. 6A, the deletion of *PTC2* and *PTC3* had no visible effects on Rad53 dephosphorylation under these conditions. In contrast, Rad53 dephosphorylation was significantly delayed in *pph3Δ* cells (Fig. 6C). However, a delay in Rad53 dephosphorylation was also observed in *pph3Δ* cells that were

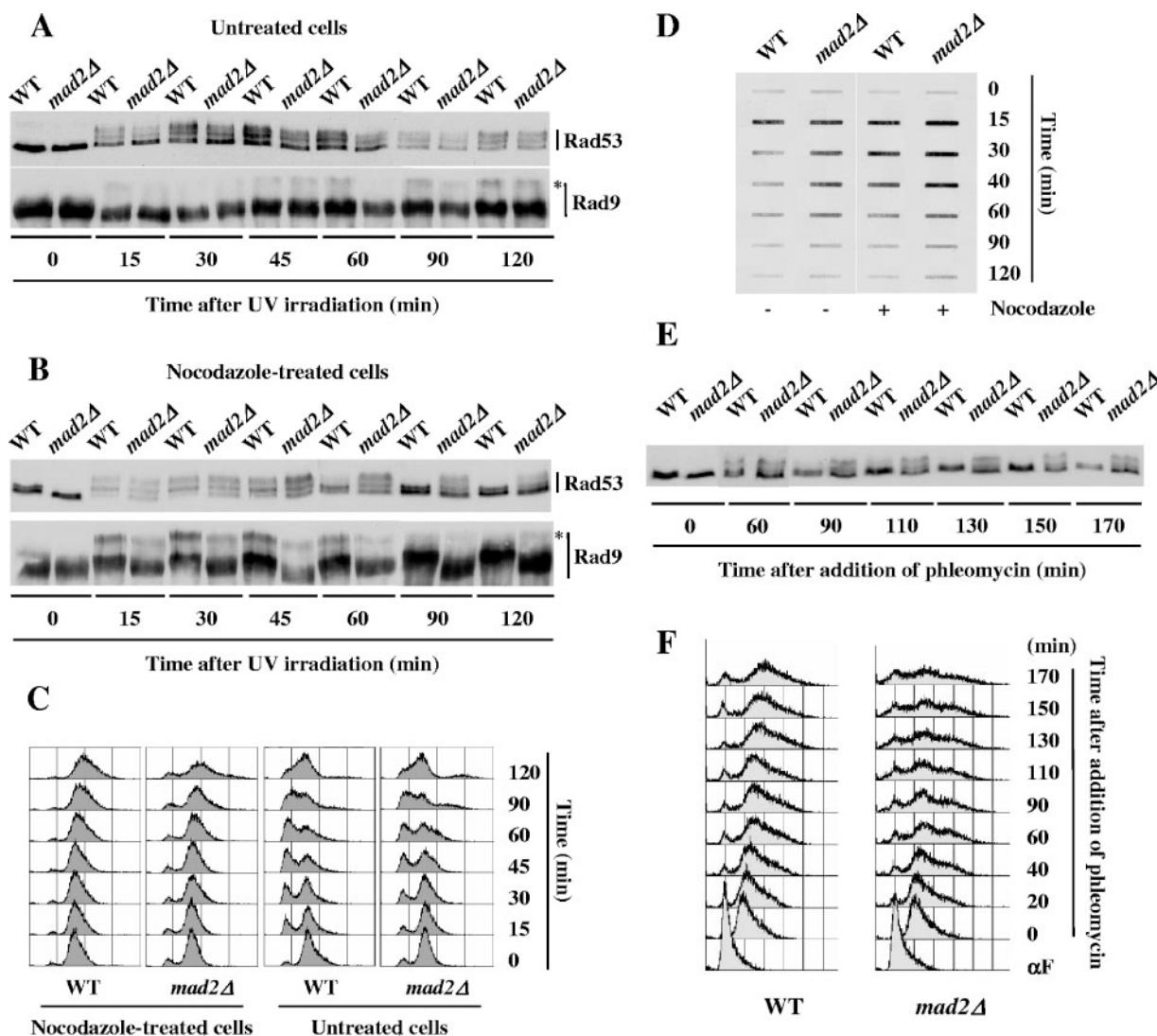


FIG. 5. Nocodazole treatment accelerates Rad53 inactivation after DNA damage. (A to D) Wild-type (WT) (MCM403) and *mad2Δ* (L78) mutant cells were arrested in G<sub>1</sub> with  $\alpha$ -factor, washed thrice, and released into fresh medium in the absence (untreated cells) or in the presence (nocodazole-treated cells) of nocodazole (15  $\mu$ g/ml). After 90 min, both nocodazole-treated and untreated cells were synchronized in G<sub>2</sub>/M. They were then UV irradiated (40 J/m<sup>2</sup>) at time zero and further grown in fresh medium in the presence or absence of nocodazole as before. Aliquots were taken at the indicated times after UV irradiation and analyzed by Western blotting (A and B) and by FACS (C). The asterisks mark the presence of hyperphosphorylated Rad9 forms. For each time point, the extent of DNA repair was monitored by immunoblotting genomic DNA with the TDM-2 antibody against cyclobutane pyrimidine dimers (D). (E and F) Wild-type (MCM185) and *mad2Δ* (L48) mutant cells were arrested in G<sub>1</sub> with  $\alpha$ -factor, washed thrice, and released into fresh medium in the presence of nocodazole. After 2 h of nocodazole treatment, when the cells were synchronized in G<sub>2</sub>/M, phleomycin (10  $\mu$ g/ml) was added to the culture (time zero). At 60 min, the cells were washed again and resuspended in fresh medium with nocodazole but without phleomycin. Samples were analyzed by Western blotting using anti-Rad53 antibodies (E) and by FACS (F).

synchronized with  $\alpha$ -factor treatment, released, and UV irradiated in G<sub>2</sub>/M without nocodazole treatment (Fig. 6E). The absence of Pph3 leads to a sustained phosphorylation of histone H2A following DSBs, which was shown to induce a persistent phosphorylation of Rad53 (27). Since UV irradiation was demonstrated to trigger the phosphorylation of histone H2A in mammal cells (18, 35), the simplest interpretation of our data is that the deletion of *PPH3* indirectly modifies Rad53 phosphorylation with or without nocodazole treatment, via its effect on histone H2A phosphorylation.

We have shown that Rad53 inactivation after DNA damage

is accelerated when the spindle checkpoint is activated. One physiological interpretation of this effect is that, since Rad53 hyperactivation is deleterious (29, 37), an accelerated inactivation of Rad53 could be advantageous if G<sub>2</sub>/M arrest can be maintained in a redundant way by the spindle assembly checkpoint. If this were the case, we could expect nocodazole treatment to induce a Rad9-, Rad53-, and Mad2-dependent increase in UV resistance. *RAD53* being essential, we analyzed *rad53Δ* cells in which the lethality of *RAD53* deletion was suppressed by overexpressing *RNR1* (which encodes the largest subunit of ribonucleotide reductase) (11). Asynchronous cul-

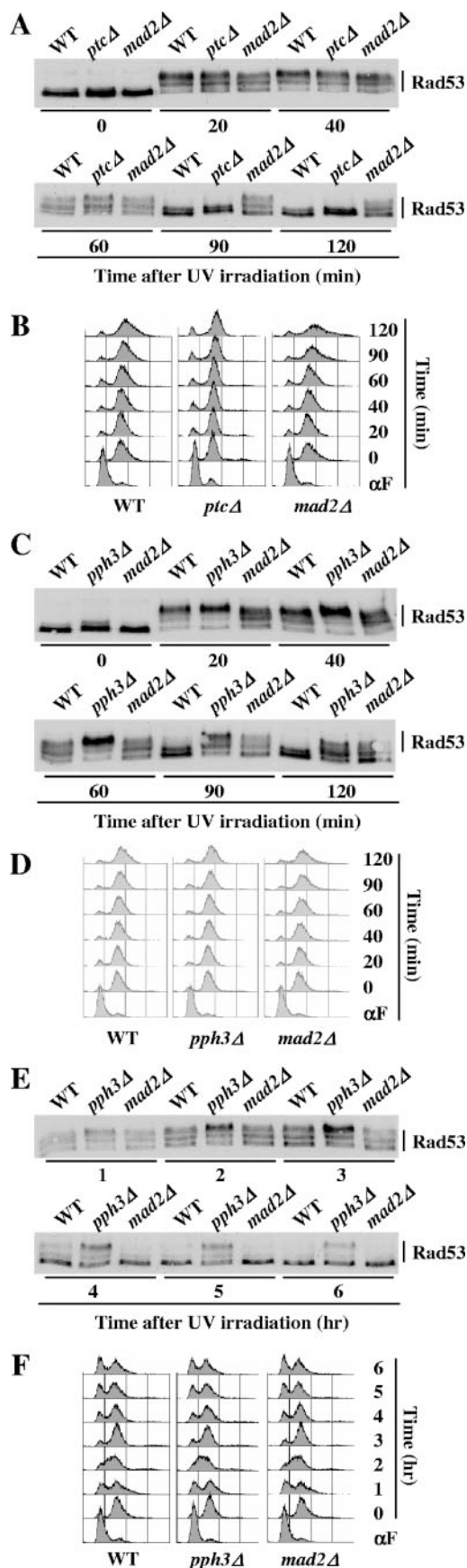


TABLE 2. Nocodazole treatment improves UV resistance of wild-type, DNA checkpoint-, and spindle checkpoint-deficient cells<sup>a</sup>

Strain	Presence of nocodazole	Cell viability (%) after indicated UV irradiation (J/m <sup>2</sup> )		
		0	120	120 (normalized)
Wild type	-	97.5 ± 0.7	47.0 ± 0.0	48.2 ± 0.3
	+	96.5 ± 0.7	85.2 ± 4.7	88.3 ± 5.6
<i>mad2Δ</i>	-	97.5 ± 0.7	38.4 ± 0.8	39.4 ± 1.2
	+	48.5 ± 2.7	35.8 ± 6.4	73.6 ± 9.0
<i>rad9Δ</i>	-	96.0 ± 1.4	0.9 ± 0.6	1.0 ± 0.6
	+	97.5 ± 0.7	4.8 ± 0.8	4.9 ± 0.9
<i>rad53Δ</i>	-	79.1 ± 3.8	1.0 ± 0.0	1.3 ± 0.1
	+	77.6 ± 0.4	4.8 ± 2.7	6.2 ± 3.4

<sup>a</sup> Two independent cultures of wild-type (MCM185), *mad2Δ* (L48 and L183), *rad9Δ* (L157 and L256), and *rad53Δ* (L153 and L305) strains were synchronized with  $\alpha$ -factor, released into fresh medium in the presence (+) or in the absence (-) of nocodazole, plated, and either UV irradiated when cells were in G<sub>2</sub>/M or left untreated. Plates were incubated at 30°C, and the percentages of surviving colonies (means ± standard deviations) were determined after 24 h (200 colonies were examined for each point). In order to take into account UV irradiation-unrelated effects on cell viability, the percentages of surviving colonies after UV irradiation were divided by the proportions of surviving colonies in the absence of UV irradiation [in the "120 (normalized)" column].

tures of wild-type, *rad9Δ*, *rad53Δ*, and *mad2Δ* cells were synchronized in G<sub>1</sub> with  $\alpha$ -factor, released into fresh medium in the presence or in the absence of nocodazole, and UV irradiated when cells were in G<sub>2</sub>/M. The results for a representative experiment are shown in Table 2, with the number of surviving colonies after UV irradiation normalized by the number of surviving colonies in the absence of irradiation. Surprisingly, nocodazole treatment improved cell viability after UV irradiation in wild-type cells as well as in DNA checkpoint- and in spindle checkpoint-defective cells. The causes of this nocodazole effect on UV resistance were not investigated further, but no potential effect of the accelerated inactivation of Rad53 on cell viability after DNA damage could be demonstrated under these conditions.

***rad9Δ* and *rad53Δ* mutants exhibit wild-type viabilities under conditions of spindle dysfunction.** In order to investigate whether Rad53 or Rad9 could be involved in the spindle damage response, we looked for spindle-damaging conditions to which *rad9Δ* or *rad53Δ* mutants would be hypersensitive or hyperresistant. We tested the sensitivities of *rad9Δ*, *rad53Δ*,

FIG. 6. *PPH3* deletion strongly affects Rad53 dephosphorylation after UV irradiation. (A to D) Asynchronous cultures of wild-type (WT) (MCM185), *mad2Δ* (L48), *ptc2Δ ptc3Δ* (*ptcΔ*, L281), and *pph3Δ* (L289) cells were synchronized in G<sub>1</sub> with  $\alpha$ -factor, washed thrice, and released into fresh medium in the presence of nocodazole. After 90 min, G<sub>2</sub>/M-arrested cells were UV irradiated (40 J/m<sup>2</sup>) at time zero and further grown in fresh medium in the presence of nocodazole. Aliquots were taken at the indicated times after UV irradiation and analyzed by Western blotting using anti-Rad53 antibodies (A and C) and by FACS (B and D). (E and F) Asynchronous cultures of wild-type (MCM185), *mad2Δ* (L48), and *pph3Δ* (L289) cells were synchronized in G<sub>1</sub> with  $\alpha$ -factor, washed thrice, and released into fresh medium (without nocodazole). After 90 min, the G<sub>2</sub>/M-synchronized cells were UV irradiated (40 J/m<sup>2</sup>) at time zero. Samples were retrieved at the indicated times after UV irradiation and analyzed by Western blotting using anti-Rad53 antibodies (E) and by FACS (F).

and *rad9Δ rad53Δ* mutants to benomyl (another microtubule-depolymerizing drug) or to the overexpression of Mps1, which is highly deleterious to *mad1* and *mad2* mutants (20). Neither *rad9Δ*, *rad53Δ*, nor *rad9Δ rad53Δ* cells showed any specific hypersensitivity to these stresses compared to wild-type cells (data not shown). Moreover, we found that upon nocodazole treatment, Pds1 was similarly stabilized in wild-type and in *rad9Δ* cells (data not shown). We also analyzed *cbf1Δ* and *gim3Δ* mutants that are affected in different spindle components and are hypersensitive to microtubule-depolymerizing drugs (19). *CBF1* encodes a kinetochore protein that binds to centromeric DNA (6), whereas *GIM3* codes for a subunit of the prefoldin complex that promotes the formation of functional tubulins (16). We found that the deletion of *RAD9* or *RAD53* had no reproducible effect on the viability of the *cbf1Δ* or *gim3Δ* mutant in the presence or in the absence of benomyl (data not shown).

Since Chk2 and 53BP1, the mammalian homologs of Rad53 and Rad9, have been shown to localize to centrosomes (63) and to kinetochores (25), respectively, we analyzed the localizations of Rad53-green fluorescent protein (GFP) and Rad9-GFP fusion proteins after nocodazole treatment. We observed diffuse nuclear localizations for both Rad53-GFP and Rad9-GFP in exponentially growing and in nocodazole-treated cells (consistent with previously reported results [22]), without any evidence for Rad53-GFP or Rad9-GFP accumulation at the spindle pole bodies or at the kinetochores (data not shown).

## DISCUSSION

**The activation of the spindle assembly checkpoint modulates Rad53 and Rad9 phosphorylation states.** Our results have established that the activation of the spindle assembly checkpoint alters the phosphorylation states of two components of the DNA checkpoint, Rad53 and Rad9, in the absence and in the presence of DNA damage. In the absence of DNA damage, Rad53 and Rad9 modifications induced by nocodazole treatment or Mps1 overexpression are independent of all the DNA checkpoint components that we tested (Fig. 2) but are abolished in spindle checkpoint-defective mutants (Fig. 3). Remarkably, Rad9, although highly phosphorylated, has no influence on Rad53 phosphorylation, which indicates that the physiological relations between Rad53 and Rad9 in this case are quite different from those observed upon DNA lesions. The nocodazole-induced phosphorylation of Rad53 is dependent on the spindle checkpoint components Mad1, Mad2, Bub1, and Mps1 but is independent of spindle checkpoint downstream targets, like the securin Pds1 or the MEN protein Bub2 (Fig. 3 and data not shown). Moreover, the observation that the Rad53 phosphorylation state is unaffected by the overexpression of an indestructible form of Pds1 that induces a metaphase/anaphase block further supports the assumption that Rad53 and Rad9 modifications result directly from spindle checkpoint activation.

We have found evidence suggesting that Rad53 might be a substrate of the Pph3 phosphatase upon spindle checkpoint activation, but the identity of the kinase(s) that phosphorylates Rad53 and Rad9 under these conditions remains undefined. Two protein kinases are part of the *S. cerevisiae* spindle assembly checkpoint: Mps1 and Bub1. We have shown that Mps1

functionality is required for Rad53 modification upon nocodazole treatment and that overexpression of Mps1 induces a modification of Rad53 similar to the one observed after nocodazole treatment (Fig. 1C and 3C and D). However, Rad53 modification induced by *MPS1* overexpression depends on Mad2 (Fig. 3E), which suggests that Rad53 may not be a direct substrate of Mps1. Moreover, coimmunoprecipitation experiments failed to demonstrate any specific interaction between Rad53 and Mps1 or between Rad53 and Bub1 (data not shown), so the question has not been settled.

We have shown that the activation of the spindle checkpoint also modulates Rad53 phosphorylation in cases of DNA damage. This observation can be compared with recent data indicating that TTK/hMps1, the human homolog of yeast Mps1, contributes to the activation of Chk2, the human homolog of Rad53, upon DNA damage (68). hMps1 phosphorylates Chk2 on Thr-68 in vitro, and inhibition of hMps1 activity in vivo results in reduced Chk2 Thr-68 phosphorylation accompanied by a defective cell cycle arrest and a decreased checkpoint response to DNA damage. However, inactivating the spindle assembly checkpoint by transfection of small interfering RNA targeting hMad2 had no effect on Chk2 Thr-68 phosphorylation or on the DNA checkpoint response, which indicates that hMps1 participates in the regulation of the DNA checkpoint independently of its functions in the spindle checkpoint. Our results thus differ from those reported by Wei et al. (68) in that (i) the phosphorylation state of Rad53 is modified both in the absence and in the presence of DNA damage and (ii) this modification is dependent on the spindle assembly checkpoint as a whole and not on just one of its components.

Our observations both hint at some functions for Rad53 and Rad9 in the spindle damage response and suggest an influence of the spindle checkpoint on DNA checkpoint inactivation, two issues that we will address sequentially.

**Potential implication of Rad53 and Rad9 in the spindle damage response.** The phosphorylations of Rad53 and Rad9 induced by the activation of the spindle checkpoint could indicate that Rad53 and Rad9 are involved in the spindle damage response and perform biochemical functions either identical to or different from the ones that they carry out upon DNA damage. If Rad53 and Rad9 were effectors of the spindle checkpoint, they should be required under some circumstances for an optimal response to spindle dysfunction and *RAD53* and *RAD9* deletions should affect cell viability upon spindle damage. However, we and others (e.g., references 23, 38, and 45) have found little evidence for it. This could mean that the parts played by Rad9 and Rad53 become limiting for cell viability only in very specific cases. Alternatively, Rad53 and Rad9 could represent so-far-unidentified targets of the spindle checkpoint. If this were the case, the implication of Rad9 and Rad53 in the spindle damage response might be demonstrated more readily by identifying and mutating the Rad9 or Rad53 sites that get phosphorylated following spindle checkpoint activation than by deleting *RAD9* or *RAD53*. The fact that *rad9* and *rad53 sml1-1* mutants exhibit significantly higher rates of spontaneous chromosome loss than other DNA checkpoint mutants, like the *dun1* and *chk1* mutants (28), may be another indication of specific parts played by Rad53 and Rad9 in the spindle damage response. These functions could be conserved in mammal cells, which would explain the localizations of Chk2

and 53PB1 and the hyperphosphorylation of 53BP1 upon spindle damage (25, 61, 63).

**Rad53 inactivation after DNA damage is accelerated when the spindle assembly checkpoint is activated.** As briefly reviewed in the introduction, many studies have shown that the spindle assembly checkpoint is involved in some DNA damage responses. The data regarding *S. cerevisiae* (7, 15, 36) have mostly established that Mad2-dependent pathways contribute to G<sub>2</sub>/M arrest upon DNA damage independently of the DNA checkpoint. These data also suggest that the spindle assembly checkpoint is activated by DNA lesions or replication defects.

Looking for interregulations of the DNA and the spindle checkpoints, we found that the activation of the spindle assembly checkpoint modifies the phosphorylation of both Rad53 and Rad9: Rad9 phosphorylation is more intense following UV irradiation, whereas Rad53 inactivation is accelerated (although the possibility of other effects on Rad53 activity and/or specificity cannot be excluded). Nocodazole treatment triggers several responses, including cell cycle arrest in mitosis, in spindle checkpoint-proficient cells. The accelerated inactivation of Rad53 after DNA damage in the presence of nocodazole could be due either to a direct influence of the spindle checkpoint on the DNA checkpoint or to an indirect effect of G<sub>2</sub>/M arrest on Rad53 activation. We verified that wild-type and *mad2Δ* cells exhibit similar kinetics of DNA repair and similar FACS profiles during the UV irradiation experiment (Fig. 5). Moreover, Clerici et al. demonstrated that the kinetics of Rad53 phosphorylation in UV-irradiated *mec1Δ* and *mec1Δ mad2Δ* cells were identical whereas *mec1Δ* cells remained blocked in G<sub>2</sub>/M and *mec1Δ mad2Δ* cells resumed their division cycle (7). Although we cannot completely rule out that Rad53 could be affected by secondary consequences of spindle checkpoint activation, our results suggest that the spindle checkpoint, when activated, could directly influence Rad53 inactivation after DNA damage.

Since Mad2-dependent pathways are presumed to be activated by some kinds of DNA lesions, the question as to why Mad2 has no effect on Rad53 inactivation in the absence of nocodazole arises. We propose that only a subset of DNA lesions is able to activate the spindle assembly checkpoint and that the DNA damage generated by UV irradiations in DNA checkpoint-proficient cells is not included in this subset. Another question concerns the physiological meaning of the influence of the spindle checkpoint on Rad53 inactivation after DNA damage. One possibility is that an accelerated inactivation of Rad53 could be beneficial if G<sub>2</sub>/M arrest can be maintained by the spindle assembly checkpoint. Although we could not demonstrate that nocodazole treatment induces a spindle checkpoint- and DNA checkpoint-dependent increase in UV resistance, we propose that upon some kinds of DNA damage, both the DNA checkpoint and the spindle checkpoint are activated and that the activation of the spindle checkpoint could contribute to adaptation to or recovery from DNA lesions.

As a conclusion, our study points to a direct regulation of some components of the DNA checkpoint (Rad53 and Rad9) by the spindle assembly checkpoint. This regulation suggests both specific functions for Rad53 and Rad9 in the spindle damage response and the implication of the spindle checkpoint in DNA checkpoint inactivation. Nocodazole is regularly used

to synchronize cells in DNA checkpoint experiments, and our results should stand as a caveat for their interpretation.

#### ACKNOWLEDGMENTS

We thank Mark Winey, David Lydall, Orna Cohen-Fix, and Steve Elledge for the generous gifts of plasmids and strains. We are grateful to the members of the MCMK laboratory, particularly to Anne Peyroche for discussions and to Emilie Ma for analyzing the localization of Rad53-GFP and Rad9-GFP.

This work was financed in part by the Association pour la Recherche sur le Cancer.

#### REFERENCES

- Agarwal, R., and O. Cohen-Fix. 2002. Phosphorylation of the mitotic regulator Pds1/securin by Cdc28 is required for efficient nuclear localization of Esp1/separase. *Genes Dev.* **16**:1371–1382.
- Agarwal, R., Z. Tang, H. Yu, and O. Cohen-Fix. 2003. Two distinct pathways for inhibiting Pds1 ubiquitination in response to DNA damage. *J. Biol. Chem.* **278**:45027–45033.
- Alexandru, G., W. Zachariae, A. Schleiffer, and K. Nasmyth. 1999. Sister chromatid separation and chromosome re-duplication are regulated by different mechanisms in response to spindle damage. *EMBO J.* **18**:2707–2721.
- Bardin, A. J., and A. Amon. 2001. Men and sin: what's the difference? *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2**:815–826.
- Bardin, A. J., R. Visintin, and A. Amon. 2000. A mechanism for coupling exit from mitosis to partitioning of the nucleus. *Cell* **102**:21–31.
- Cai, M., and R. W. Davis. 1990. Yeast centromere binding protein CBF1, of the helix-loop-helix protein family, is required for chromosome stability and methionine prototrophy. *Cell* **61**:437–446.
- Clerici, M., V. Baldo, D. Mantiero, F. Lotterberger, G. Lucchini, and M. P. Longhese. 2004. A Tel1/MRX-dependent checkpoint inhibits the metaphase-to-anaphase transition after UV irradiation in the absence of Mec1. *Mol. Cell Biol.* **24**:10126–10144.
- Cohen-Fix, O., and D. Koshland. 1999. Pds1p of budding yeast has dual roles: inhibition of anaphase initiation and regulation of mitotic exit. *Genes Dev.* **13**:1950–1959.
- Cohen-Fix, O., J. M. Peters, M. W. Kirschner, and D. Koshland. 1996. Anaphase initiation in *Saccharomyces cerevisiae* is controlled by the APC-dependent degradation of the anaphase inhibitor Pds1p. *Genes Dev.* **10**:3081–3093.
- Collura, A., J. Blaisonneau, G. Baldacci, and S. Francesconi. 2005. The fission yeast Crb2/Chk1 pathway coordinates the DNA damage and spindle checkpoint in response to replication stress induced by topoisomerase I inhibitor. *Mol. Cell Biol.* **25**:7889–7899.
- Desany, B. A., A. A. Alcasabas, J. B. Bachant, and S. J. Elledge. 1998. Recovery from DNA replication stress is the essential function of the S-phase checkpoint pathway. *Genes Dev.* **12**:2956–2970.
- Dodson, H., E. Bourke, L. J. Jeffers, P. Vagnarelli, E. Sonoda, S. Takeda, W. C. Earnshaw, A. Merdes, and C. Morrison. 2004. Centrosome amplification induced by DNA damage occurs during a prolonged G<sub>2</sub> phase and involves ATM. *EMBO J.* **23**:3864–3873.
- Fang, Y., T. Liu, X. Wang, Y. M. Yang, H. Deng, J. Kunicki, F. Traganos, Z. Darzynkiewicz, L. Lu, and W. Dai. 2006. BubR1 is involved in regulation of DNA damage responses. *Oncogene* **25**:3598–3605.
- Fraschini, R., E. Formenti, G. Lucchini, and S. Piatti. 1999. Budding yeast Bub2 is localized at spindle pole bodies and activates the mitotic checkpoint via a different pathway from Mad2. *J. Cell Biol.* **145**:979–991.
- Garber, P. M., and J. Rine. 2002. Overlapping roles of the spindle assembly and DNA damage checkpoints in the cell-cycle response to altered chromosomes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **161**:521–534.
- Geissler, S., K. Siegers, and E. Schiebel. 1998. A novel protein complex promoting formation of functional alpha- and gamma-tubulin. *EMBO J.* **17**:952–966.
- Gilbert, C. S., C. M. Green, and N. F. Lowndes. 2001. Budding yeast Rad9 is an ATP-dependent Rad53 activating machine. *Mol. Cell* **8**:129–136.
- Halicka, H. D., X. Huang, F. Traganos, M. A. King, W. Dai, and Z. Darzynkiewicz. 2005. Histone H2AX phosphorylation after cell irradiation with UV-B: relationship to cell cycle phase and induction of apoptosis. *Cell Cycle* **4**:339–345.
- Hardwick, K. G., R. Li, C. Mistrot, R. H. Chen, P. Dann, A. Rudner, and A. W. Murray. 1999. Lesions in many different spindle components activate the spindle checkpoint in the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **152**:509–518.
- Hardwick, K. G., E. Weiss, F. C. Luca, M. Winey, and A. W. Murray. 1996. Activation of the budding yeast spindle assembly checkpoint without mitotic spindle disruption. *Science* **273**:953–956.
- Hoyt, M. A., L. Totis, and B. T. Roberts. 1991. *S. cerevisiae* genes required for cell cycle arrest in response to loss of microtubule function. *Cell* **66**:507–517.

22. Huh, W. K., J. V. Falvo, L. C. Gerke, A. S. Carroll, R. W. Howson, J. S. Weissman, and E. K. O'Shea. 2003. Global analysis of protein localization in budding yeast. *Nature* **425**:686–691.
23. Hyland, K. M., J. Kingsbury, D. Koshland, and P. Hieter. 1999. Ctf19p: a novel kinetochore protein in *Saccharomyces cerevisiae* and a potential link between the kinetochore and mitotic spindle. *J. Cell Biol.* **145**:15–28.
24. Jaspersen, S. L., J. F. Charles, R. L. Tinker-Kulberg, and D. O. Morgan. 1998. A late mitotic regulatory network controlling cyclin destruction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell* **9**:2803–2817.
25. Jullien, D., P. Vagnarelli, W. C. Earnshaw, and Y. Adachi. 2002. Kinetochore localisation of the DNA damage response component 53BP1 during mitosis. *J. Cell Sci.* **115**:71–79.
26. Kadura, S., and S. Sazer. 2005. SAC-ing mitotic errors: how the spindle assembly checkpoint (SAC) plays defense against chromosome mis-segregation. *Cell Motil. Cytoskeleton* **61**:145–160.
27. Keogh, M. C., J. A. Kim, M. Downey, J. Fillingham, D. Chowdhury, J. C. Harrison, M. Onishi, N. Datta, S. Galicia, A. Emili, J. Lieberman, X. Shen, S. Buratowski, J. E. Haber, D. Durocher, J. F. Greenblatt, and N. J. Krogan. 2006. A phosphatase complex that dephosphorylates gammaH2AX regulates DNA damage checkpoint recovery. *Nature* **439**:497–501.
28. Klein, H. L. 2001. Spontaneous chromosome loss in *Saccharomyces cerevisiae* is suppressed by DNA damage checkpoint functions. *Genetics* **159**:1501–1509.
29. Krishnan, V., S. Nirantar, K. Crasta, A. Y. Cheng, and U. Surana. 2004. DNA replication checkpoint prevents precocious chromosome segregation by regulating spindle behavior. *Mol. Cell* **16**:687–700.
30. Lee, S. E., J. K. Moore, A. Holmes, K. Umez, R. D. Kolodner, and J. E. Haber. 1998. *Saccharomyces* Ku70, mre11/rad50 and RPA proteins regulate adaptation to G2/M arrest after DNA damage. *Cell* **94**:399–409.
31. Leroy, C., S. E. Lee, M. B. Vaze, F. Ochsenbier, R. Guerois, J. E. Haber, and M. C. Marsolier-Kergoat. 2003. PP2C phosphatases Ptc2 and Ptc3 are required for DNA checkpoint inactivation after a double-strand break. *Mol. Cell* **11**:827–835.
32. Leroy, C., C. Mann, and M. C. Marsolier. 2001. Silent repair accounts for cell cycle specificity in the signaling of oxidative DNA lesions. *EMBO J.* **20**:2896–2906.
33. Lew, D. J., and D. J. Burke. 2003. The spindle assembly and spindle position checkpoints. *Annu. Rev. Genet.* **37**:251–282.
34. Li, R., and A. W. Murray. 1991. Feedback control of mitosis in budding yeast. *Cell* **66**:519–531.
35. Limoli, C. L., E. Giedzinski, W. M. Bonner, and J. E. Cleaver. 2002. UV-induced replication arrest in the xeroderma pigmentosum variant leads to DNA double-strand breaks, gamma-H2AX formation, and Mre11 relocalization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**:233–238.
36. Maringe, L., and D. Lydall. 2002. EXO1-dependent single-stranded DNA at telomeres activates subsets of DNA damage and spindle checkpoint pathways in budding yeast yku70Delta mutants. *Genes Dev.* **16**:1919–1933.
37. Marsolier, M. C., P. Roussel, C. Leroy, and C. Mann. 2000. Involvement of the PP2C-like phosphatase Ptc2p in the DNA checkpoint pathways of *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **154**:1523–1532.
38. Mayer, M. L., S. P. Gygi, R. Aebersold, and P. Hieter. 2001. Identification of RFC(Ctf18p, Ctf8p, Dcc1p): an alternative RFC complex required for sister chromatid cohesion in *S. cerevisiae*. *Mol. Cell* **7**:959–970.
39. Melo, J., and D. Toczyski. 2002. A unified view of the DNA-damage checkpoint. *Curr. Opin. Cell Biol.* **14**:237–245.
40. Mikhailov, A., R. W. Cole, and C. L. Rieder. 2002. DNA damage during mitosis in human cells delays the metaphase/anaphase transition via the spindle-assembly checkpoint. *Curr. Biol.* **12**:1797–1806.
41. Morgan, D. O. 1999. Regulation of the APC and the exit from mitosis. *Nat. Cell Biol.* **1**:E47–E53.
42. Mumberg, D., R. Muller, and M. Funk. 1994. Regulatable promoters of *Saccharomyces cerevisiae*: comparison of transcriptional activity and their use for heterologous expression. *Nucleic Acids Res.* **22**:5767–5768.
43. Musacchio, A., and K. G. Hardwick. 2002. The spindle checkpoint: structural insights into dynamic signalling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **3**:731–741.
44. Nasmyth, K. 2001. Disseminating the genome: joining, resolving, and separating sister chromatids during mitosis and meiosis. *Annu. Rev. Genet.* **35**:673–745.
45. Pangilinan, F., and F. Spencer. 1996. Abnormal kinetochore structure activates the spindle assembly checkpoint in budding yeast. *Mol. Biol. Cell* **7**:1195–1208.
46. Pellicoli, A., C. Lucca, G. Liberi, F. Marini, M. Lopes, P. Plevani, A. Romano, P. P. Di Fiore, and M. Foiani. 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.
47. Pereira, G., T. Hofken, J. Grindlay, C. Manson, and E. Schiebel. 2000. The Bub2p spindle checkpoint links nuclear migration with mitotic exit. *Mol. Cell* **6**:1–10.
48. Pinsky, B. A., and S. Biggins. 2005. The spindle checkpoint: tension versus attachment. *Trends Cell Biol.* **15**:486–493.
49. Royou, A., H. Macias, and W. Sullivan. 2005. The *Drosophila* Grp/Chk1 DNA damage checkpoint controls entry into anaphase. *Curr. Biol.* **15**:334–339.
50. Sanchez, Y., J. Bachant, H. Wang, F. Hu, D. Liu, M. Tetzlaff, and S. J. Elledge. 1999. Control of the DNA damage checkpoint by chk1 and rad53 protein kinases through distinct mechanisms. *Science* **286**:1166–1171.
51. Sanchez, Y., B. A. Desany, W. J. Jones, Q. Liu, B. Wang, and S. J. Elledge. 1996. Regulation of RAD53 by the ATM-like kinases MEC1 and TEL1 in yeast cell cycle checkpoint pathways. *Science* **271**:357–360.
52. Schwartz, M. F., J. K. Duong, Z. Sun, J. S. Morrow, D. Pradhan, and D. F. Stern. 2002. Rad9 phosphorylation sites couple Rad53 to the *Saccharomyces cerevisiae* DNA damage checkpoint. *Mol. Cell* **9**:1055–1065.
53. Shou, W., J. H. Seol, A. Shevchenko, C. Baskerville, D. Moazed, Z. W. Chen, J. Jang, H. Charbonneau, and R. J. Deshaies. 1999. Exit from mitosis is triggered by Tem1-dependent release of the protein phosphatase Cdc14 from nucleolar RENT complex. *Cell* **97**:233–244.
54. Sikorski, R. S., and P. Hieter. 1989. A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **122**:19–27.
55. Spencer, F., and P. Hieter. 1992. Centromere DNA mutations induce a mitotic delay in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**:8908–8912.
56. Stegmeier, F., R. Visintin, and A. Amon. 2002. Separase, polo kinase, the kinetochore protein Slk19, and Spo12 function in a network that controls Cdc14 localization during early anaphase. *Cell* **108**:207–220.
57. Stern, B. M., and A. W. Murray. 2001. Lack of tension at kinetochores activates the spindle checkpoint in budding yeast. *Curr. Biol.* **11**:1462–1467.
58. Sugimoto, I., H. Murakami, Y. Tonami, A. Moriyama, and M. Nakanishi. 2004. DNA replication checkpoint control mediated by the spindle checkpoint protein Mad2p in fission yeast. *J. Biol. Chem.* **279**:47372–47378.
59. Sun, Z., J. Hsiao, D. S. Fay, and D. F. Stern. 1998. Rad53 FHA domain associated with phosphorylated Rad9 in the DNA damage checkpoint. *Science* **281**:272–274.
60. Sweeney, F. D., F. Yang, A. Chi, J. Shabanowitz, D. F. Hunt, and D. Durocher. 2005. *Saccharomyces cerevisiae* Rad9 acts as a Mec1 adaptor to allow Rad53 activation. *Curr. Biol.* **15**:1364–1375.
61. Takada, S., A. Kelkar, and W. E. Theurkauf. 2003. *Drosophila* checkpoint kinase 2 couples centrosome function and spindle assembly to genomic integrity. *Cell* **113**:87–99.
62. Tinker-Kulberg, R. L., and D. O. Morgan. 1999. Pds1 and Esp1 control both anaphase and mitotic exit in normal cells and after DNA damage. *Genes Dev.* **13**:1936–1949.
63. Tsvetkov, L., X. Xu, J. Li, and D. F. Stern. 2003. Polo-like kinase 1 and Chk2 interact and co-localize to centrosomes and the midbody. *J. Biol. Chem.* **278**:8468–8475.
64. Usui, T., H. Ogawa, and J. H. Petrini. 2001. A DNA damage response pathway controlled by Tel1 and the Mre11 complex. *Mol. Cell* **7**:1255–1266.
65. Vialard, J. E., C. S. Gilbert, C. M. Green, and N. F. Lowndes. 1998. The budding yeast Rad9 checkpoint protein is subjected to Mec1/Tel1-dependent hyperphosphorylation and interacts with Rad53 after DNA damage. *EMBO J.* **17**:5679–5688.
66. Visintin, R., K. Craig, E. S. Hwang, S. Prinz, M. Tyers, and A. Amon. 1998. The phosphatase Cdc14 triggers mitotic exit by reversal of Cdk-dependent phosphorylation. *Mol. Cell* **2**:709–718.
67. Wang, Y., F. Hu, and S. J. Elledge. 2000. The Bfa1/Bub2 GAP complex comprises a universal checkpoint required to prevent mitotic exit. *Curr. Biol.* **10**:1379–1382.
68. Wei, J. H., Y. F. Chou, Y. H. Ou, Y. H. Yeh, S. W. Tyan, T. P. Sun, C. Y. Shen, and S. Y. Shieh. 2005. TTK/hMps1 participates in the regulation of DNA damage checkpoint response by phosphorylating CHK2 on threonine 68. *J. Biol. Chem.* **280**:7748–7757.
69. Weinert, T. A., and L. H. Hartwell. 1988. The RAD9 gene controls the cell cycle response to DNA damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *Science* **241**:317–322.
70. Weiss, E., and M. Winey. 1996. The *Saccharomyces cerevisiae* spindle pole body duplication gene MPS1 is part of a mitotic checkpoint. *J. Cell Biol.* **132**:111–123.
71. Zou, L., and S. J. Elledge. 2003. Sensing DNA damage through ATRIP recognition of RPA-ssDNA complexes. *Science* **300**:1542–1548.





# REMERCIEMENTS

## *600 baby-gels plus tard...*

2 mai 2003 : Mon arrivée dans le laboratoire, assez désert, on peut le dire. Il faut dire qu'arriver un vendredi après un jour férié, c'est pas très malin... Par contre, de nombreuses personnes m'ont accompagnée par la suite et je voudrais leur dire merci.

Je voudrais avant toute chose remercier Marie-Claude qui a suivi mon travail pendant ces quatre années, notamment pour m'avoir fait confiance dès mon arrivée. Ce fut un pari risqué. Cette expérience a été un vrai bonheur et je ne te remercierai jamais assez de m'avoir donné cette opportunité. J'ai particulièrement apprécié ton côté « didactique » (tout a l'air si simple lorsque l'on est pièce 120A !) et ton optimisme à toute épreuve.

Je voudrais également remercier Emilie, la perle rare des labos. On a partagé quelques manips, mais surtout de nombreux rires, et également quelques soucis chacune de notre côté. Je dois dire que j'ai particulièrement apprécié ton soutien dans les moments difficiles et je t'en suis très reconnaissante.

Willy : no comment !-)

Un petit mot mais une énorme pensée pour Manolo : que dire ? Comme tu l'as écrit, on s'est ignoré pendant un an, mais après on s'est quand même bien rattrapé ! Tu es un appui solide sur lequel je sais que je peux compter. On sait maintenant que l'on ne s'oubliera pas. K !

La grande question pour moi maintenant est de savoir comment je vais faire pour oublier les abdos de Benoît ?? Un grand merci à toi, notamment pour les discussions que nous avons partagées. Rassure-toi, tu ne prêches pas dans le désert et beaucoup m'ont fait réfléchir.

Je remercie également chaleureusement Angie et les rires qui l'accompagnent, Anne P. pour son aide technique mais plus que cela pour son soutien lorsque les choses rament au quotidien (je me souviens d'une série particulièrement pénible de Western-Blot), François toujours disponible pour apporter de l'aide. Un grand merci à Gigi pour son coaching personnalisé au niveau manip au début de ma thèse. Je repense à ta bonne humeur et aux matins où on refaisait le monde ensemble. Je n'oublierai pas Marie-Bénédictte, une personne formidable et Régis non moins adorable. Un grand merci à Arach qui m'a supporté pendant les six derniers mois.

Une pensée émue pour les participants de la bière session, notamment Camille que je reverrai avec grand plaisir, Cyril (notre Calimero qui a bien changé) et Fred. Mais également pour Nico (prends soin de ma petite Emilie), pour Nayla et Emmanuelle, bon courage à toutes les deux pour la fin de votre thèse, et pour tous ceux qui viennent régulièrement le vendredi soir.

Je pense également à Benjamin, Ariane, Emmanuelle, Stéphane et Sylvie que j'ai eu

plaisir à cotoyer pendant quelque temps pièce 126. Et également à Alexandre (Scorpion survivra !), merci d'être venu à ma soutenance.

Je voudrais remercier André Sentenac qui a permis mon accueil au sein du laboratoire, Michel Werner pour m'avoir offert la possibilité de prolonger ma thèse de quelques mois et Pierre Legrain pour son aide en ce qui concerne mon avenir professionnel.

Je voudrais bien évidemment remercier également mon jury.

Enfin, je remercie ma famille, un énorme bisou à ma petite maman et à mon frère. Merci à mon parrain pour avoir été présent, notamment le jour de ma soutenance.

Un grand merci à vous tous...



