



HAL
open science

Régulation du facteur de réplication de l'ADN MCM7 par poly-ubiquitinylation : rôles d'Int6 et BRCA1

Samuel Wolf Buchsbaum

► **To cite this version:**

Samuel Wolf Buchsbaum. Régulation du facteur de réplication de l'ADN MCM7 par poly-ubiquitinylation : rôles d'Int6 et BRCA1. Biochimie [q-bio.BM]. Ecole normale supérieure de lyon - ENS LYON, 2006. Français. NNT : . tel-00120941

HAL Id: tel-00120941

<https://theses.hal.science/tel-00120941>

Submitted on 19 Dec 2006

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.

N° d'ordre :

N° attribué par la bibliothèque :

THESE

En vue d'obtenir le grade de

Docteur de l'Ecole Normale Supérieure de Lyon

Spécialité : Sciences de la vie

Laboratoire de Biologie Moléculaire de la Cellule

Ecole doctorale de Biologie Moléculaire, Intégrée et Cognitive

Présentée et soutenue publiquement le 18/12/2006 par

Monsieur Samuel BUCHSBAUM

Titre :

Régulation du facteur de réplication de l'ADN MCM7 par poly-ubiquitinylation : rôles d'Int6 et BRCA1

Directeur de Thèse : Monsieur Pierre JALINOT

*Après avis de : Monsieur Saadi KHOCHBIN, Membre/Rapporteur
 Monsieur Alain NICOLAS, Membre/Rapporteur*

Devant la commission d'examen formée de :

*Monsieur Gilbert BRUN, Membre
Monsieur Pierre JALINOT, Membre
Monsieur Saadi KHOCHBIN, Membre/Rapporteur
Monsieur Marcel MECHALI, Membre/Examineur
Monsieur Alain NICOLAS, Membre/Rapporteur*

A Emilie et Elina,

REMERCIEMENTS

Tout d'abord, je tiens à remercier mon directeur de thèse, Pierre Jalinot. En m'acceptant dans son équipe depuis mon année de DEA, il m'a permis d'effectuer les cinq années de travaux présentés dans cette thèse. J'ai beaucoup apprécié la grande liberté qu'il m'a laissée, tant au niveau de mon emploi du temps qu'au niveau des expériences menées. Toutefois, il a su me faire profiter de sa culture scientifique pour me guider lorsque je faisais fausse route (ce qui n'est pas rare en cinq années d'expérimentations...). Je le remercie aussi d'accepter de me garder encore quelques mois dans son laboratoire et de me financer afin de mener à leur terme (je l'espère en tout cas) différentes expériences. Puisqu'on en est à parler financement, je remercie à ce propos le Ministère de la Recherche et la Ligue Contre le Cancer qui ont financé mes quatre années de thèse.

Ensuite, je remercie les membres de mon jury de thèse : Pierre, dont je viens de parler, mais aussi Gilbert Brun, pour avoir accepté de présider ce jury, ainsi que Saadi Khochbin et Alain Nicolas pour le temps passé à juger avec attention mon travail. Je remercie également Marcel Méchali d'avoir accepté de faire partie du jury en la qualité d'examineur.

Concernant l'équipe de recherche avec laquelle j'ai évolué depuis cinq ans, je remercie spécialement Christelle Morris et Stéphane Réty : Christelle avec laquelle j'ai beaucoup travaillé, et qui m'a fait profiter de sa « bonne humeur » (...), et, plus sérieusement, de sa rigueur scientifique à la paillasse et de ses nombreux conseils en matière expérimentale, et Stéphane, qui m'a fait découvrir les joies de la biochimie, de la purification des protéines, et qui a su m'y donner goût. Je remercie également Armelle Roisin et Jean-Philippe Robin pour leur aide concernant respectivement la culture cellulaire et les purifications de protéines effectuées en HPLC. Je n'oublie pas les autres membres (anciens ou actuels) de l'équipe : Arnaud Favre-Bonvin, Olivier Lohez, Jérémy Scarato, Jean-Michel Terme et Anne-Laure Vitte, avec lesquels j'ai eu de nombreuses discussions au cours des années passées ici, et notamment Jean-Michel et Jérémy, avec lesquels les discussions sur le thème du football ont été parfois plus que passionnées...

Sur un plan plus personnel, je remercie tout d'abord M. Curtet, mon professeur de Biologie de Terminale (année 1996-1997, Lycée Jean Moulin, Lyon) qui a été le véritable déclencheur de

mon parcours universitaire en me donnant goût aux sciences en général et à la Biologie en particulier. C'est donc en partie grâce à lui que j'en suis là aujourd'hui.

Je remercie également tous les membres de ma famille qui m'ont soutenu tout au long de mes études ; mon frère, Yoni, et plus particulièrement mes parents, Joëlle et Robert, qui m'ont donné les moyens d'effectuer les longues études qui mènent à la thèse de Doctorat, et qui m'ont toujours encouragé dans ce sens.

Enfin, je remercie Emilie, ma compagne, qui a réussi à me « supporter » pendant ces années difficiles que sont les années de thèse : le stress, les baisses de moral, la démotivation, qui sont le lot de tout chercheur ou doctorant, elle a su me les faire oublier (la plupart du temps !) grâce à son optimisme. Je la remercie également de m'avoir offert ce magnifique cadeau qu'est ma fille, Elina, qui par sa joie de vivre et ses sourires quotidiens m'a donné beaucoup de force, notamment pendant la période de rédaction de ma thèse. C'est à elle et à sa maman que je dédie ce manuscrit.

Table des matières

INTRODUCTION : GENOME ET UBIQUITINE	11
I. Maintien de l'intégrité génomique dans les cellules mitotiques	12
II. L'ubiquitinylation : une forme complexe de régulation des protéines qui participe au maintien de l'intégrité génomique	15
CHAPITRE 1. REPONSES AUX LESIONS DE L'ADN PENDANT LA REPLICATION : ROLES DES FOURCHES DE REPLICATION ET DE L'UBIQUITINYLATION.	18
A - La fourche de réplication	19
I. Formation du complexe de pré-réplication (préRC)	19
1. Origines de réplication	19
2. Chargement des protéines MCM	19
3. Restriction à une seule fois par cycle cellulaire	21
II. Initiation de la réplication	22
1. Formation du complexe d'initiation	22
2. Activation des MCM et recrutement du complexe polymérase α / primase	24
3. Recrutement des ADN polymérases réplcatives	24
III. Blocages de la fourche de réplication	26
1. Blocage de la fourche de réplication en absence de lésion de l'ADN	26
2. Blocage de la fourche de réplication suite à une lésion de l'ADN	27
B - Blocage de la fourche : point de contrôle de réplication	29
I. Activation du point de contrôle de réplication	29
1. Quand et pourquoi ?	29
2. Notion de seuil	29
3. Mécanismes moléculaires de l'activation	31
4. Activité basale du point de contrôle	33
5. Limitations au modèle d'activation du point de contrôle	33
II. Fonctions du point de contrôle de réplication	34
1. Stabilisation des fourches de réplication	34
a) Activité basale et activation du point de contrôle	34
b) Stabiliser le réplisome	35
c) Conserver la topologie des fourches : empêcher la recombinaison	37
2. Ralentir la progression de la phase S	39
a) Inhiber les origines de réplication tardives	39
b) Rendre réversible le blocage des fourches de réplication	39
3. Fin du point de contrôle de réplication : dégradation de CHK1	41
C - franchissement des lésions par les fourches de replication	44
I. Synthèse de translésion : voie mutagénique	44
1. ADN polymérases de translésion	44
2. Recrutement des polymérases de translésion aux fourches	46
a) Mono-ubiquitinylation de PCNA	46
i. Chez <i>S. cerevisiae</i>	46
ii. Chez les eucaryotes supérieurs	47
b) Régulation de la mono-ubiquitinylation de PCNA	49
c) Régulations du recrutement des polymérases de translésion par PCNA	49
3. Une voie de translésion indépendante de RAD18 ?	50
II. Changement de brin modèle, ou « template switching » : voie non mutagénique	50
1. Intervention de la voie non mutagénique : nature de la lésion	50

2.	Bases moléculaires de l'activation	51
a)	<i>S. cerevisiae</i> : poly-ubiquitinylation de PCNA	51
b)	Eucaryotes supérieurs	52
3.	Modèles de franchissement sans erreur d'une lésion	54
a)	Chez <i>E. coli</i> : régression de la fourche de réplication	54
b)	Chez la levure	55
i.	La régression des fourches traduit un état pathologique	55
ii.	Modèle de l'hémi-caténane	57
c)	Chez les eucaryotes supérieurs	59
D - Réparation des fourches de réplication par recombinaison		63
I.	Effondrement des fourches de réplication : apparition de cassures double brin	63
II.	Reconnaissance des cassures double brin au niveau des fourches	63
III.	Les foyers nucléaires	67
1.	Formation des foyers nucléaires	67
2.	Composition moléculaire des foyers nucléaires et fonction	67
IV.	BRCA1 et BRCA2	68
1.	BRCA1 et 2 assurent la stabilité génomique	68
2.	Rôle de BRCA1 et 2 dans la recombinaison homologue	69
a)	Après une irradiation	69
b)	Pendant la réplication	69
3.	Activité biochimique de BRCA1	70
a)	Domaine RING finger, association avec BARD1	70
b)	Fonction dans la réparation de l'ADN	72
c)	Substrats de BRCA1-BARD1	72
d)	Inactivation de BRCA1-BARD1 ?	73
E - La voie Fanconi Anemia : réponse aux pontages inter-brins		75
I.	Particularités des pontages inter-brins de l'ADN	75
II.	Prise en charge des pontages inter-brins	75
III.	Présentation de la voie FA	76
1.	FANCD2	76
2.	Complexe FA E3 ligase	77
3.	FANCI, E2 du système ?	79
4.	FANCD1 code pour la protéine BRCA2	79
5.	FANCI	80
IV.	Activation de la voie FA	80
1.	Rôle d'ATR	80
2.	Rôle de FANCM	81
V.	Fonctions de la voie FA	82
1.	Activation des points de contrôles de phase S	82
2.	Réparation des fourches de réplication	83
a)	Complexité de réparation des pontages inter-brins	83
b)	Liens entre voie FA et recombinaison homologue	83
c)	Liens entre voie FA et synthèse de translesion	85
VI.	Inactivation de la voie FA	87
VII.	Principaux points à approfondir	87
CHAPITRE 2. RESULTATS DES TRAVAUX DE THESE : REGULATIONS DE MCM7, FACTEUR DE REPLICATION DE L'ADN		89
A - Thématique de recherche		90
B - La proto-oncoprotéine Int6 régule la stabilité de MCM7		92
I.	Présentation de la protéine Int6	92
1.	Int6 est une proto-oncoprotéine	92
2.	Effets de la déplétion d'Int6 dans une lignée cellulaire humaine	93

II. Caractérisation de l'interaction entre Int6 et MCM7	93
1. Int6 interagit avec les formes poly-ubiquitinylées de MCM7	93
2. Int6 stabilise MCM7 pendant la phase S	94
3. La perte d'Int6 entraîne des défauts de réplication	95
III. Publication n°1	96
IV. Résultats complémentaires sur l'ubiquitinylation de MCM7	147
C - Identification de BRCA1 comme une E3 ligase potentielle de MCM7	150
I. Indices menant à BRCA1	150
II. BRCA1 interagit avec MCM7	151
1. Mise en évidence de l'interaction BRCA1 - MCM7	151
2. BARD1 renforce l'interaction BRCA1 - MCM7	152
3. L'inhibition du protéasome renforce l'interaction BRCA1 - MCM7	153
III. BRCA1 module l'ubiquitinylation de MCM7	154
1. La présence de BRCA1 et BARD1 stimule l'ubiquitinylation de MCM7	154
2. BRCA1 stimule l'ubiquitinylation de MCM7 sur la chromatine, mais ne modifie pas sa localisation subcellulaire	155
3. BRCA1 semble stabiliser MCM7	157
4. BRCA1 stimule l'ubiquitinylation de MCM7 intervenant après une irradiation	158
IV. Ubiquitinylation <i>in vitro</i> de MCM7 par BRCA1	159
1. Difficultés à surmonter pour mettre en place le test	159
2. Purification des composants du test	159
D - Dérégulation de MCM7 par l'oncoprotéine virale Tax	161
I. Pourquoi s'intéresser à la protéine Tax ?	161
II. Interaction entre Tax et MCM7	162
1. Confirmation des données de double hybride	162
2. Interaction entre Tax et le sous complexe MCM4,6,7	163
3. Tax n'interfère pas avec l'interaction entre Int6 et MCM7	164
III. Tax favorise la réplication de l'ADN	165
1. Construction d'une lignée FLAG-Tax	165
2. Vérification de l'interaction Tax-MCM7 dans la lignée établie	165
3. Tax interagit avec MCM7 sur la chromatine	167
4. Tax stimule l'incorporation de thymidine tritiée dans la lignée établie	167
IV. Mise en place d'un test <i>in vitro</i> de l'activité hélicase du sous complexe MCM4,6,7	168
1. Purification du sous complexe MCM4,6,7	168
2. Purification de la protéine Tax	168
3. Test de l'activité hélicase du sous complexe MCM4,6,7 humain purifié	170
CHAPITRE 3. DISCUSSION	171
A - Régulation de MCM7 lors de la réplication de l'ADN	172
I. MCM7 est soumise à une protéolyse pendant la phase S	172
II. Int6 régule la protéolyse de MCM7 pendant la phase S	176
III. Modèle possible et problèmes à résoudre	179
B - Régulation de MCM7 par BRCA1	181
I. BRCA1 interagit avec MCM7 et stimule son ubiquitinylation	181
II. BRCA1 stimule l'ubiquitinylation de MCM7 intervenant en réponse à des dommages de l'ADN	182
III. Quelle est la fonction de l'ubiquitinylation de MCM7 dépendant de BRCA1 ?	183
1. Localisation de l'ubiquitinylation de MCM7	183
2. Activations des points de contrôle, réparation de l'ADN ?	184
IV. Conclusion et perspectives immédiates	185
C - Tax dérégule-t-elle la réplication ?	187
CONCLUSION	189

ANNEXES	192
A - Publication n°2	193
B - Matériels et méthodes supplémentaires	200
I. Protéines recombinantes	200
1. Tampons utilisés et cultures cellulaires	200
2. Production de His-ubcH5c	200
a) Expression en bactéries	200
b) Purifications	201
3. Production de FLAG-MCM7 et FLAG-Tax	201
a) Expression en cellules d'insecte (lignée SF21)	201
b) Purifications	202
i. Lyse des cellules	202
ii. Colonne héparine	202
iii. Colonne anti-FLAG M2	202
4. Production du complexe MCM4,6,7	202
a) Expression en cellules d'insecte (lignée SF21)	202
b) Purifications	203
II. Test d'activité hélicase <i>in vitro</i>	203
1. Préparation du substrat	203
a) Marquage radioactif de l'oligonucléotide	203
b) Hybridation avec l'ADN de phage M13	203
2. Activité hélicase	204
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	205

ABBREVIATIONS

ADN: acide désoxyribonucléique
ADNc: ADN complémentaire
ADNr: ADN ribosomique
APC: Anaphase Promoting Complex
ARN: acide ribonucléique
ATM: Ataxia Telangiectasia Mutated
ATR: ATM and Rad3 Related
ATRIP: ATR Interacting Protein
BER: Base Excision Repair
BLM: Bloom syndrome
BRCA: Breast Cancer Associated
BRCT: BRCA1 C-Terminal
CDC: Cell Division Cycle
CDK: Cyclin Dependent Kinase
CDT1: Cdc10 Dependent Transcript 1
CHK: Checkpoint Kinase
dNTP: Déoxynucléotide triphosphate
E. coli: *Escherichia coli*
FRAP: Fluorescence Recovery After Photobleaching
GINS: Go Ichi Ni San
HECT: Homologous to E6-AP C-Terminal
MCM: MiniChromosome Maintenance
MMR: Mismatch Repair
NER: Nucleotide Excision Repair
NHEJ: Non Homologous End Joining
ORC: Origin Recognition Complex
PCNA: Proliferating Cell Nuclear Antigen
PHD: Plant HomeoDomain
préRC: prereplication Complex
RAD: radiation
RFC: Replication Factor C
RING: Really Interesting New Gene
S. cerevisiae: *Saccharomyces cerevisiae*
S. pombe: *Schizosaccharomyces pombe*
SCF: Skp-Cullin-FBox
UBD: Ubiquitin Binding Domain
WRN: Werner syndrome
X. laevis: *Xenopus laevis*

Introduction

Génome et ubiquitine

Malgré leur extrême diversité, tous les êtres vivants possèdent une caractéristique en commun : le génome. Celui-ci regroupe l'ensemble des chromosomes qui contiennent les informations permettant le développement de tout organisme, de la cellule bactérienne à l'homme. Les chromosomes sont la forme condensée de la chromatine, un ensemble formé de filaments d'ADN (l'acide désoxyribonucléique) et de protéines. Chaque filament d'ADN est en fait une double hélice constituée de deux brins d'ADN appariés antiparallèlement. Chaque brin est une chaîne, une succession de désoxyribonucléotides (dNTP). Chacun d'entre eux contient un sucre (le désoxyribose) sur lequel est fixée une base.

L'ADN contient quatre types de base : deux purines (Adénine (A) et Guanine (G)) et deux pyrimidines (Cytosine (C) et Thymine (T)). Les bases sont orientées vers l'intérieur de la double hélice d'ADN, permettant l'appariement des deux brins grâce à des liaisons de faible énergie. De plus, sur un brin donné, la succession des bases constitue un code déchiffré par la cellule : comme nous lisons un texte, la cellule « lit son ADN » selon un code génétique, dans lequel les phrases sont les gènes et les caractères les bases. Cette lecture lui permettant de synthétiser absolument toutes ses protéines, elle est fondamentale pour l'activité normale de la cellule. Le génome doit donc rester « lisible ». Pour cela, il doit être « entretenu » : la cellule doit maintenir l'intégrité de son génome, ce qui implique de faire face aux nombreuses altérations qu'il subit. Dans les cellules en division (mitotiques), cela implique en plus la duplication complète et fidèle du génome préalablement à la division cellulaire (Figure 1A).

I. Maintien de l'intégrité génomique dans les cellules mitotiques

L'ADN est une molécule chimiquement très réactive qui est constamment soumise à des agressions d'origine endogène et exogène. Les lésions causées par ces agressions induisent des mutations qui peuvent toucher des gènes essentiels et s'avérer néfastes pour la cellule. Fort heureusement, il existe toute une batterie de protéines qui organisent la réponse cellulaire aux lésions de l'ADN, en détectant et signalant leur présence à la cellule. Selon le nombre et la gravité des lésions, la cellule décide ou non de les réparer. Si la décision de réparer les lésions est prise, la cellule mitotique est capable d'arrêter temporairement son cycle jusqu'à leur élimination : ce sont les points de contrôle du cycle, qui interviennent quelle que soit la phase du cycle cellulaire (Figure 1A). Quand la cellule n'est pas capable de réparer les lésions de l'ADN, l'arrêt temporaire devient définitif et aboutit à la mort cellulaire par « suicide », l'apoptose.

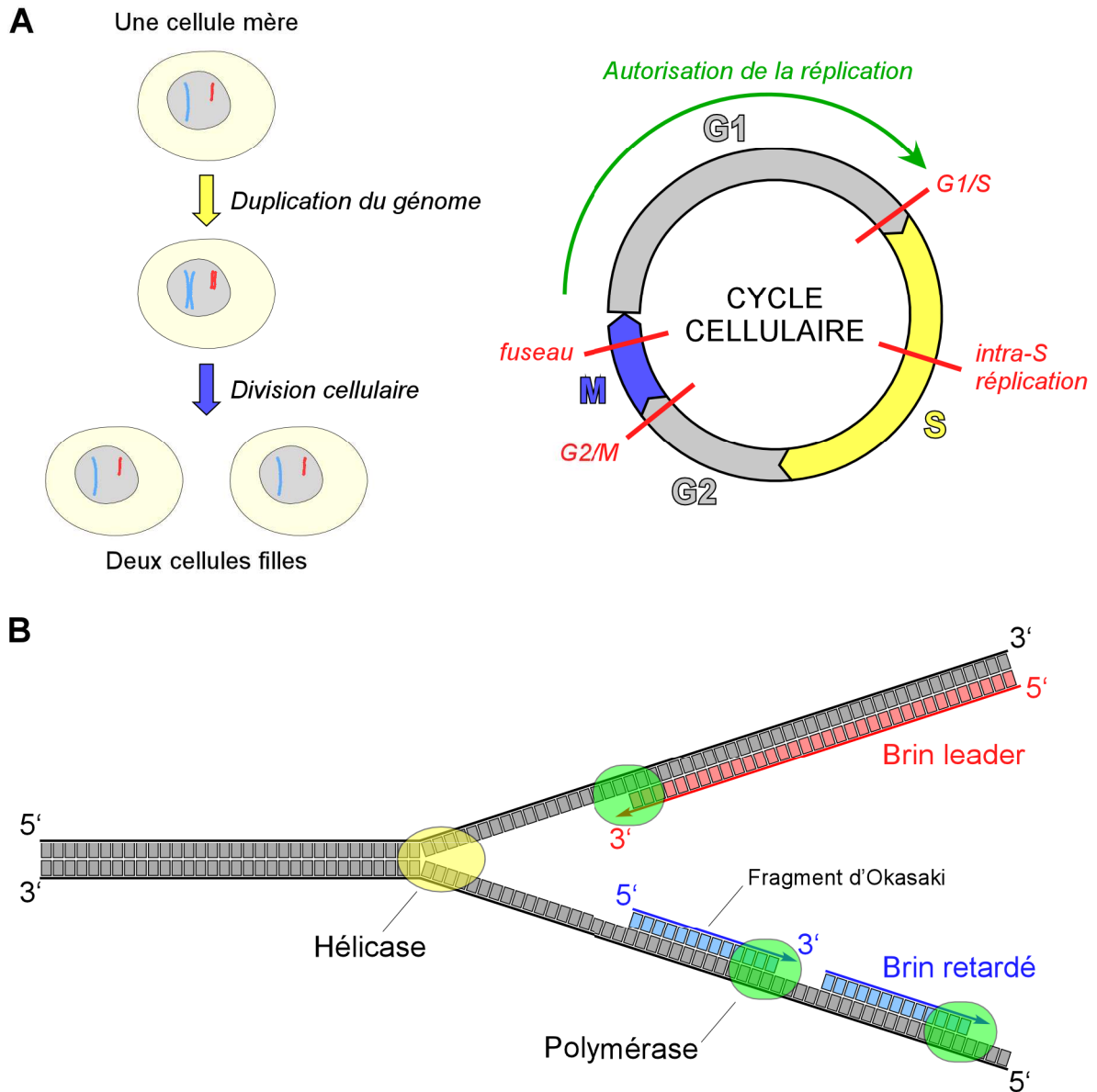


Figure 1. La réplication de l'ADN est un préalable nécessaire à la division cellulaire. (A) A gauche : la réplication de l'ADN en phase S permet la duplication complète du génome avant sa répartition, au cours de la mitose, entre les deux cellules filles. A droite: le cycle de vie d'une cellule en prolifération, ou cycle cellulaire, se décompose en quatre phases: deux phases, G1 et G2 (comme « GAP »), préparent la cellule à la réplication (ou synthèse) de l'ADN et la mitose. L'autorisation de la réplication s'effectue pendant la phase G1. Différents points de contrôle (en rouge) vérifient l'intégrité du génome au cours du cycle, dont deux sont actifs en phase S : les points de contrôle intra-S et de réplication. En mitose, le point de contrôle du fuseau mitotique vérifie l'alignement correct des chromosomes avant la division cellulaire. **(B)** Progression de la fourche de réplication. La fourche de réplication permet l'ouverture de la double hélice grâce à une activité ADN hélicase. Pour concilier la nature antiparallèle de l'ADN et la progression unidirectionnelle de la fourche ainsi que l'activité 5'-3' des ADN polymérases, un brin est synthétisé de manière continue (brin leader), l'autre de manière discontinue (brin retardé) sous forme de fragments d'Okasaki qui seront par la suite reliés entre eux.

Le maintien de l'intégrité du génome est donc en partie assuré par des mécanismes qui coordonnent prolifération cellulaire et réparation des lésions de l'ADN, et qui reposent sur l'activité de nombreuses protéines. Si l'une d'entre elles est inactivée ou altérée, la cellule devient moins sensible aux lésions de l'ADN et acquiert une capacité de prolifération plus importante. Elle va donc accumuler plus de lésions, qui sont susceptibles de toucher d'autres protéines assurant l'intégrité génomique, amplifiant encore les défaillances, etc... Ainsi, la cellule se transforme, petit à petit, pour devenir complètement aberrante et incontrôlée : c'est l'oncogenèse, à la base des cancers. Cette transformation cellulaire est favorisée par des mutations inactivant les protéines dites « suppresseur de tumeur » ou modifiant l'activité des « proto-oncoprotéines », mais aussi par l'introduction d'une oncoprotéine (d'origine virale par exemple).

La duplication du génome est une autre caractéristique importante du maintien de son intégrité. Dans les cellules mitotiques, elle a lieu lors de la phase S du cycle cellulaire et permet à la cellule de se diviser en distribuant à ses deux cellules filles l'équivalent d'un génome entier, ni plus ni moins. La réplication de l'ADN doit donc être complète, mais aussi fidèle. Elle est assurée par le réplisome, un ensemble complexe de protéines contenant les activités nécessaires à la séparation et à la copie des deux brins de la double hélice d'ADN. Le réplisome est actif au niveau des fourches de réplication (Figure 1B). Ces fourches sont multiples et leur progression couvre tout le génome, permettant sa duplication complète. Cependant, cette progression n'est pas si simple, car les fourches subissent des blocages quand elles rencontrent des lésions de l'ADN. Ces blocages des fourches peuvent aboutir à leur effondrement qui, s'il est massif, rend la terminaison de la réplication impossible. La fourche doit donc être capable de franchir toute lésion qu'elle rencontre, ou de se stabiliser le temps de sa réparation. L'ensemble des mécanismes permettant le franchissement de certaines lésions constitue la « tolérance aux dommages de l'ADN », tandis que la stabilisation des fourches nécessite l'activité du point de contrôle de réplication. Ces deux processus dépendent de la capacité des fourches de réplication à signaler au reste de la cellule les lésions qu'elles rencontrent.

Les fourches de réplication sont donc primordiales pour le maintien de l'intégrité du génome pendant la phase S. Tout en assurant sa duplication, elles signalent à la cellule ses altérations et initient des réponses dont elles sont aussi les cibles. Cela implique bien entendu une régulation stricte et complexe des protéines du réplisome, dont une apparaît aujourd'hui comme majeure : l'ubiquitylation.

II. L'ubiquitinylation : une forme complexe de régulation des protéines qui participe au maintien de l'intégrité génomique

L'ubiquitinylation est une modification post-traductionnelle des protéines au cours de laquelle est conjuguée à une protéine substrat une ou plusieurs molécules d'ubiquitine, une petite protéine de 76 acides aminés conservée chez tous les eucaryotes. Suite à une cascade de réactions enzymatiques, une molécule d'ubiquitine est liée de façon covalente au groupement amine d'une lysine de la protéine substrat : c'est la mono-ubiquitinylation. Si le processus se répète, d'autres molécules d'ubiquitine sont ajoutées, chacune étant liée via sa glycine C-terminale à une des sept lysines de l'ubiquitine précédente : c'est la poly-ubiquitinylation (Figure 2).

La première fonction de la poly-ubiquitinylation des protéines à avoir été mise en évidence est de provoquer leur dégradation par le protéasome. La poly-ubiquitinylation régule

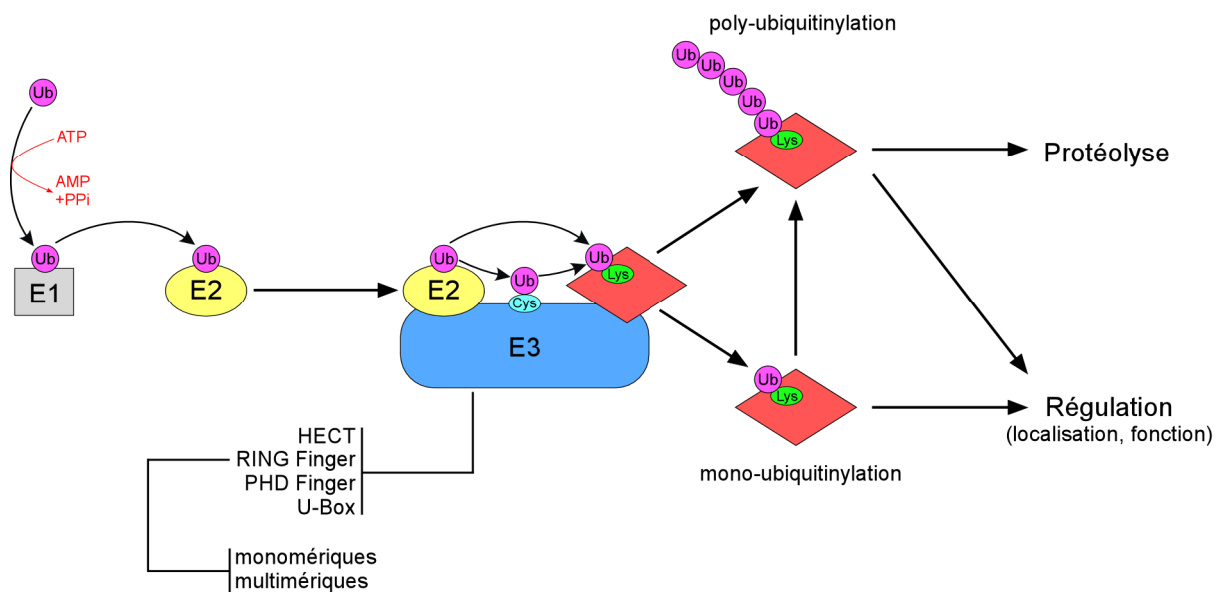


Figure 2. Ubiquitinylation des protéines. L'ubiquitine est activée par l'enzyme activatrice de l'ubiquitine, E1, puis est transférée sur une enzyme de conjugaison de l'ubiquitine, E2. L'enzyme E2 transfère l'ubiquitine activée sur une lysine de la protéine substrat (rouge) avec la coopération d'une enzyme ligase de l'ubiquitine, E3. Le transfert est direct (E3 à domaines RING Finger) ou indirect via un lien thiolester supplémentaire entre l'ubiquitine et une cystéine de l'enzyme E3 (E3 à domaines HECT). Le processus peut s'arrêter à ce stade (mono-ubiquitinylation) ou se répéter pour former une chaîne d'ubiquitines sur le substrat (poly-ubiquitinylation), en liant entre elles les molécules d'ubiquitine. Cette liaison s'effectue entre la glycine C-terminale de l'ubiquitine ajoutée et une des sept lysines de l'ubiquitine déjà liée au substrat. Lors de la dégradation ou de la désubiquitinylation du substrat, l'ubiquitine est recyclée car elle est très stable.

donc l'activité des protéines en affectant leur stabilité. Cette découverte, qui a valu à ses auteurs, Aaron Ciechanover, Avram Hershko et Irwin Rose, le prix Nobel de chimie en 2004, date des années 1980. Depuis, le nombre d'exemples de poly-ubiquitinylation non dégradative a augmenté de façon exponentielle. Il en est de même pour la mono-ubiquitinylation qui, elle, n'est jamais dégradative. Il apparaît donc que l'ubiquitinylation est un acteur important – si ce n'est le plus important – dans la régulation de l'activité des protéines.

Le pouvoir de régulation par l'ubiquitinylation repose essentiellement sur la diversité des chaînes d'ubiquitines formées (sept types possibles) et sur l'activité des enzymes E3 ligases qui déterminent le choix du substrat ubiquitinylé. En effet, elles sont très nombreuses (plusieurs centaines identifiées chez l'homme à ce jour) et agissent dans tous les compartiments subcellulaires. Tandis que certaines ont une structure monomérique simple, certaines sont multimériques, assemblées selon une architecture relativement constante au sein de laquelle chaque monomère a une fonction bien précise : assemblage du complexe, activité catalytique, reconnaissance du substrat. C'est le cas des complexes SCF^{F-Box} (Figure 3). Dans ces complexes, la protéine F-Box assure la reconnaissance du substrat, et est interchangeable avec une autre protéine F-Box, selon le contexte. Cette diversité des E3 ligases est encore amplifiée par les possibilités de réguler leur activité (phosphorylation, auto-ubiquitinylation, etc...) et leur affinité pour leur(s) substrat(s).

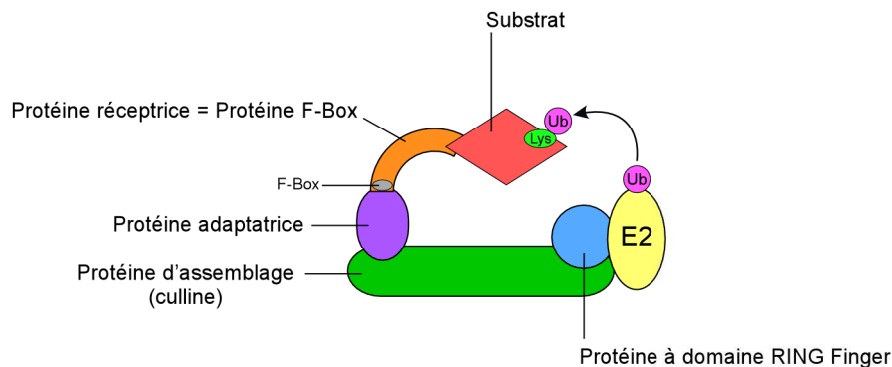


Figure 3. Enzymes E3 de type RING Finger multimériques : architecture du complexe SCF^{F-Box} . L'assemblage dépend d'une protéine d'assemblage, la culline. On connaît pour l'instant 6 sortes de culline, définissant chacune un type d'enzyme E3 multimérique. Une septième sorte de complexe est définie par APC dont l'assemblage ne dépend pas d'une culline, bien qu'il soit très proche. Dans le complexe SCF^{F-Box} décrit ici, deux protéines interagissent avec la culline: la protéine à domaine RING Finger qui assure le recrutement de l'enzyme de conjugaison (E2), et la protéine adaptatrice. Cette dernière interagit avec la protéine réceptrice du substrat, via un domaine particulier, nommé F-Box. Il existe chez les mammifères plus de 70 protéines F-Box répertoriées à ce jour, assurant la grande diversité des substrats reconnus par les enzymes E3 multimériques.

De nombreuses données récentes indiquent que l'ubiquitinylation est primordiale pour empêcher la transformation cellulaire. En effet, nombre de cancers sont dus à des défaillances de l'ubiquitinylation des protéines qui interviennent après l'inactivation ne serait-ce que d'une seule E3 ligase (pour revue : (Mani and Gelmann, 2005)). Un exemple frappant est la prédisposition des femmes aux cancers du sein et des ovaires, suite à la simple mutation du gène *brca1* qui code pour une E3 ligase active sur la chromatine. Cet exemple illustre bien l'importance de l'ubiquitinylation des protéines chromatiniques pour maintenir l'intégrité du génome. Or, cette intégrité dépend aussi, comme nous l'avons vu précédemment, de la régulation du réplisome au niveau des fourches de réplication de l'ADN.

Dans le premier chapitre de ce manuscrit, je me suis efforcé de souligner, par des exemples précis, l'importance de l'ubiquitinylation pendant la réplication de l'ADN. Nous verrons en effet que cette modification post-traductionnelle intervient dans le franchissement de certaines lésions de l'ADN par les fourches de réplication, dans l'activation du point de contrôle de réplication suite à un blocage prolongé des fourches, ainsi que dans la réparation des fourches effondrées ou bloquées par des lésions infranchissables. Le deuxième chapitre présente mes travaux de thèse qui concernent une des protéines du réplisome, MCM7. Cette protéine est une sous unité du complexe MCM (« MiniChromosome Maintenance ») qui possède l'activité hélicase catalysant l'ouverture de la double hélice d'ADN au niveau de la fourche de réplication. J'ai montré que MCM7 est régulée par poly-ubiquitinylation pendant la phase S, mais aussi en réponse à des dommages de l'ADN. Nous verrons qu'une proto-oncoprotéine, Int6, ainsi qu'un suppresseur de tumeur, BRCA1, participent à ces régulations, tandis qu'une oncoprotéine virale, Tax, pourrait altérer ces régulations. Enfin, dans un troisième chapitre, j'ai essayé d'évoquer de nouvelles pistes d'étude de l'ubiquitinylation de MCM7 en confrontant les résultats de mes travaux à d'autres données concernant l'ubiquitinylation des protéines impliquées dans la réplication et la réparation de l'ADN.

Chapitre 1

**Réponses aux lésions de l'ADN pendant
la réplication :**

**Rôles des fourches de réplication et de
l'ubiquitylation.**

A - LA FOURCHE DE REPLICATION

I. Formation du complexe de pré-réplication (préRC)

1. Origines de réplication

Les origines de réplication correspondent aux endroits où la double hélice d'ADN est ouverte en premier. Chez les eucaryotes, le nombre d'origines varie entre 10^3 et 10^5 , réparties dans tout le génome. Elles sont matérialisées par un complexe hétéro-hexamérique formé des protéines ORC1-6. Chez *S. cerevisiae*, ces protéines sont présentes sur la chromatine au niveau de séquences spécifiques (Rao and Stillman, 1995), la plupart fonctionnant *in vivo* comme des origines de réplication (Wyrick et al., 2001). Chez *S. pombe*, la spécificité des séquences faisant office d'origine de réplication est moins évidente, les protéines ORC se fixant à des régions riches en adénine et thymine, et à plusieurs sites sur chaque origine de réplication (Kong and DePamphilis, 2002; Takahashi et al., 2003). Il semblerait que la spécificité de séquence chez les eucaryotes supérieurs se limite aussi à la composition en nucléotides, étant donnée l'observation que les protéines ORC de *S. pombe* et de *X. laevis* peuvent être mise en compétition pour se fixer aux mêmes séquences riches en adénine et thymine (Kong et al., 2003). Cependant, les protéines ORC humaines sont capables, dans certaines cellules somatiques, de se fixer sur l'ADN à des sites distincts qui servent d'origines de réplication (Ladenburger et al., 2002).

2. Chargement des protéines MCM

Le complexe MCM est formé de six sous unités, MCM2-7, et est aussi connu sous le nom de complexe d'autorisation de la réplication RLF-M (Thommes et al., 1997). Le trimère formé des sous unités MCM4,6 et 7 est doté *in vitro* d'une activité hélicase, mais l'hétéro-hexamère MCM entier est nécessaire chez la levure aussi bien pour l'initiation que pour l'élongation de la réplication (Labib et al., 2000; Prokhorova and Blow, 2000). Le consensus actuel attribue le rôle d'hélicase réplivative au complexe MCM. Son association à la chromatine s'effectue lors de la phase G1 du cycle cellulaire via les protéines ORC, CDC6 et CDT1, qui agissent de concert pour ouvrir l'anneau formé des six protéines MCM et permettre son chargement au niveau des origines de réplication (Figure 4). Ce système a été

reconstitué *in vitro*, dans des extraits d'œufs de xénope, à partir des protéines ORC, CDC6, CDT1 et MCM2-7 purifiées (Gillespie et al., 2001).

Les protéines ORC et CDC6 sont des ATPases, et pourraient donc fournir, via une hydrolyse d'ATP, l'énergie requise par ce système pour charger les protéines MCM sur l'ADN. Chez l'homme, une protéine récemment identifiée, MCM8, pourrait également participer au recrutement de CDC6 sur les origines de réplication et donc à la formation du préRC (Volkening and Hoffmann, 2005). Nous verrons cependant que cette activité de MCM8 ne semble pas conservée chez tous les eucaryotes supérieurs. Quant à CDT1, elle est capable d'interagir directement avec l'hexamère MCM dans le nucléoplasme (Cook et al., 2004; Tanaka and Diffley, 2002; Yanagi et al., 2002). Elle servirait donc d'intermédiaire, via son

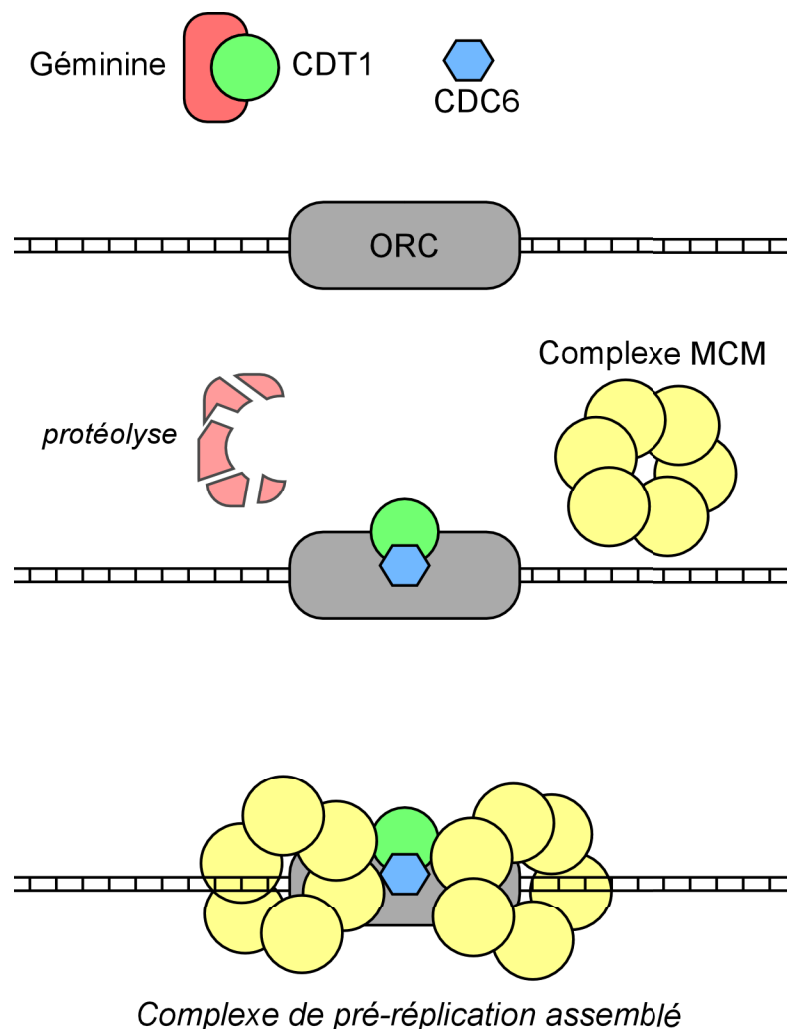


Figure 4. Formation du complexe de pré-réplication (préRC). Au cours de la phase G1, la géminine est dégradée, libérant ainsi CDT1. CDC6 et CDT1 s'associent alors à la chromatine au niveau des complexes ORC qui marquent les origines de réplication. Le complexe MCM est ensuite recruté à son tour grâce à son interaction avec CDT1.

interaction avec CDC6, pour guider le complexe au niveau des origines de réplication déjà marquées par ORC et CDC6 et former ainsi le préRC (Maiorano et al., 2000; Tsuyama et al., 2005). ORC, CDC6 et CDT1 sont donc requises pour le chargement du complexe MCM sur la chromatine au cours de la phase G1. Cependant elles ne sont pas indispensables pour le maintien sur la chromatine du complexe, une fois celui-ci chargé (Donovan et al., 1997; Hua and Newport, 1998; Maiorano et al., 2000).

3. Restriction à une seule fois par cycle cellulaire

L'avantage fourni par la présence de deux intermédiaires entre les protéines ORC et MCM, à savoir CDC6 et CDT1, est la possibilité de régulation du système. Il est nécessaire pour la cellule d'éviter une ré-initiation des origines de réplication, ce qui revient à permettre le chargement des MCM une seule fois par cycle cellulaire. Cette régulation intervient au niveau des protéines ORC1, CDC6 et CDT1.

Chez la levure, le complexe ORC entier est associé à l'ADN tout au long du cycle cellulaire, tandis que chez l'homme, ORC1 est ubiquitinylée sur la chromatine et dégradée par le protéasome après l'initiation de la réplication (Kreitz et al., 2001; Mendez et al., 2002). Cette régulation protéolytique de ORC1 empêche une origine déjà activée de ré-initier la réplication, car la présence de toutes les protéines ORC (hormis ORC6, (Gillespie et al., 2001)) est indispensable pour recruter le complexe MCM afin d'initier la réplication.

Concernant Cdc6 et Cdt1, l'importance de leur régulation est illustrée par l'observation que la surexpression de Cdc6 chez la levure entraîne une re-réplication, et que le phénomène est amplifié par la surexpression conjointe de Cdt1 (Nishitani et al., 2000). La levure contrôle l'abondance de Cdc6 et Cdt1 dans le nucléoplasme de trois façons : variation de la transcription et de la protéolyse, et export nucléaire. Ces régulations (détail dans (Blow and Dutta, 2005)) ont pour conséquence de faire varier le niveau nucléoplasmique de Cdc6 et Cdt1 au cours du cycle cellulaire pour le rendre maximal en G1 et permettre à ce moment le chargement du complexe MCM. Chez les eucaryotes supérieurs, l'essentiel de la régulation concerne CDT1 ; en effet, le niveau de CDC6 ne varie pas au cours du cycle cellulaire car elle possède d'autres fonctions indépendantes du chargement des MCM (Clay-Farrace et al., 2003). CDT1 est dégradée par le protéasome à partir de la fin de la phase G1 et en phase S (Li et al., 2003; Nishitani et al., 2001; Quinn et al., 2001; Wohlschlegel et al., 2000; Zhong et al., 2003). Nous reviendrons sur cette dégradation au cours du chapitre 3 de ce manuscrit. CDT1 est par contre stabilisée en G2 et M par une protéine absente chez la levure, la géminine. Celle-ci interagit avec CDT1 pour la protéger de l'ubiquitinylation (Ballabeni et al., 2004) et

permettre son accumulation en G2 et M, mais sous une forme inactive (Hodgson et al., 2002; McGarry and Kirschner, 1998; Tada et al., 2001; Wohlschlegel et al., 2000). La géminine est à son tour dégradée, en fin de mitose, libérant ainsi l'activité de CDT1 et permettant le chargement des MCM sur les origines de réplication (Figure 4). La géminine a donc un rôle fondamental pour empêcher la re-réplication, et c'est pourquoi sa déplétion chez la drosophile ou dans des cellules humaines entraîne une re-réplication massive de l'ADN (Melixetian et al., 2004; Mihaylov et al., 2002; Quinn et al., 2001; Zhu et al., 2004).

II. Initiation de la réplication

1. Formation du complexe d'initiation

Après la formation du préRC, l'initiation de la réplication implique l'ouverture de la double hélice d'ADN au niveau des origines de réplication autorisées et le recrutement des ADN polymérase requises pour synthétiser les nouveaux brins d'ADN. Ces processus sont assurés par l'association au niveau des origines de réplication d'un certain nombre de protéines, dont certaines n'ont été identifiées que récemment chez la levure ou le xénope. La mieux caractérisée est sans doute cdc45, conservée chez tous les eucaryotes, qui se fixe aux origines de réplication après la formation du préRC (Zou and Stillman, 1998; Zou and Stillman, 2000). La présence des MCM est nécessaire pour le recrutement de cdc45 (Mimura et al., 2000) qui s'effectue via une interaction entre cdc45 et le complexe MCM au niveau de l'origine de réplication (Aparicio et al., 1997). Cette interaction dépend de la phosphorylation de MCM2 par les kinases CDK (Zou and Stillman, 2000). Parallèlement à cdc45, d'autres protéines se fixent au niveau des origines, comme Sld3, Dpb11 ou le complexe GINS (Figure 5). Le complexe GINS (Go Ichi Ni San) maintient l'interaction entre cdc45 et le complexe MCM (Gambus et al., 2006). Tous ces protéines ne se chargent pas successivement ; au contraire, leur recrutement aux origines est inter-dépendant. Par la suite, le chargement de la polymérase α dépend de cdc45 (Zou and Stillman, 2000) tandis que Dpb11 est requise pour le chargement des polymérase α et ϵ (Masumoto et al., 2000). Cdc45 et le complexe GINS participent aussi à l'élongation de la réplication et se déplacent avec la fourche de réplication, comme le complexe MCM et les ADN polymérase, pour s'éloigner progressivement de l'origine de réplication (Kanemaki et al., 2003; Takayama et al., 2003; Tercero et al., 2000). Cependant, leur fonction biochimique exacte n'est pas encore bien connue, et on pense qu'elles pourraient servir d'auxiliaires au complexe MCM.

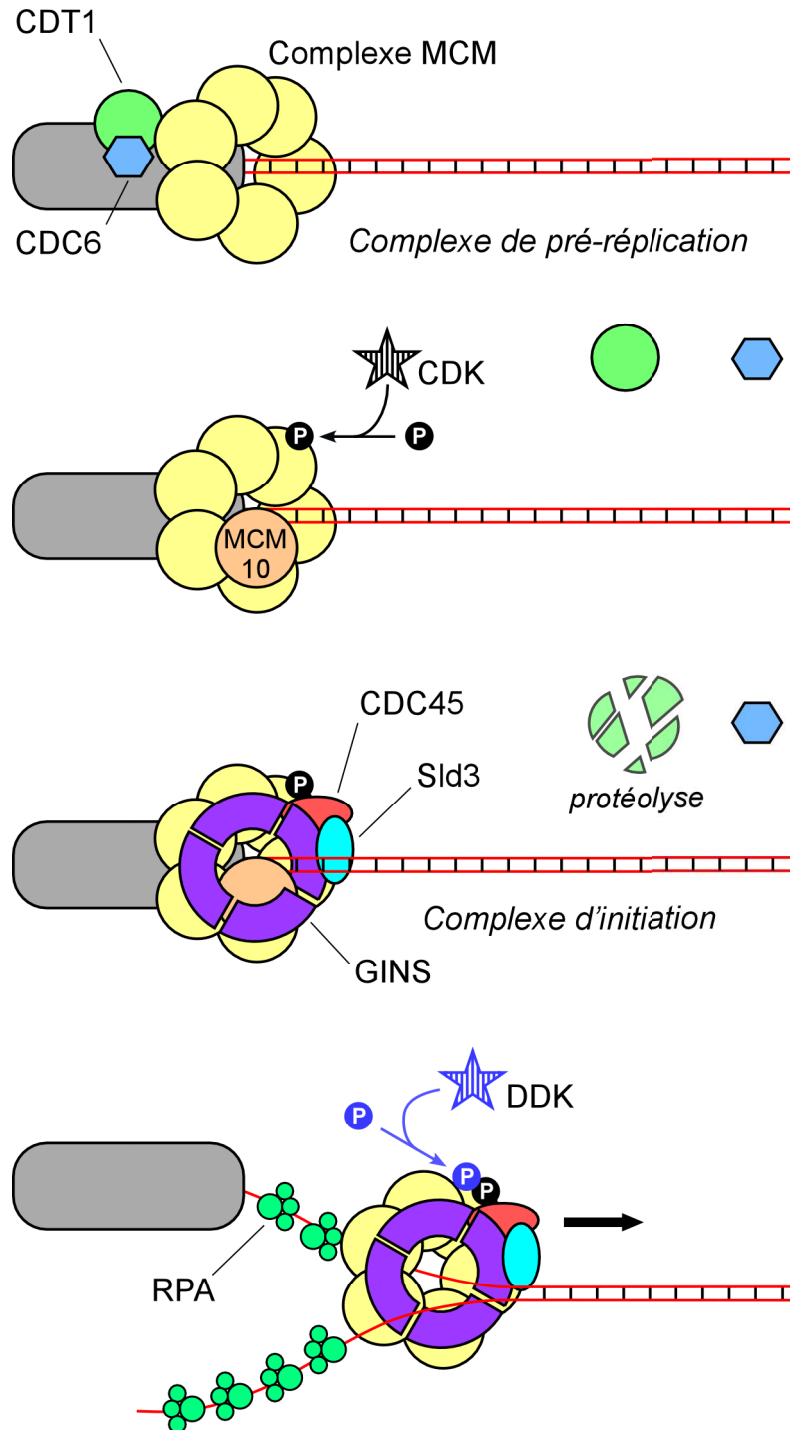


Figure 5. Initiation de la réplication chez les eucaryotes supérieurs. Après la formation du complexe de pré-réplication (voir figure 4), MCM10 est recrutée et MCM2 est phosphorylée par les kinases CDK. Cela permet le recrutement de CDC45, des quatre protéines GINS et de Sld3, pour former le complexe d'initiation de la réplication. Pendant ce temps, CDT1 est soumise à une protéolyse active, empêchant la reformation d'un complexe de pré-réplication au niveau de l'origine après l'initiation. L'ensemble MCM-CDC45-GINS est ensuite activé via une phosphorylation de MCM2 par CDC7-DBF4 (DDK) et commence à séparer la double hélice d'ADN, dont les brins sont immédiatement recouverts par RPA.

Cet enchaînement de chargements de protéines est plus ou moins similaire chez le xénope (Kubota et al., 2003), bien que tous les facteurs ne soient pas conservés, comme Dpb11. De plus, une autre protéine est requise pour le chargement de CDC45 : il s'agit de MCM10, dont la séquence est différente des six MCM formant l'hélicase réplicative. Chez le xénope, MCM10 se fixe à la chromatine après la formation du préRC et recrute cdc45 (Wohlschlegel et al., 2002), tandis que chez *S. cerevisiae*, elle participe à la formation du préRC en stabilisant les autres MCM sur l'origine de réplication, notamment via une interaction avec MCM7 (Homesley et al., 2000). De plus, MCM10 semble participer à la réplication chez *S. cerevisiae* (Das-Bradoo et al., 2006), ce qui n'est pas le cas chez l'homme (Izumi et al., 2004).

2. Activation des MCM et recrutement du complexe polymérase α / primase

Le démarrage de la réplication dépend de l'activation du complexe MCM, qui a lieu après la phosphorylation de MCM2 par la kinase DDK (Dbf4 Dependent Kinase) (Jiang et al., 1999), formée de CDC7 et de sa sous unité régulatrice DBF4, toutes deux conservées chez les eucaryotes. L'ADN simple brin qui apparaît suite à l'ouverture de la double hélice permet le recrutement de RPA et du complexe polymérase α / primase, via une interaction de celui-ci avec CDC45 et RPA (Mimura and Takisawa, 1998; Pollok et al., 2003; Uchiyama et al., 2001). Chez le xénope, le recrutement de RPA puis de la polymérase α nécessite la présence de MCM8 qui est chargée sur la chromatine au moment de l'initiation de la réplication (Maiorano et al., 2005). MCM8 intervient ainsi après l'initiation de la réplication, tandis que chez l'homme, elle interviendrait plutôt avant l'initiation. Une fois recrutée, la primase synthétise un fragment d'ARN d'environ 10 nucléotides de long puis la polymérase α un fragment d'ADN d'environ 30 nucléotides (Mizuno et al., 1999). La faible processivité de la polymérase α implique qu'elle soit ensuite remplacée par les polymérases δ et ϵ .

3. Recrutement des ADN polymérases réplcatives

Le remplacement de la polymérase α est assuré par PCNA, une protéine homotrimérique qui est chargée au niveau de la jonction entre l'oligonucléotide synthétisé par la polymérase α et le brin parental (Figure 6). PCNA formant un anneau, son ouverture est requise pour son chargement. Cette ouverture est assurée par le complexe RFC, formé de cinq sous unités et doté de l'activité ATPase nécessaire au changement de conformation de PCNA. RFC et PCNA assurent donc conjointement le remplacement de la polymérase α par les

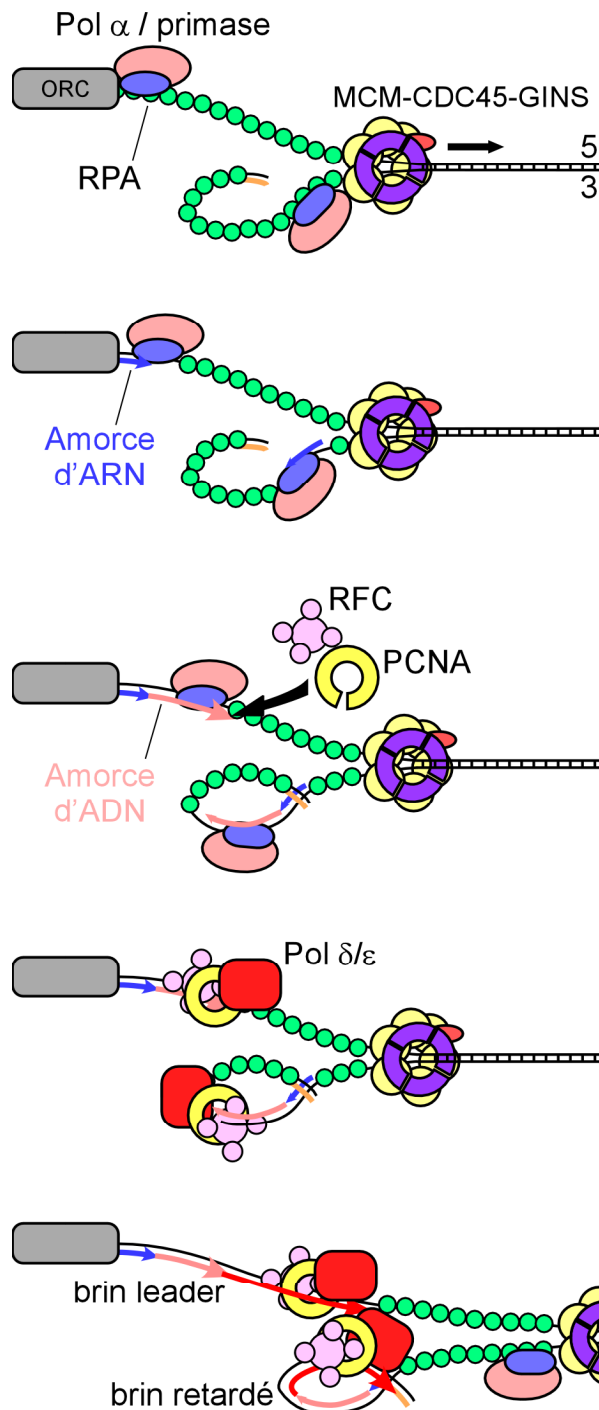


Figure 6. Modèle de progression de la fourche de réplication. Le recouvrement par RPA de l'ADN simple brin résultant de l'ouverture de la double hélice permet le recrutement du complexe polymérase α / primase. La primase synthétise une amorce d'ARN, puis la polymérase α une amorce d'ADN. PCNA est ensuite recrutée au niveau de la jonction entre ADN double brin et ADN simple brin grâce à l'hydrolyse d'ATP par RFC. Celle-ci produit l'énergie nécessaire à l'ouverture de l'anneau formé par les trois monomères de PCNA. PCNA permet ensuite le recrutement de la polymérase répliquative et assure sa processivité lors de la réplication du brin parental. La poursuite de la synthèse du brin retardé nécessite une répétition de ces mécanismes, les polymérases n'étant capables de synthétiser l'ADN que dans la direction 5'-3'.

polymérase répliquative à proprement parler (Maga et al., 2000; Mossi et al., 2000). Les deux brins de l'ADN étant antiparallèles, et les polymérase n'étant capables de synthétiser l'ADN que dans la direction 5'-3', ce processus de remplacement se répète sur le brin retardé, dont la synthèse est discontinue, sous forme de fragments successifs (dits « d'Okasaki ») qui sont ensuite reliés pour former le brin néo-synthétisé continu (Figures 1B et 8). PCNA, outre son rôle dans le chargement des polymérase répliquative, assure aussi leur processivité. De plus, elle possède de nombreux interacteurs (pour revue : (Maga and Hubscher, 2003)) et coordonne d'autres processus relatifs à la maintenance de l'ADN, dont sa réparation ou sa réplication en présence de lésions (cf. partie C).

III. Blocages de la fourche de réplication

Après sa mise en place et son démarrage, la fourche de réplication peut répliquer plusieurs milliers de bases avant de rencontrer une fourche convergente, provenant du « réplicon » adjacent (le réplicon correspond à la région d'ADN en cours de synthèse délimitée par deux fourches de réplication divergentes). Cependant, son parcours est « semé d'embûches » car des obstacles peuvent interférer avec sa progression et la ralentir, voire la bloquer (Tableau 1). Un ralentissement de la fourche peut intervenir lorsqu'elle traverse un site dit « fragile » du génome, sans qu'aucune lésion de l'ADN ne soit présente. Par ailleurs, des lésions entraînent un blocage de la fourche plus ou moins long, avec soit un franchissement rapide (cf. partie C) soit une activation du point de contrôle de réplication qui maintiendra l'intégrité de la fourche en attendant la réparation de l'ADN (cf. partie B).

1. Blocage de la fourche de réplication en absence de lésion de l'ADN

Les sites « fragiles » du génome correspondent à des zones où la réplication est ralentie, voire stoppée. Ce ralentissement peut être dû à la nature même du segment d'ADN répliqué : on parle alors de zone de réplication lente (Cha and Kleckner, 2002). Il existe aussi des barrières à la réplication formées par des protéines fortement associées à l'ADN. L'exemple le plus classique est celui de la protéine Fob1 qui, chez *S. cerevisiae*, a pour fonction programmée de bloquer les fourches de réplication au niveau des répétitions d'ADN_r (Kobayashi and Horiuchi, 1996; Takeuchi et al., 2003). Ce blocage est destiné à éviter les collisions entre les fourches de réplication et la machinerie de transcription ; ces collisions doivent être évitées pour empêcher des blocages encore plus longs des fourches de

Tableau 1. Entraves à la progression des fourches de réplication.

	Obstacle rencontré	Origine	Point de contrôle
Blocage en absence de lésion	Site fragile : - complexe ADN-protéines - zone lente	Endogène	Activité basale du PCR
	Structure secondaire		
Blocage en présence de lésions	Base altérée : - modification - ablation	Endogène / exogène	Activation du PCR
	Pontage intrabrin	Exogène	Activation du PCR
	Pontage interbrins	Exogène	Activation du PCR, mais faible
Effondrement	Clivage	Endogène	Activation du PCIS
	Cassure simple ou double brin	Endogène / exogène	

PCR : point de contrôle de réplication ; PCIS : point de contrôle intra-S.

réplication, qu'on observe par exemple au niveau des gènes codant les ARNt (Deshpande and Newlon, 1996). Par ailleurs, certaines structures secondaires de l'ADN sont aussi une cause de ralentissement des fourches de réplication. C'est notamment le cas des structures en épingle formées par l'ADN dans les régions contenant des séquences répétées (Lemoine et al., 2005).

Le point commun entre ces obstacles à la réplication, outre leur origine endogène, est leur capacité à bloquer à la fois l'hélicase répllicative (MCM) et les ADN polymérasés. Ils n'entraînent donc pas l'activation à proprement parler du point de contrôle de réplication, qui nécessite un découplage entre ces enzymes afin d'exposer de l'ADN sous forme simple brin (cf. partie B). Cependant, l'activité basale des composants du point de contrôle de réplication est nécessaire pour le maintien de l'intégrité des fourches de réplication confrontées à ces ralentissements.

2. Blocage de la fourche de réplication suite à une lésion de l'ADN

De par sa structure et sa composition chimique, l'ADN est une molécule chimiquement réactive, cible d'agents génotoxiques d'origine endogène ou exogène. Les agents génotoxiques endogènes sont principalement les radicaux libres produits par le métabolisme mitochondrial. Ils peuvent modifier les bases par des réactions d'oxydation ou par l'ajout de groupements méthyles par exemple. De telles modifications des bases

provoquent un blocage des ADN polymérase qui sont incapables de les prendre en charge. De la même manière, les polymérase sont bloquées lorsqu'elles atteignent un site abasique de l'ADN, apparu spontanément ou après l'action de la voie de réparation par excision de base (BER).

Par ailleurs, nombre d'agents environnementaux sont capables d'endommager l'ADN. C'est le cas des radiations ionisantes ou ultra-violet (UV). Les premières induisent des cassures double brin de l'ADN qui causent l'effondrement des fourches de réplication lorsqu'elles les rencontrent. De tels effondrements interviennent aussi après le passage de la fourche de réplication à travers une cassure simple brin de l'ADN (Figure 17). Les radiations UV peuvent, quant à elles, générer des radicaux libres dans la cellule, qui auront les mêmes conséquences que les radicaux libres d'origine endogène. De plus, elles forment dans l'ADN des structures particulières pontant deux thymine voisines du même brin. Ces pontages intra-brin bloquent les ADN polymérase, dont le site actif est trop étroit pour accommoder deux bases en même temps. Par contre ils n'ont aucun effet sur la progression de l'hélicase répllicative. Ainsi, s'ils ne sont pas franchis rapidement grâce à des polymérase spécialisées (cf. partie C), les pontages intra-brin induits par les UV entraînent l'activation du point de contrôle de réplication (Neecke et al., 1999), car ils provoquent une accumulation d'ADN simple brin au niveau de la fourche de réplication. Le cas des pontages inter-brins produits par des agents comme la cisplatine ou la mitomycine D est moins évident. Ces lésions bloquent non seulement les polymérase mais aussi l'hélicase et nécessitent une voie de réparation particulière qui dépend entièrement de leur rencontre par une fourche de réplication (cf. partie E). Ils sont cependant capables d'entraîner une certaine activation du point de contrôle de réplication (Pichierri and Rosselli, 2004).

B - BLOCAGE DE LA FOURCHE : POINT DE CONTROLE DE REPLICATION

I. Activation du point de contrôle de réplication

1. Quand et pourquoi ?

Le point de contrôle de réplication est activé en réponse à un blocage prolongé des fourches de réplication (Paulovich and Hartwell, 1995), la plupart du temps suite à une rencontre avec des lésions de l'ADN. Ces lésions peuvent avoir été introduites directement en phase S, ou plus tôt dans le cycle. Dans ce dernier cas, elles auraient échappé au point de contrôle G1/S, comme c'est par exemple le cas pour les pontages inter-brins difficilement reconnaissables par la cellule en dehors de la réplication. Quelle qu'en soit l'origine, l'activation du point de contrôle de réplication va donner du temps à la cellule pour réparer les lésions de l'ADN avant de relancer les fourches de réplication (Figure 7). De plus, la réplication consommant beaucoup d'énergie, le point de contrôle veille aussi à l'état de l'environnement extérieur. Par exemple, il est activé quand les cellules sont en situation d'hypoxie, même en absence de dommages de l'ADN (Hammond et al., 2002; Hammond et al., 2003). Un autre point de contrôle est activé en phase S en réponse à des cassures double brin hors des fourches : c'est le point de contrôle intra-S, que nous ne détaillerons pas dans cette étude. L'activation du point de contrôle de réplication dépendant essentiellement d'un blocage des fourches, il est possible de la provoquer par une inhibition des composants du réplisome. Deux drogues sont fréquemment utilisées pour ce faire : l'hydroxyurée, qui provoque une déplétion des dNTP en inhibant la ribonucléotide réductase, et l'aphidicoline, qui inhibe les ADN polymérase.

2. Notion de seuil

Le paramètre important à considérer lors de l'activation du point de contrôle de réplication est la durée du blocage subi par les fourches de réplication, pour deux raisons. Certaines lésions peuvent être franchies par les fourches de réplication sans nécessiter de réparation particulière (cf. partie C) ; l'activation du point de contrôle est donc inutile dans ce cas. Par contre, certaines lésions ne peuvent pas être franchies facilement par les fourches de réplication, ce qui implique une réparation afin de relancer ces dernières.

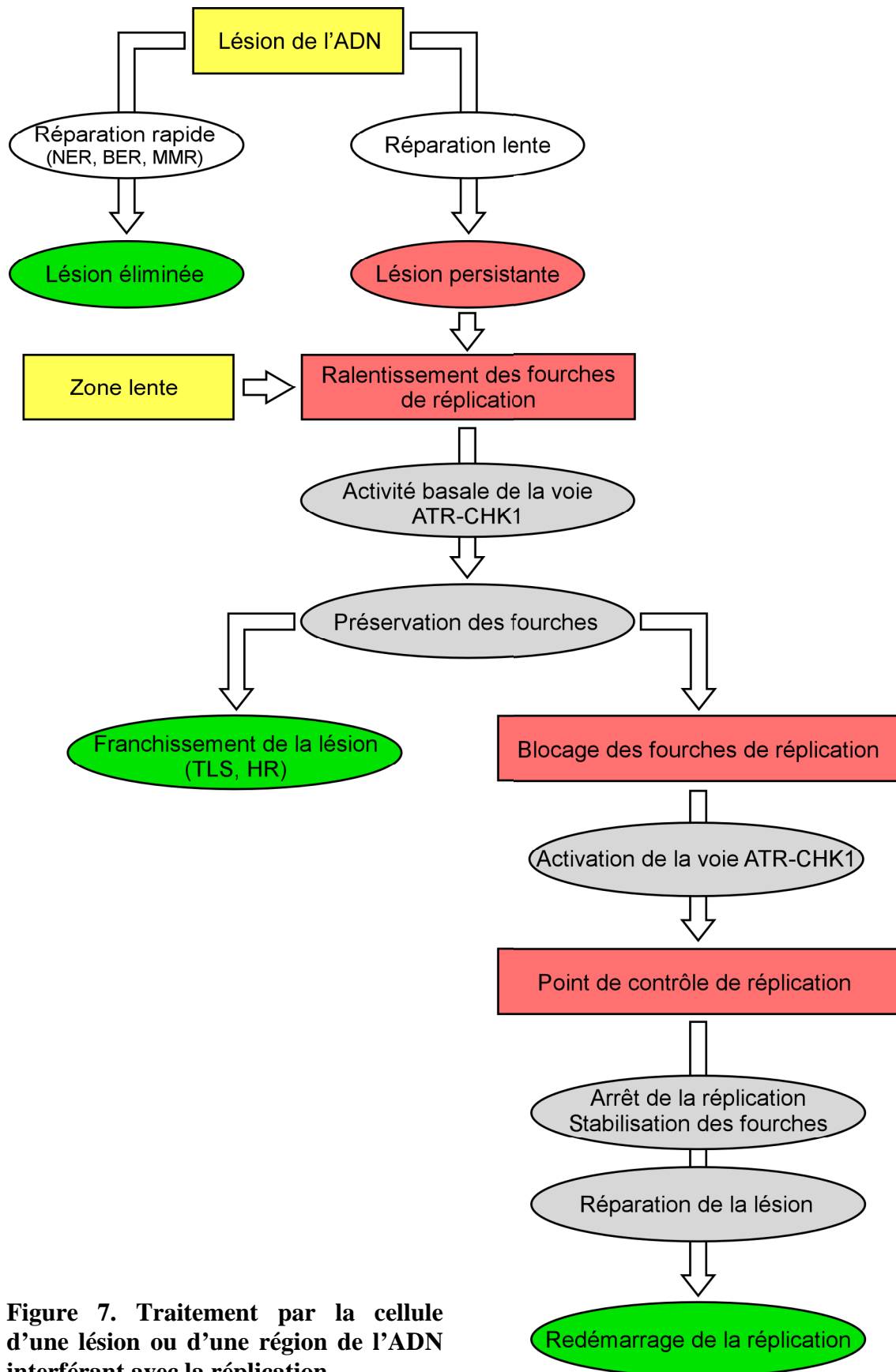


Figure 7. Traitement par la cellule d'une lésion ou d'une région de l'ADN interférant avec la réplication.

En phase S normale, les fourches de réplication peuvent être amenées à ralentir leur progression à certains sites du génomes, dits « sites fragiles » (Deshpande and Newlon, 1996; Takeuchi et al., 2003), que nous avons décrit précédemment. Là encore, l'activation intempestive du point de contrôle entraînerait un ralentissement considérable du cycle cellulaire. Ceci implique qu'un seuil d'activation existe. Ce seuil est mis en évidence par un traitement à l'hydroxyurée : il y a en effet une corrélation entre le nombre de fourches actives au moment du traitement et l'intensité du point de contrôle (Shimada et al., 2002). Cela signifie que suite à un blocage des fourches de réplication, le signal mais aussi le seuil d'activation du point de contrôle partent des fourches bloquées elles-mêmes.

3. Mécanismes moléculaires de l'activation

Il a été montré que l'ADN simple brin, quand il s'accumule aux fourches de réplication, constitue un signal d'activation du point de contrôle de réplication (Costanzo et al., 2003; Garvik et al., 1995). Chez *S. cerevisiae*, une cellule en réplication normale peut accumuler une longueur de 300 nucléotides d'ADN simple brin ; un traitement des cellules à l'hydroxyurée provoque une augmentation de cette longueur à environ 500 nucléotides pour activer le point de contrôle. Cette longueur serait atteinte à partir d'environ 50 fourches de réplication bloquées (Sogo et al., 2002).

L'ADN simple brin généré au niveau des fourches de réplication est recouvert par RPA (cf. partie A). Logiquement, l'accumulation entraîne une accumulation corrélée de RPA au niveau des fourches (Byun et al., 2005; Tercero et al., 2003; Zou and Elledge, 2003). En utilisant un système « cell free » dérivé d'œufs de Xénope, Byun et al. ont montré que cette accumulation d'ADN simple brin et de RPA au niveau de la fourche nécessite un découplage entre l'hélicase répllicative MCM et les ADN polymérasés.

L'ADN simple brin recouvert par RPA permet de recruter non seulement la kinase ATR via sa sous unité régulatrice ATRIP (Zou and Elledge, 2003), mais aussi le complexe RAD17-RFC(2-5) qui à son tour recrute le complexe RAD9-RAD1-HUS1 (complexe 911) (Zou et al., 2002) (Figure 8). Ce type de recrutement est analogue à celui de PCNA par RFC (cf. partie A). Les fixations sur la chromatine du complexe 911 et d'ATR sont indépendantes, mais toutes deux nécessaires pour une pleine activation du point de contrôle (Zou et al., 2002). Ces

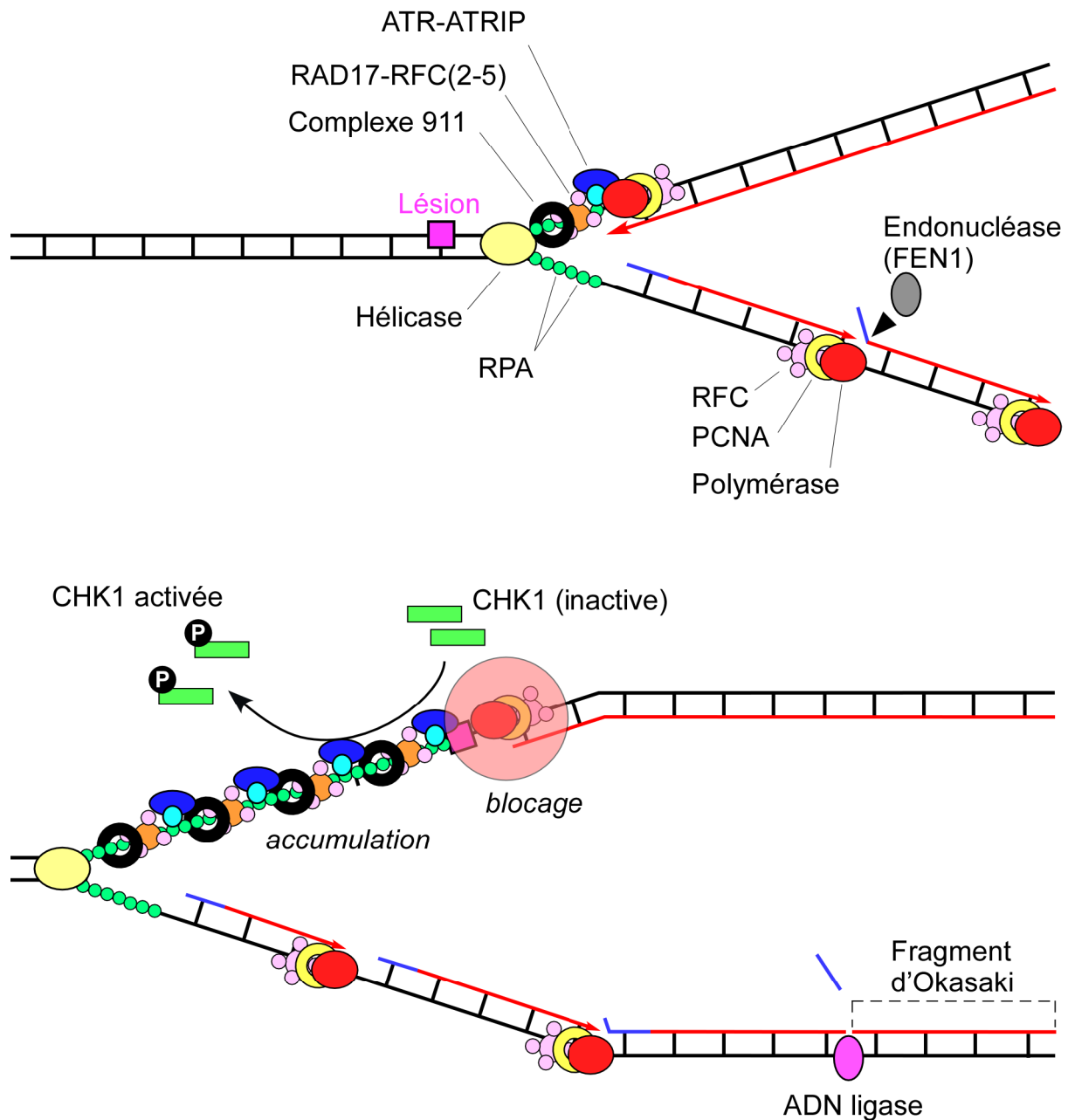


Figure 8. Activation du point de contrôle de réplication par la voie ATR-CHK1. La synthèse du brin retardé se fait de manière discontinue, sous la forme de fragments d'Okasaki. La polymérase répliquative déplace, lorsqu'elle la rencontre, l'amorce d'ARN synthétisée par la primase. Cette amorce est ensuite clivée par l'endonucléase FEN1, puis les fragments d'Okasaki sont ligués par une ADN ligase. Si une lésion est présente en face du brin retardé, elle n'entraînera donc pas de blocage de la fourche. Par contre, la rencontre d'une lésion par le brin leader provoque le blocage de la polymérase et son découplage de l'hélicase. Ce découplage entraîne une accumulation au niveau de la fourche d'ADN simple brin et de RPA, augmentant le recrutement des complexes ATR-ATRIP, RAD17-RFC(2-5) et RAD9-RAD1-HUS1 (911), qui s'associent constitutivement à la fourche de réplication via RPA. Leur accumulation permet la phosphorylation de CHK1 par ATR et l'activation du point de contrôle de réplication.

protéines font partie de la catégorie des détecteurs parmi les nombreuses protéines impliquées dans l'activation du point de contrôle de réplication (Tableau 2), qui se traduit par la phosphorylation de la kinase CHK1 par ATR, sur deux sérines situées dans la partie C-terminale de CHK1 (Bao et al., 2004). La phosphorylation par ATR et l'activation de CHK1 après un stress répliatif requièrent aussi la présence d'une protéine médiatrice, la claspine (Guo et al., 2000; Lin et al., 2004). Enfin, chez l'homme, MCM7 participerait aussi à l'activation du point de contrôle de réplication, grâce à des interactions avec RAD17 d'une part (Tsao et al., 2004), et ATRIP d'autre part (Cortez et al., 2004).

4. Activité basale du point de contrôle

La claspine est chargée sur la chromatine indépendamment de RPA (Lee et al., 2003) et participe aussi à la réplication normale en absence de stress, car sa suppression cause une baisse de la prolifération cellulaire (Lin et al., 2004). Comme la claspine, les protéines du point de contrôle de réplication (comme ATR ou les complexes RAD17-RFC(2-5) et 911) sont associées aux fourches en progression en absence de stress répliatif ; ceci caractérise l'activité basale du point de contrôle de réplication, qui intervient lors des ralentissements ou des blocages transitoires des fourches de réplication. Lorsqu'un blocage prolongé survient, c'est leur accumulation qui permet l'activation du point de contrôle de réplication, expliquant ainsi la notion de seuil évoquée plus haut.

5. Limitations au modèle d'activation du point de contrôle

Le modèle d'activation du point de contrôle de réplication que nous venons de décrire repose sur l'accumulation de RPA au niveau des fourches bloquées, suite à un découplage entre le complexe MCM et les ADN polymérasés. Dans ce cas, comment expliquer la légère activation du point de contrôle suite à un traitement des cellules par des agents pontant de l'ADN (Pichierri and Rosselli, 2004)? En effet un pontage inter-brins est supposé bloquer aussi l'hexamère MCM, et en théorie ne pas provoquer l'accumulation d'ADN simple brin. On peut penser que c'est la prise en charge des fourches bloquées par des pontages inter-brins qui entraîne cette accumulation d'ADN simple brin, déclenchant ainsi le point de contrôle. C'est par exemple le cas pour certaines lésions induites par les UV, dont les intermédiaires de réparation génèrent de l'ADN simple brin reconnu par RPA et ATR (Zou and Elledge, 2003). Cependant, il existe pour les pontages inter-brins une voie spécifique que nous détaillerons plus loin, la voie Fanconi Anemia, qui semble être responsable de

l'activation du point de contrôle de réplication lorsque les fourches de réplication rencontrent de tels pontages.

D'autres données chez *S. cerevisiae* sont aussi en contradiction avec le modèle énoncé précédemment. En effet, des mutants pour la grande sous unité de RPA, Rpa1, ne sont que partiellement déficients pour l'activation du point de contrôle de réplication (Lucca et al., 2004). Cette observation est à relier avec celle montrant que les ADN polymérases α et ϵ sont toutes les deux requises pour activer ce point de contrôle (Bhaumik and Wang, 1998; Navas et al., 1995; Tan and Wang, 2000). Leur fonction, tout du moins pour la polymérase ϵ , pourrait reposer sur la partie C-terminale de la sous unité catalytique de l'holoenzyme. En effet, ce domaine est dépourvu d'activité catalytique, mais est nécessaire pour la viabilité des levures (Feng and D'Urso, 2001). On peut ainsi imaginer une deuxième voie d'activation du point de contrôle via une détection directe du blocage des fourches par les polymérases. Cette voie pourrait coopérer avec la voie ATR-CHK1 pour une réponse complète à un stress réplcatif.

II. Fonctions du point de contrôle de réplication

1. Stabilisation des fourches de réplication

a) Activité basale et activation du point de contrôle

Le point de contrôle de réplication doit permettre la réparation des lésions de l'ADN ayant provoqué le blocage des fourches de réplication. Pendant cette réparation, les fourches doivent rester intègres avant d'être relancées. En effet, une perte massive des fourches de réplication serait désastreuse pour la cellule, ne permettant pas la fin de la phase S. Des travaux récents conduits chez *S. cerevisiae* laissent penser que la stabilisation des fourches de réplication bloquées est le moyen principal utilisé par le point de contrôle de réplication pour maintenir la viabilité cellulaire, en comparaison de ses autres fonctions (Lopes et al., 2001; Tercero and Diffley, 2001; Tercero et al., 2003).

Il faut garder à l'esprit l'activité basale du point de contrôle, car elle joue un rôle primordial. En effet, lorsque les fourches arrivent à des sites fragiles du génome, elles ralentissent et doivent être stabilisées. Cette stabilisation est assurée chez la levure par l'activité basale du point de contrôle de réplication, via les homologues fonctionnels d'ATR et CHK1, Mec1 et Rad53 (Cha and Kleckner, 2002). Lorsque les fourches subissent un blocage massif, c'est la même activité, au niveau moléculaire, qui intervient. On passe alors d'une activité basale à une pleine activité, mais les mécanismes moléculaires sont sensiblement les mêmes.

Tableau 2. Facteurs impliqués dans les points de contrôle chez les eucaryotes.

Classe	<i>S. cerevisiae</i>	<i>S. pombe</i>	Mammifères
Détecteurs	Rad24-(Rfc2-5)	Rad17-(Rfc2-5)	RAD17-(RFC2-5)
	Ddc1	Rad9	RAD9
	Mec3	Hus1	HUS1
	Rad17	Rad1	RAD1
	Mec1 Ddc2/Piel/Lcd1	Rad3 Rad26	ATR ATRIP
	Tel1	Tel1	ATM
Médiateurs	Rad9	Crb2	BRCA1
	Mrc1	Mrc1	Claspine
	Dpb11	Cut5	TopBP1
			MDC1 53BP1
Effecteurs	Rad53	Cds1	CHK2
	Chk1	Chk1	CHK1

Chez les levures mutées pour Rad53, le point de contrôle de réplication n'est pas fonctionnel, même si l'on considère son activité basale. On constate chez ces mutants une accumulation de structures aberrantes, dites en « chicken foot », dues à la régression des fourches de réplication ralenties ou bloquées (Sogo et al., 2002). L'apparition de ces structures ressemblant à des jonctions de Holliday dépend de deux événements : la fuite du réplisome, puis le changement de conformation de la fourche, via l'activité recombinase de Rad51 (Figure 9). L'activité du point de contrôle de réplication s'exerce donc à ces deux niveaux.

b) Stabiliser le réplisome

Des levures traitées à l'hydroxyurée, donc subissant un blocage de la réplication, ont toujours la capacité de redémarrer la réplication une fois le bloc levé. Pendant un blocage de la réplication, PCNA peut quitter la chromatine, mais est capable de s'y recharger avant le redémarrage de la réplication (Dimitrova and Gilbert, 2000). Une étude a montré que les polymérase α et ϵ sont stabilisées aux fourches bloquées, non pas grâce à l'activation de Rad53, mais grâce à l'activité de Mec1, l'homologue fonctionnel d'ATR (Cobb et al., 2003). Les auteurs n'ont pas étudié le cas des MCM, mais il est clair que celles-ci doivent aussi être stabilisées aux fourches car elles ne peuvent pas être rechargées sur la chromatine durant la phase S (cf. partie A). Si la perte des MCM intervient à quelques fourches, on peut penser que les réplicons adjacents se chargeront de terminer la réplication. Cependant, en cas de blocage

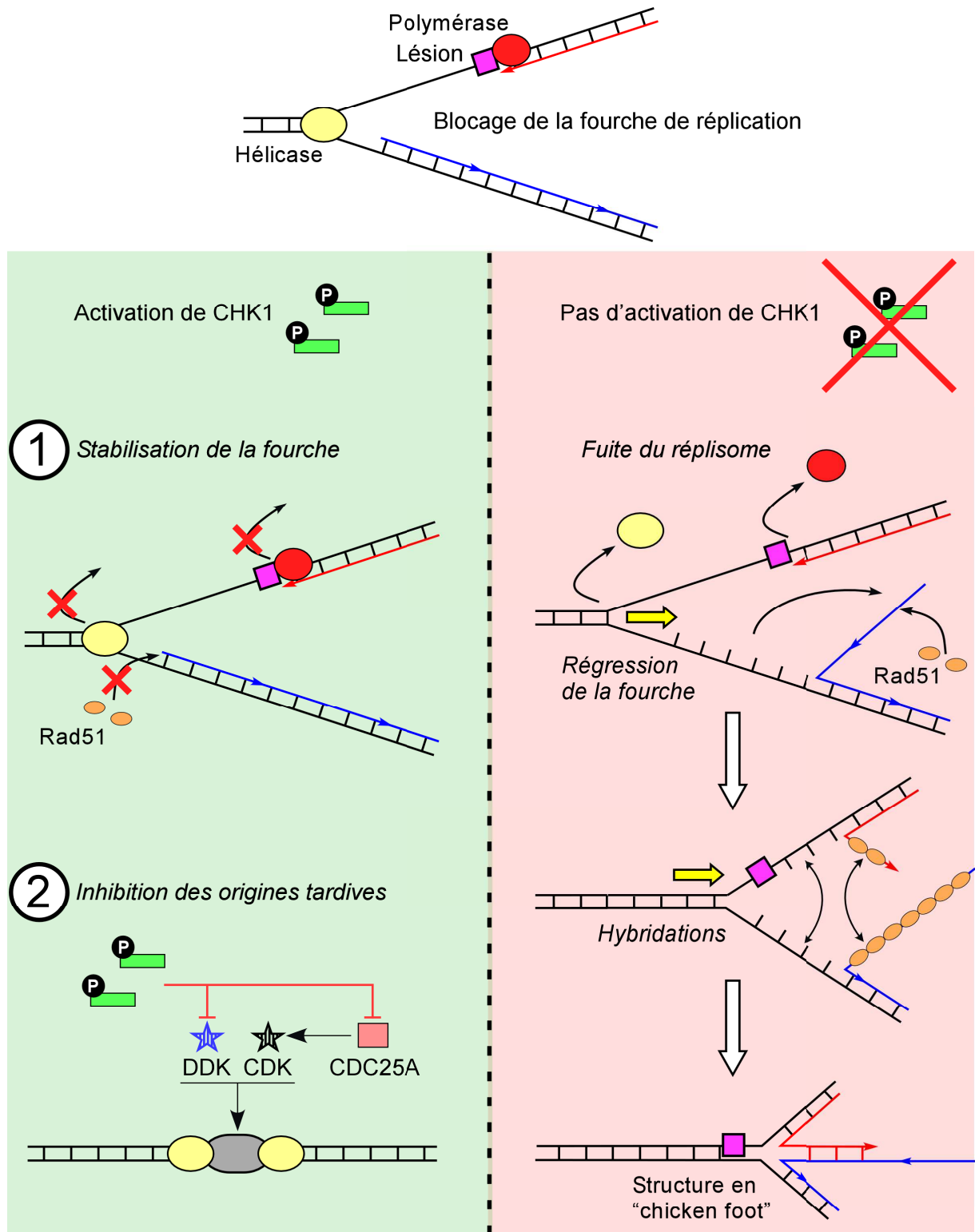


Figure 9. Conséquences du blocage des fourches de réplication. En présence d'un point de contrôle actif, les fourches de réplication sont stabilisées, prévenant ainsi toute fuite du réplisome. De plus, l'activité de la kinase DDK et de la phosphatase CDC25A, qui active les kinases CDK, est réprimée. Cela entraîne une inhibition des origines de réplication encore non activées. En absence de point de contrôle actif, le réplisome quitte les fourches qui ont tendance, avec l'activité de Rad51, à régresser pour former des structures aberrantes.

massif des fourches lors d'un traitement des cellules à l'hydroxyurée, le point de contrôle de réplication doit stabiliser, en plus des polymérase, les MCM. En effet, une perte des MCM à toutes les fourches impliquerait une incapacité des cellules à relancer la réplication après la levée du blocage et la fin du point de contrôle de réplication. Il a été montré par exemple que chez la souris, MCM4 est phosphorylée par des composants du point de contrôle de réplication sur des résidus importants pour l'activité hélicase du complexe MCM (Ishimi et al., 2003). Ceci peut expliquer l'inhibition des MCM aux fourches actives et inactives, mais ne met pas en lumière le mécanisme de stabilisation exact des MCM par le point de contrôle de réplication. Une étude chez *S. cerevisiae* a montré que Mrc1, l'homologue fonctionnel de la claspine, pourrait via sa phosphorylation par Mec1 et son interaction avec les MCM, stabiliser le complexe MCM jusqu'à la fin du blocage de la réplication (Nedelcheva et al., 2005). C'est peut-être un début d'explication ; cependant, aucune fonction de la claspine en rapport avec les MCM n'a pour l'instant été montrée chez les vertébrés.

c) Conserver la topologie des fourches : empêcher la recombinaison

Le blocage des fourches de réplication engendre une accumulation d'ADN simple brin qui constitue un site de recrutement pour RPA pour activer le point de contrôle de réplication. Cependant, la recombinaise Rad51, qui permet l'invasion de brin lors de la réaction de recombinaison homologue (Sung, 1994), a aussi de l'affinité pour l'ADN simple brin. On imagine aisément que des événements de recombinaison aux fourches de réplication sont susceptibles de créer des structures aberrantes n'ayant plus rien à voir avec des fourches. Il est donc nécessaire pour la cellule d'empêcher la recombinaison quand les fourches bloquées ne sont pas endommagées. Ainsi, pour assurer leur topologie, un point de contrôle de réplication fonctionnel ne permet pas aux fourches de réplication bloquées d'accumuler des intermédiaires de recombinaison (Sogo et al., 2002). Ceci s'observe suite à un traitement à l'hydroxyurée chez *S. cerevisiae*, où les protéines de recombinaison comme Rad51 ne sont pas recrutées aux fourches bloquées à moins qu'elles ne se soient effondrées (Lisby et al., 2004). Cela montre que le point de contrôle de réplication veille à maintenir la stabilité de la fourche lorsqu'elle est bloquée ou ralentie, mais que par la suite, la recombinaison peut être nécessaire pour réparer la fourche ayant été endommagée (cf. partie D).

La cellule dispose de plusieurs moyens pour limiter les réactions de recombinaison inutiles au niveau des fourches de réplication. Chez *S. cerevisiae*, PCNA est sumoylée lors de la phase S (Hoegge et al., 2002), ce qui lui permet de recruter une hélicase particulière, Srs2.

Cette hélicase est capable de dépolymériser les filaments de Rad51 formés sur l'ADN simple brin (Krejci et al., 2003; Veaute et al., 2003). Ainsi, son recrutement par PCNA empêche les événements de recombinaison intempestifs au niveau des fourches de réplication (Papouli et al., 2005; Pfander et al., 2005). Cependant, Srs2 n'a pas d'orthologue chez les eucaryotes supérieurs. Chez l'homme, BRCA2 pourrait inhiber la recombinaison aux fourches de réplication : en absence de dommages à l'ADN, elle interagit avec Rad51 (Mizuta et al., 1997; Wong et al., 1997) et la sequestre sous une forme inactive incapable de se fixer à l'ADN (Davies et al., 2001; Kowalczykowski, 2002; Pellegrini et al., 2002).

Les hélicases de la famille RecQ sont aussi impliquées dans l'inhibition de la recombinaison en absence de dommages. Chez *S. cerevisiae*, la mutation de Sgs1 provoque une instabilité génomique (Gangloff et al., 1994; Myung et al., 2001), causée par exemple par des recombinaisons aberrantes au niveau du locus rDNA, site fragile du génome (Gangloff et al., 1994). La double mutation de Srs2 et Sgs1 est létale, mais un sauvetage des cellules est possible si on mute aussi rad51 (Gangloff et al., 2000), montrant ainsi l'importance d'empêcher la recombinaison aux fourches pour maintenir la viabilité cellulaire. De la même manière, chez l'homme, la suppression de la recombinaison dépendant de Rad51 augmente la viabilité des cellules mutées pour l'hélicase de type RecQ WRN (Saintigny et al., 2002). Les cellules BS (mutées pour l'hélicase BLM, de type RecQ) sont hypersensibles à l'hydroxyurée, indiquant une incapacité à stabiliser les fourches de réplication (Rassool et al., 2003), tandis que les cellules WRN présentent des altérations dans la topologie des fourches (Rodriguez-Lopez et al., 2002). Ces hélicases sont directement contrôlées par les composants du point de contrôle de réplication : elles sont phosphorylées en phase S normale par ATR (Li et al., 2004; Pichierri et al., 2003), et cette phosphorylation augmente avec un blocage de la réplication (Franchitto and Pichierri, 2002). On retrouve encore le concept de transition entre activité basale et pleine activité du point de contrôle. Sachant que BLM et WRN sont capables de résoudre *in vitro* des structures ressemblant à des jonctions de Holliday, on peut imaginer que l'apparition des structures en « chicken foot » (proches des jonctions de Holliday) suite à une régression des fourches de réplication est contrée par les hélicases RecQ activées par ATR. Leur activité basale serait corrélée à celle d'ATR lors d'une phase S normale, répondant par exemple aux problèmes des sites fragiles du génome. Lors d'un blocage des fourches, la probabilité d'une régression des fourches étant plus importante, elles seraient activées plus fortement par ATR.

2. Ralentir la progression de la phase S

a) Inhiber les origines de réplication tardives

Si toutes les origines de réplication d'une cellule fonctionnent de la même façon, le moment de leur activation diffère. Certaines régions du génome sont répliquées dès le début de la phase S à partir d'origines dites précoces, tandis que d'autres sont contrôlées par des origines tardives. Une des fonctions du point de contrôle de réplication est d'empêcher l'activation de ces dernières quand la cellule subit un stress répliatif. Pour ce faire, il cible la kinase Cdc7/Dbf4 qui est impliquée dans l'activation des origines de réplication (cf. partie A). Chez *S. cerevisiae*, Dbf4 interagit avec Rad53 (Dohrmann et al., 1999; Duncker et al., 2002) et suite à un traitement à l'hydroxyurée, la phosphorylation de Dbf4 dépendant de Rad53 diminue son affinité pour la chromatine (Duncker et al., 2002; Pasero et al., 1999; Weinreich and Stillman, 1999). Cela entraîne une diminution du recrutement de Cdc7 sur la chromatine, et une baisse de la phosphorylation de MCM2 (Snaith et al., 2000; Takeda et al., 2001; Weinreich and Stillman, 1999), empêchant ainsi l'activation des origines tardives. De la même manière chez l'homme, l'initiation des origines de réplication est bloquée par l'inhibition de CDC7 par ATR après l'introduction de dommages dans l'ADN (Costanzo et al., 2003).

Cette activité du point de contrôle de réplication sur Cdc7 semble indépendante de sa fonction de stabilisation des fourches de réplication, car des levures mutées pour Cdc7 parviennent à redémarrer correctement la réplication après un blocage transitoire (Bousset and Diffley, 1998; Hartwell, 1976; Tercero et al., 2003). Cependant, chez *S. pombe*, les souches thermosensibles pour Hsk1 (homologue de Cdc7) ne parviennent pas à redémarrer la réplication dans les mêmes conditions (Snaith et al., 2000). Dans ce cas, Hsk1 pourrait donc participer à la stabilisation du réplisome au niveau des fourches bloquées, en ciblant les MCM. La fonction de Cdc7/Dbf4 n'est donc encore pas bien établie, même si le consensus actuel fait de Cdc7 le rôle une cible du point de contrôle de réplication lors de l'inhibition des origines de réplication tardives.

b) Rendre réversible le blocage des fourches de réplication

Nous avons vu que les kinases CDK sont impliquées dans l'initiation de la réplication. CDK2, par exemple, est activée par la phosphatase CDC25A qui, en la déphosphorylant, lève son inhibition. Cela permet à CDK2, en association avec les cyclines A et E, d'initier les origines de réplication en y favorisant le chargement de CDC45 (cf. partie A et revues (Bartek and Lukas, 2001; Donzelli and Draetta, 2003)). Lors de la réplication

normale, CDC25A est soumise à une protéolyse régulière lui conférant une demi-vie d'environ 25 minutes (Falck et al., 2001; Mailand et al., 2000; Mailand et al., 2002; Molinari et al., 2000; Sorensen et al., 2003). Cette protéolyse dépend de l'activité basale des éléments du point de contrôle de réplication : ATR, claspine et CHK1, la phosphorylation de CDC25A par CHK1 empêchant son accumulation (Sorensen et al., 2003; Sorensen et al., 2004; Zhao et al., 2002). De plus, la protéolyse de CDC25A nécessite son ubiquitinylation préalable par le complexe ubiquitine ligase SCF ^{β -Trcp} (Busino et al., 2003; Donzelli et al., 2002; Jin et al., 2003). La reconnaissance de CDC25A par la protéine F-Box du complexe, β -Trcp, dépend de la phosphorylation d'au moins deux sérines sur CDC25A (Busino et al., 2003; Jin et al., 2003). Cependant, ces sérines ne sont pas ciblées par CHK1, mais par une kinase constitutivement active. On pense donc que la phosphorylation par CHK1 permet le changement de conformation de CDC25A, exposant ainsi les deux sérines phosphorylées reconnues par SCF ^{β -Trcp}.

En cas de blocage de la réplication, la phosphorylation de CDC25A par CHK1 augmente suite à l'activation de CHK1, et la demi-vie de CDC25A tombe à 10 minutes. Cela entraîne une « non-activation » de CDK2 et des origines de réplication inactives. Ce mécanisme présente deux avantages évidents : il est rapide, car CDC25A est déjà soumise à une protéolyse, et un blocage de la réplication active rapidement CHK1, qui à son tour augmente directement la protéolyse de CDC25A. De plus, c'est un mécanisme réversible : lorsque CHK1 est inactivée à la fin du point de contrôle, la protéolyse de CDC25A peut à nouveau retrouver son niveau basal, permettant ainsi l'activation de CDK2 et l'initiation des origines de réplication tardives.

La réversibilité offerte par le point de contrôle de réplication permet la reprise de la progression des fourches de réplication une fois le blocage levé. Cette caractéristique est unique au point de contrôle de réplication, les autres point de contrôles du cycle cellulaire entraînant une réponse irréversible avec l'accumulation de p53 (Bartek and Lukas, 2001). Pour être vraiment précis, il faut tout de même signaler qu'une accumulation de p53 est visible en phase S suite à un blocage de la réplication ou une hypoxie (Koumenis et al., 2001), mais la plupart de ses activités transcriptionnelles sont inactives (Gottifredi et al., 2001). Notamment, l'accumulation conjuguée de p21 qui est observée dans les point de contrôles des autres phases du cycle n'est pas observée après l'accumulation de p53 en phase S (Agarwal et al., 1998; Komarova et al., 1997). Il faut dire que p21, outre son action inhibitrice sur les kinases en phase G1, a d'autres activités incompatibles avec la phase S, notamment en agissant sur PCNA (Cazzalini et al., 2003; Gottifredi et al., 2004). L'inhibition de p21 est

donc nécessaire pour la réversibilité du point de contrôle de réplication et redémarrer la réplication (Gottifredi et al., 2004). Il semble qu'ATR soit impliquée dans cette inhibition. En effet, lors d'un blocage de la réplication, ATR est nécessaire pour l'ubiquitinylation et la dégradation de p21 (Bendjennat et al., 2003).

3. Fin du point de contrôle de réplication : dégradation de CHK1

Récemment, Zhang et al. ont montré qu'une exposition prolongée de cellules humaines à une hypoxie profonde (O_2 inférieur à 0.1%) ou un traitement à l'aphidicoline finissait par diminuer la quantité de CHK1 dans les cellules (Zhang et al., 2005). Certaines études avaient auparavant montré que p53 inhibe la transcription de CHK1 (Cummings et al., 2002; Gottifredi et al., 2001). On aurait donc pu penser que l'accumulation de p53 lors du point de contrôle réplication est responsable de la fin de ce même point de contrôle en inhibant la transcription de CHK1. Cependant, Zhang et al. ont montré que dans des cellules mutées pour p53, un stress réplicatif entraîne d'abord une activation de CHK1 via sa phosphorylation sur les sérines 317 et 345, puis la baisse de sa demi-vie. Cette baisse peut être stoppée par une inhibition du protéasome, ce qui signifie que suite à son activation, CHK1 est effectivement dégradée par le protéasome. En absence de stress réplicatif, un traitement au MG132, un inhibiteur du protéasome, augmente de la même manière le niveau basal de CHK1. Cela signifie qu'en plus de son activité basale, CHK1 est soumise à une protéolyse régulière, tout comme CDC25A. De manière surprenante, la phosphorylation de CHK1 sur la sérine 345, responsable de l'activation de CHK1 par ATR, est nécessaire à son ubiquitinylation. Zhang et al. ont aussi montré que CHK1 est ubiquitinylée dans le noyau par un complexe SCF assemblé par la culline 1, et dans le cytoplasme par un complexe SCF assemblé par la culline 4A. Cependant, ils n'ont pu mettre en évidence les protéines F-Box impliquées dans les deux cas.

Il semble donc que c'est l'activité du point de contrôle de réplication qui est responsable à la fois de l'activation et de la dégradation de CHK1, aussi bien par son activité basale en absence de stress que par sa pleine activité lors d'un blocage de la réplication prolongé. Suite à leur étude, Zhang et al. ont développé un modèle d'inactivation du point de contrôle de réplication, reposant sur la dégradation de CHK1 (Figure 10). Suite à son activation au niveau des fourches de réplication bloquées, CHK1 passe de la chromatine au nucléoplasme afin d'atteindre certaines de ses cibles nucléoplasmiques comme CDC25A. Suite à un stress réplicatif, le délai séparant l'activation de la dégradation de CHK1 observé par Zhang et al. correspondrait selon eux au temps que mettrait CHK1 à quitter la chromatine.

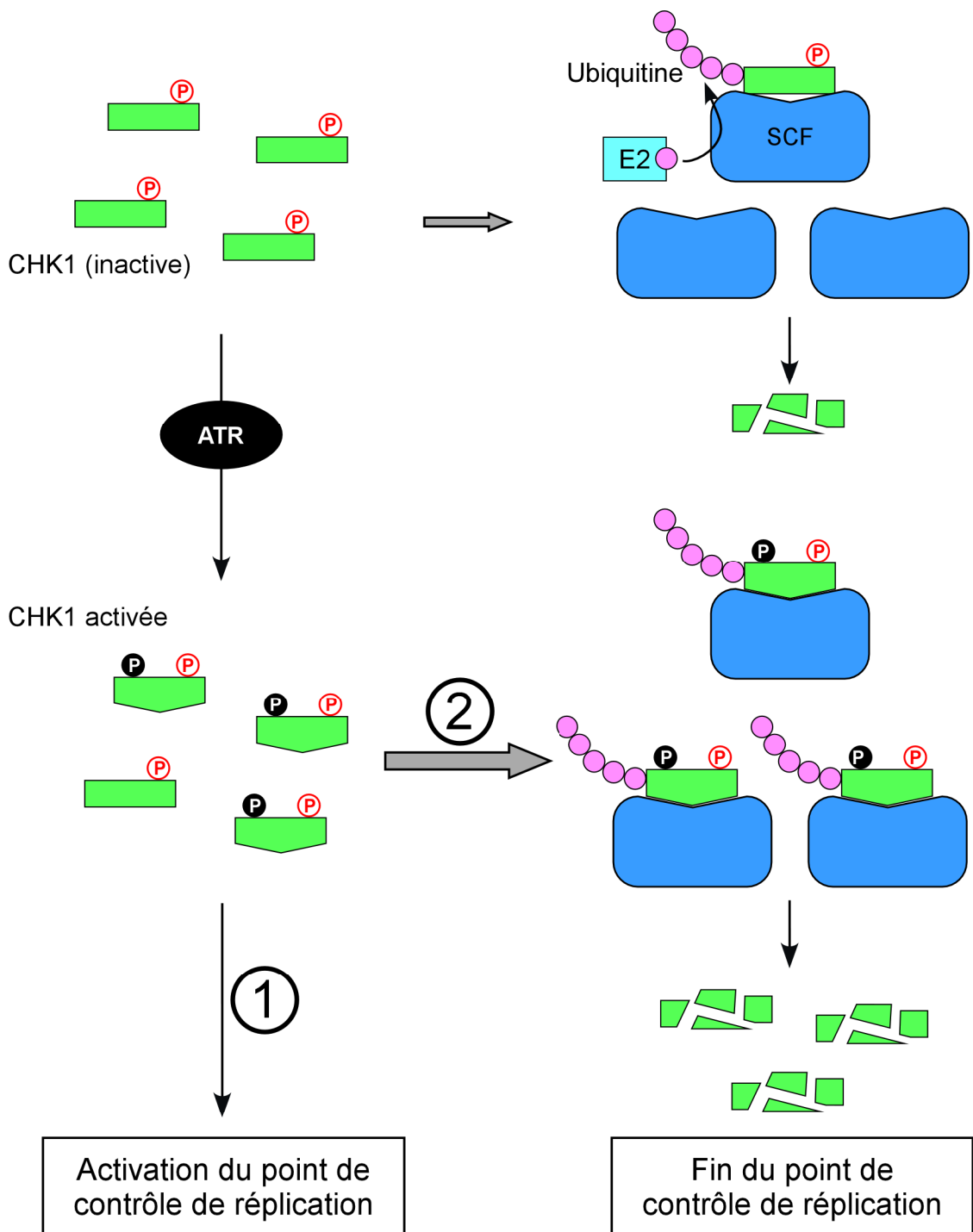


Figure 10. Activation et terminaison du point de contrôle de réplication. En absence de stress répliatif, CHK1 est soumise à une protéolyse régulière lui conférant une demi-vie d'environ 25 minutes. Cette protéolyse nécessite la poly-ubiquitinylation de CHK1 par le complexe $SCF^{\beta-Trcp}$. La phosphorylation de CHK1 par ATR (en noir) induit son changement de conformation, permettant une meilleure reconnaissance du site de phosphorylation constitutive (en rouge) de CHK1 par $SCF^{\beta-Trcp}$. La demi-vie de CHK1 tombe alors à 10 minutes. Ainsi, la phosphorylation de CHK1 par ATR entraîne: 1) l'activation du point de contrôle de réplication et 2) l'augmentation de la dégradation de CHK1, qui met fin au point de contrôle.

Ce mode d'inactivation de CHK1, via son ubiquitylation, présente l'avantage de dégrader uniquement les molécules de CHK1 actives (phosphorylées sur la sérine 345) parmi le pool total de CHK1. Ce type de dégradation de kinases activées était déjà connu, par exemple pour Wee1 (Watanabe et al., 2004).

Zhang et al. insistent sur le fait que la compréhension de l'inactivation du point de contrôle de réplication, outre son intérêt fondamental, présente aussi un intérêt clinique. En effet, au cours de la tumorigenèse, les cellules sont amenées à répliquer leur ADN dans un environnement hypoxique, le temps que la tumeur soit vascularisée. Durant cette hypoxie, c'est le point de contrôle de réplication qui permet la survie des cellules transformées. Maîtriser l'inactivation du point de contrôle via la dégradation forcée de CHK1 serait d'un intérêt thérapeutique certain, car cela abolirait cette résistance des cellules cancéreuses. Force est de constater, d'ailleurs, que certaines cellules cancéreuses montrent des défauts de dégradation de CHK1, ce qui leur permet de résister à différents stress réplcatifs via un point de contrôle de réplication suractivé.

C - FRANCHISSEMENT DES LÉSIONS PAR LES FOURCHES DE RÉPLICATION

Les fourches de réplication possèdent une capacité à franchir certaines lésions de l'ADN qui pourraient, sans ce franchissement, s'avérer fatales pour la survie cellulaire en bloquant la réplication. A ce jour, deux stratégies de franchissement des dommages par les fourches sont bien décrites : la synthèse de translésion, qui fait intervenir des ADN polymérase spécialisées tolérant certains dommages de l'ADN, et l'utilisation de la recombinaison. La synthèse de translésion a un potentiel mutagène car les ADN polymérase de translésion sont peu fidèles, tandis que la recombinaison homologue au niveau de la fourche de réplication permet une réplication fidèle. Par contre, ces deux modes de réplication ne permettent pas à la cellule de réparer le brin endommagé.

Chez la bactérie, le choix entre les deux voies de franchissement dépend de successions de clivages protéolytiques stimulés par la protéine RecA. Chez les eucaryotes, notamment *S. cerevisiae*, modèle très étudié dans ce domaine, des stratégies plus sophistiquées de régulation existent, qui impliquent des modifications post-traductionnelles telle que l'ubiquitylation. Le choix entre l'une des deux voies de franchissement est contrôlé par les gènes du groupe d'épistasie RAD6.

I. Synthèse de translésion : voie mutagénique

1. ADN polymérase de translésion

La synthèse de translésion (TLS) est le processus par lequel le réplisome parvient à franchir des lésions au niveau de la fourche de réplication. Le type de lésion franchie peut être une base modifiée, un dimère de thymidines, ou toute autre lésion pas trop encombrante et ne bloquant pas l'hélicase. Ce franchissement évite un arrêt prolongé de la fourche quand la lésion se trouve en face du brin leader, mais au prix de mutations. Cette mutagenèse est due à la faible fidélité des ADN polymérase de translésion (polymérase TLS) qui ont la charge de synthétiser de l'ADN en face des lésions, les polymérase répliquatives en étant incapables. En effet, le site actif des polymérase TLS, plus lâche que celui des ADN polymérase répliquatives, leur permet de prendre en charge des bases modifiées (Tableau 3). La contrepartie est la probabilité beaucoup plus importante d'erreurs d'appariement.

Tableau 3. Polymérase de transléion eucaryotes les mieux caractérisées.

Type de lésion	Franchissement par:		Mutations	
	1 polymérase	2 polymérases		
		Insertion		Extension
8-oxoguanine	Pol █		non	
Dimères cyclobutane-pyrimidines	Pol █		non	
Photoproduits (6-4)		Pol █ Pol █	Pol █	oui / non
Sites abasiques		Pol █ Pol █ Pol █ Rev █	Pol █	oui

Hormis Pol ζ, toutes ces polymérases contiennent des motifs de fixation à l'ubiquitine (UBD).

Ce phénomène de mutagenèse a été observé la première fois chez *E. coli* dans les années 70 et a été nommé « réparation SOS » (Radman, 1975). Les gènes responsables de la réparation SOS furent identifiés peu de temps après chez *E. coli* et *S. cerevisiae*, mais ce n'est qu'en 1996 que leur fonction a été clairement établie, avec la démonstration que le gène *REVI* (*S. cerevisiae*) code pour une enzyme ayant une activité dCMP transférase (Nelson et al., 1996). Rev1 est sans doute la plus « extrême » des polymérases TLS, car elle n'est capable d'incorporer que des dCTP dans l'ADN en cours de synthèse, quelle que soit la base modèle. En 1999, l'activité ADN polymérase des deux homologues bactériens de Rev1 a été montrée (Reuven et al., 1999; Tang et al., 1999; Wagner et al., 1999) et la première polymérase TLS humaine, Pol η, a été isolée (Johnson et al., 1999; Masutani et al., 1999). Cette dernière est codée par le gène *xpv*, dont la mutation chez l'homme entraîne une maladie (Xeroderma pigmentosum) caractérisée par une extrême sensibilité au soleil, confortant le rôle de Pol η dans la réponse aux dommages liés aux UV. Depuis 1999, d'autres polymérases TLS ont été identifiées chez les procaryotes, les archaebactéries et les eucaryotes (Tableau 3); cette conservation indique un rôle fondamental de ces enzymes pour le métabolisme de l'ADN, mais toutes leurs fonctions *in vivo* sont loin d'être connues, bien qu'*in vitro*, telle ou telle polymérase TLS montre une synthèse préférentielle en face de telle ou telle lésion.

La polymérase TLS la mieux étudiée chez les eucaryotes est la Pol η, capable d'insérer *in vitro* deux nucléotides en face d'un dimère de thymidines (Masutani et al., 2000). *In vivo*, ces dimères, retrouvés suite à une exposition aux UV, entraînent des blocages de la fourche de réplication, la polymérase δ étant incapable de les prendre en charge. La capacité de la Pol η à franchir une telle lésion lui est conférée par son site actif capable d'accommoder les deux thymidines en même temps. Le franchissement d'un tel obstacle par la Pol η, et avec

elle de la fourche de réplication, implique que la Pol η soit recrutée au niveau des fourches bloquées par des dimères de thymidine et qu'elle remplace la polymérase réplivative. Ce recrutement est visible suite à une exposition de cellules aux UV : on détecte une accumulation de foyers correspondant aux fourches bloquées, contenant PCNA et Pol η (Kannouche et al., 2001). Cependant, il doit être restreint aux fourches bloquées pour éviter une trop forte mutagenèse due à la faible fidélité de la Pol η .

2. Recrutement des polymérases de transléision aux fourches

a) Mono-ubiquitinylation de PCNA

i. Chez *S. cerevisiae*

Via ses différentes modifications post-traductionnelles, PCNA joue un rôle central dans le recrutement des polymérases TLS aux fourches bloquées. Nous avons vu précédemment que PCNA, chez *S. cerevisiae*, est sumoylée au cours de la phase S (Hoege et al., 2002). Hoege et al. ont aussi mis en évidence, suite à un blocage des fourches de réplication, une mono-ubiquitinylation de PCNA intervenant sur la même lysine que la sumoylation (K164). Le complexe assurant la mono-ubiquitinylation de PCNA est formé de Rad6, une E2 multifonctionnelle identifiée en 1987 (Jentsch et al., 1987; Prakash, 1994), et de Rad18, une E3 ligase contenant un domaine RING Finger (Joazeiro and Weissman, 2000; Jones et al., 1988). L'activité E2 de Rad6 est essentielle pour sa fonction dans la réponse aux dommages de l'ADN car la mutation de la cystéine formant le lien thiolester avec l'ubiquitine a les mêmes conséquences que la délétion complète du gène *RAD6* (Sung et al., 1990). De plus, l'intégrité du complexe Rad6-Rad18 est essentielle pour la mono-ubiquitinylation de PCNA (Bailly et al., 1997; Hoege et al., 2002; Stelter and Ulrich, 2003). Comment son activité est-elle ciblée sur PCNA au niveau des fourches de réplication bloquées et non en progression ?

Rad18, en plus de son activité E3 ligase, a de l'affinité pour l'ADN simple brin généré à la fourche bloquée (Bailly et al., 1997). Ainsi, Rad18 s'y fixerait puis y recruterait Rad6, la E2 du système, entraînant la mono-ubiquitinylation de PCNA (Hoege et al., 2002). Cette modification touche les trois monomères de PCNA et n'intervient que si PCNA est associée à l'ADN (Haracska et al., 2006), renforçant ainsi l'idée d'une formation du complexe Rad6-Rad18 actif uniquement sur la chromatine. Comme la mono-ubiquitinylation de PCNA intervient sur la même lysine que la sumoylation (K164), on a pensé au départ à un effet antagoniste des deux processus. Ainsi le premier modèle proposé stipulait que l'ubiquitinylation de PCNA entraîne la dissociation de la polymérase réplivative et augmente

l'affinité pour PCNA des polymérase TLS. En effet ces dernières sont pourvues de sites de fixation à l'ubiquitine (Bienko et al., 2005). Selon ce modèle, la compétition entre la sumoylation et l'ubiquitinylation de PCNA expliquerait les changements de polymérase recrutées par PCNA à la fourche (Stelter and Ulrich, 2003) (Figure 11).

ii. Chez les eucaryotes supérieurs

Chez les mammifères, on constate aussi après un blocage de la réplication une mono-ubiquitinylation de PCNA sur la lysine 164 (Kannouche et al., 2004; Watanabe et al., 2004), assurée par les homologues de Rad6 et Rad18, et nécessitant la voie ATR-CHK1 (Bi et al., 2006; Kannouche et al., 2004; Watanabe et al., 2004). Les polymérase TLS, comme Pol η et ι , sont recrutées aux fourches via une interaction avec la forme mono-ubiquitinylée de PCNA (PCNA-Ub) (Plosky et al., 2006). De plus, une interaction directe entre RAD18 et Pol η a été observée (Watanabe et al., 2004), qui pourrait participer au recrutement de cette dernière, via son guidage à la fourche par RAD18.

Le simple blocage des fourches de réplication par un traitement à l'hydroxyurée, donc en absence de dommages à l'ADN, entraîne la mono-ubiquitinylation de PCNA (Kannouche et al., 2004). Cela signifie que le signal pour cette mono-ubiquitinylation part de la fourche bloquée elle-même et non d'une éventuelle lésion sur l'ADN. Cependant, le concept de compétition entre sumoylation et ubiquitinylation de PCNA évoqué chez *S. cerevisiae* ne peut être étendu aux eucaryotes supérieurs, chez lesquels aucune sumoylation de PCNA n'a été détectée. Bien que cela ne remette pas en cause l'hypothèse du recrutement de Pol η par PCNA-Ub, une autre régulation en amont doit être présente pour compenser l'absence de sumoylation en absence de dommages. Comme nous l'avons déjà dit, la faible fidélité de Pol η implique que son recrutement sur la chromatine doit être restreint aux fourches bloquées afin d'éviter des mutations aux endroits non endommagés de l'ADN. De plus, après qu'elle ait permis le franchissement d'une lésion par la fourche, elle doit être remplacée par la polymérase δ . Cela a été observé *in vitro* (McCulloch et al., 2004), mais on ne sait toujours pas précisément comment ces remplacements d'ADN polymérase interviennent *in vivo*. La difficulté consiste à savoir à quel niveau l'ubiquitinylation de PCNA est régulée. En effet, ce type de modification peut être régulé par des modifications préalables sur le substrat même (par exemple phosphorylation) ou par une activation/inhibition de l'activité de la E3 ligase, ou de l'enzyme de dés-ubiquitinylation. En d'autres termes, la régulation peut intervenir en amont de l'ubiquitinylation pour l'empêcher ou la favoriser, ou en aval pour éliminer ou protéger les formes ubiquitinylées du substrat. Concernant PCNA, la sumoylation peut intervenir en amont uniquement chez *S. cerevisiae*. Chez les eucaryotes

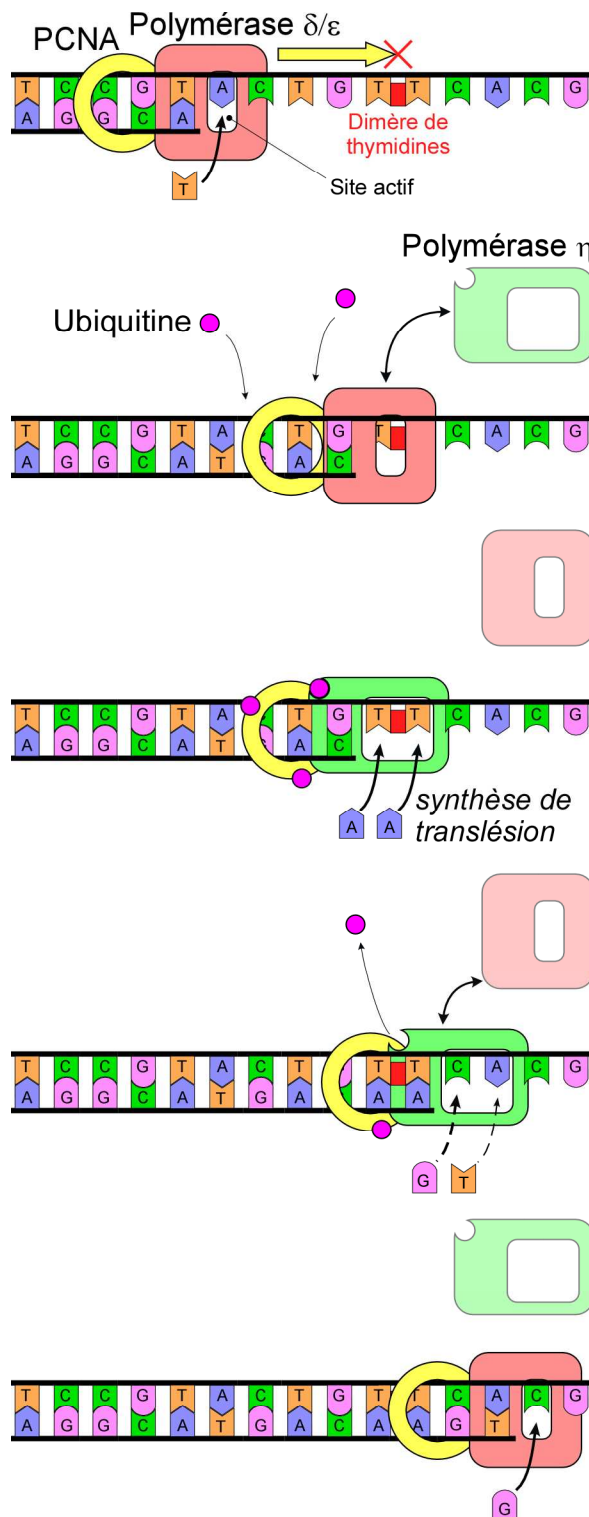


Figure 11. Synthèse de translésion par la polymérase η. Lorsque la polymérase répliquative rencontre un dimère de thymidines, elle se retrouve bloquée car son site actif est trop étroit pour prendre en charge les deux bases en même temps. La mono-ubiquitinylation des monomères de PCNA par le système RAD permet alors le recrutement de la polymérase η, dont le site actif, plus lâche que celui d'une polymérase répliquative, est capable de prendre en charge le dimère pour incorporer en face deux nucléotides. La lésion est alors franchie. La polymérase η peut ensuite synthétiser de l'ADN sur quelques nucléotides de distance, mais est rapidement remplacée par la polymérase répliquative après la désubiquitinylation de PCNA.

supérieurs, une autre régulation doit être présente étant donnée l'absence de sumoylation. Cette régulation n'est d'ailleurs pas restreinte aux métazoaires, car une dose létale de dommages chez *S. cerevisiae* n'entraîne pas de mono-ubiquitinylation, mais plutôt renforce la sumoylation de PCNA, traduisant l'existence d'un seuil de dommages au-delà duquel la cellule décide de ne plus mettre en œuvre la synthèse de translésion.

b) Régulation de la mono-ubiquitinylation de PCNA

Un groupe a montré récemment qu'il existe chez l'homme une enzyme de désubiquitinylation de PCNA, USP1, qui s'autoclive en réponse à une irradiation UV (Huang et al., 2006). USP1 avait été identifiée en 1998 (Fujiwara et al., 1998) et était auparavant connue comme enzyme de désubiquitinylation de FANCD2 dans la voie FA (Nijman et al., 2005) (cf. partie E). On peut donc imaginer que l'activité constitutive de USP1 empêche l'accumulation de PCNA-Ub en conditions normales, ce blocage étant levé par son autoclivage suite au blocage des fourches de réplication. Cette hypothèse est confortée par une observation dans des cellules subissant une interférence ARN contre USP1 : PCNA-Ub s'y accumule, en présence ou en absence de dommages (Huang et al., 2006).

En plus de la désubiquitinylation de PCNA par USP1, deux autres pistes d'études mériteraient d'être approfondies. La première est la régulation de RAD18 par sa mono- ou poly-ubiquitinylation dépendant de RAD6 (Miyase et al., 2005). Tandis que sa mono-ubiquitinylation entraînerait son exclusion du noyau, sa poly-ubiquitinylation provoquerait sa dégradation. Cela permettrait de mettre fin à l'activation de Rad18 via un rétrocontrôle négatif de l'ensemble RAD6-RAD18 par RAD6. La seconde est la mono-ubiquitinylation de Pol η et ι , qui ne dépend pas de la présence de dommages sur l'ADN mais qui nécessite la présence des sites de fixation à l'ubiquitine présents dans ces polymérase (Bienko et al., 2005). Pol η et ι , grâce à leurs sites de fixation à l'ubiquitine, pourraient recruter leur E2/E3 via l'ubiquitine, mais la finalité de leur mono-ubiquitinylation demeure inconnue.

c) Régulations du recrutement des polymérase de translésion par PCNA

Tout d'abord, une régulation de la fixation de Pol η sur PCNA a été évoquée. Des expériences de FRAP dans des cellules de mammifère ont montré que l'association de Pol η aux foyers de réplication est très dynamique (Solovjeva et al., 2005), contrairement à PCNA qui est stable (Essers et al., 2005; Solomon et al., 2004; Sporbert et al., 2002). La présence prolongée des polymérase TLS aux fourches pourrait être due au fait que nombre d'entre elles possèdent des sites de fixation à l'ubiquitine (Bienko et al., 2005) ; ces sites pourraient en effet multiplier leur affinité pour PCNA quand elle est mono-ubiquitinylée.

D'autre part, une inhibition du recrutement des polymérase TLS a été mise en évidence : une étude récente indique que p21, en se fixant à PCNA, empêche le recrutement des polymérase TLS (Avkin et al., 2006). Dans cette optique, ATR pourrait favoriser le recrutement des polymérase TLS car elle entraîne la dégradation de p21 suite à un stress répliatif (cf. partie B). Ce résultat semble être en accord avec une autre étude récente qui a mis en évidence des données importantes : chez *S. cerevisiae*, la mono-ubiquitylation de PCNA n'entraîne ni une dissociation de Pol δ , ni une meilleure association de Pol η (Haracska et al., 2006). Les auteurs de cette étude ont émis l'hypothèse qu'une protéine (non identifiée) fixée à PCNA inhiberait la fixation des polymérase TLS, et que la mono-ubiquitylation de PCNA pourrait dissocier cette protéine. En se rappelant des résultats d'Avkin et al., on peut imaginer que chez *S. cerevisiae*, la protéine non identifiée par Haracska et al. jouerait le même rôle que p21 chez l'homme (Figure 12). Il sera déterminant d'identifier cette protéine, et de comparer *in vitro* l'interaction entre p21 et PCNA ou PCNA-Ub.

3. Une voie de translésion indépendante de RAD18 ?

Un groupe a montré en 2002 qu'il existait, au moins dans la lignée cellulaire de poulet DT40, une voie de translésion indépendante de RAD18 et de Pol η . En effet, les dommages induits par des UV peuvent être passés par une autre polymérase TLS, Pol κ , dans ces cellules (Okada et al., 2002). La disruption de RAD18 dans ces cellules entraîne une augmentation des échanges entre chromatides sœurs, caractéristiques des fourches n'ayant pu franchir ces dommages et ayant enclenché des réactions de recombinaison (cf. partie D) (Yamashita et al., 2002). La suppression de Pol κ en plus de RAD18 augmente encore le nombre d'échanges, signifiant que les voies RAD18-Pol η et Pol κ sont indépendantes (Takenaka et al., 2006). On ne peut pas exclure que cette voie de synthèse de translésion soit spécifique au poulet, mais cela illustre quand même la complexité de ce processus, et surtout le recul à prendre par rapport aux modèles *in vitro*, stipulant que Pol κ est incapable de franchir les dommages induits par les UV.

II. Changement de brin modèle, ou « template switching » : voie non mutagénique

1. Intervention de la voie non mutagénique : nature de la lésion

Certaines lésions, en face du brin leader, peuvent être franchies via les polymérase de translésion comme nous venons de le voir. Cependant, d'autres ne peuvent être franchies

par cette voie : il peut s'agir d'une lésion trop volumineuse ou d'un complexe ADN-protéine, telle qu'une ARN polymérase. Dans ce cas, chez les procaryotes comme chez les eucaryotes, la progression de la fourche est bloquée (Cox et al., 2000; Gregg et al., 2002; Krasilnikova et al., 1998; McGlynn and Lloyd, 2000; Vilette et al., 1995). La cellule devant absolument relancer les fourches, il existe une autre voie de franchissement qui est mise en œuvre. Cette voie, non mutagénique, semble plus choisie pour sa capacité à franchir certaines lésions que pour sa propriété intrinsèque non mutagène, comme le laisse penser son mode d'activation, du moins chez *S. cerevisiae*.

2. Bases moléculaires de l'activation

a) *S. cerevisiae* : poly-ubiquitinylation de PCNA

L'activation de la voie non mutagénique n'est pas encore totalement élucidée, mais elle requiert les gènes du groupe d'épistasie RAD6. Cela comprend donc les gènes *RAD6* et *RAD18* impliqués dans la mono-ubiquitinylation de PCNA et la synthèse de translésion, mais aussi les gènes *RAD5*, *UBC13* et *MMS2* (Xiao et al., 2000). Le gène *RAD5* a été génétiquement placé dans la voie non mutagénique et code pour une E3 ligase un domaine RING Finger, un domaine ATPase ADN simple brin-dépendant (Johnson et al., 1992) et des domaines Swi2/Snf2 importants pour le remodelage de la chromatine (Richmond and Peterson, 1996). De la même manière que Rad18 lors de la translésion, Rad5 pourrait donc guider une E2 spécifique au niveau des fourches bloquées. Cette E2 est formée du complexe Mms2-Ubc13 (Brusky et al., 2000; Xiao et al., 1998) qui interagit via Ubc13 avec le domaine RING Finger de Rad5 (Ulrich and Jentsch, 2000). La mutation de ce dernier abolit l'interaction avec Ubc13 (Ulrich, 2001; Ulrich, 2003).

L'interaction entre Mms2 et Ubc13 a été démontrée par co-immunoprécipitation (Hofmann and Pickart, 1999) et double hybride (Brown et al., 2002). Les deux protéines forment un hétérodimère stable chez *S. cerevisiae* (Hofmann and Pickart, 1999) mais aussi chez l'homme (McKenna et al., 2003; McKenna et al., 2001) et agissent de concert dans la voie non mutagénique, car la déplétion de l'une ou l'autre entraîne le même phénotype caractérisé par une forte augmentation du taux de mutations spontanées (Brusky et al., 2000). Le gène *MMS2*, isolé par complémentation fonctionnelle (Broomfield et al., 1998), code pour une E2 variante (Uev), dépourvue de résidu cystéine actif. Des Uev ont été identifiées dans tous les modèles eucaryotes étudiés, y compris l'homme (Sancho et al., 1998; Xiao et al., 2000). Ubc13, quant à elle, est une véritable E2 capable de catalyser la formation de chaînes de d'ubiquitines via la lysine 63 de l'ubiquitine, mais sa fonction est dépendante de Mms2. La

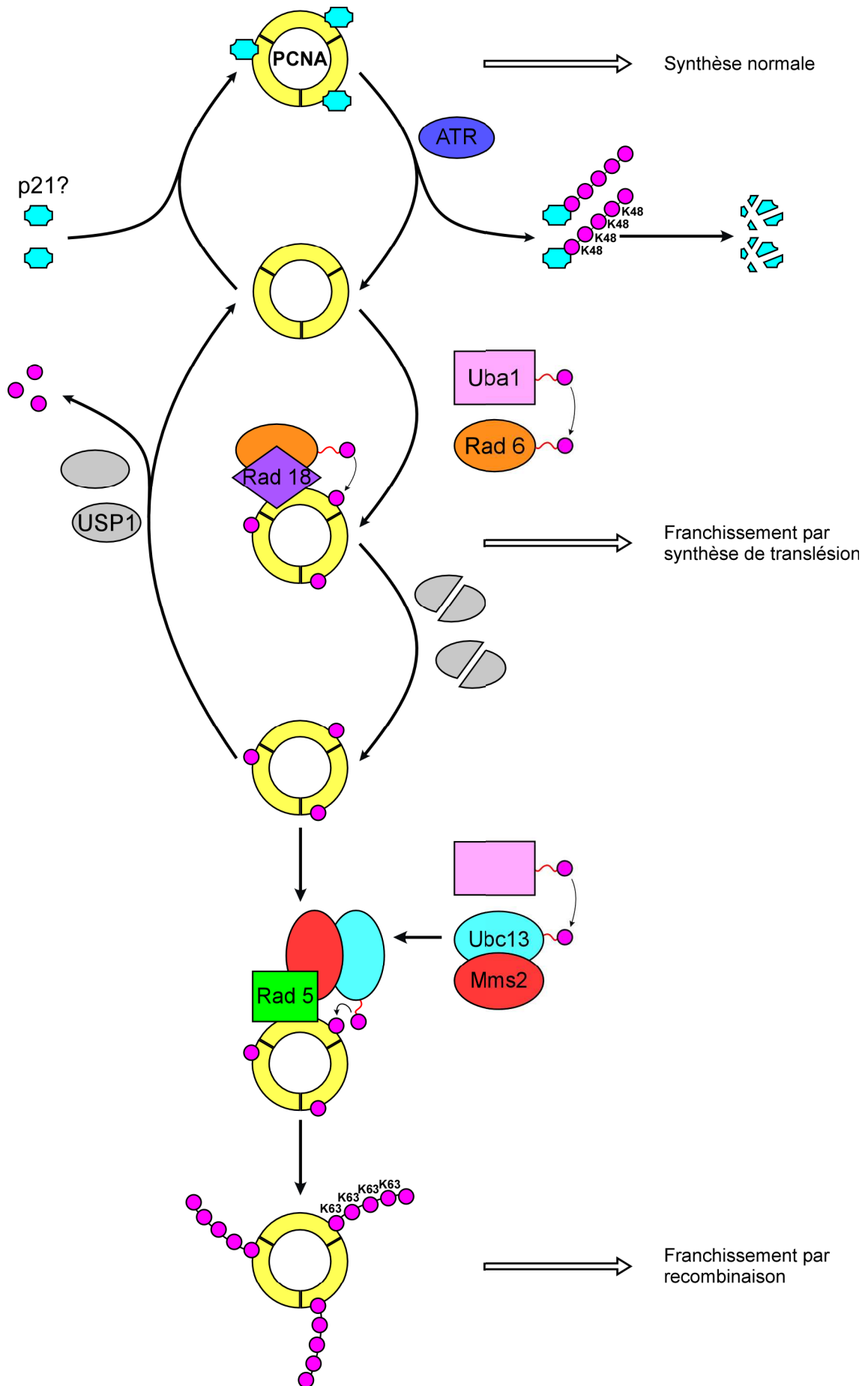
cristallisation de dimère Ubc13-Mms2 a permis d'émettre l'hypothèse que Mms2 servirait à orienter l'ubiquitine acceptrice du substrat de manière à ce que sa lysine 63 soit disponible pour former un lien isopeptidique avec l'ubiquitine donneuse du thiolester Ubc13-Ub (McKenna et al., 2001; VanDemark et al., 2001).

L'implication de PCNA dans la voie non mutagénique a été montrée chez *S. cerevisiae* grâce à l'analyse génétique des mutants de *POL30* (gène codant PCNA), déficients pour cette voie (Xiao et al., 2000). Le lien entre PCNA et la voie error-free a été ensuite démontré au niveau moléculaire par Hoege et al (2002). Non seulement PCNA interagit en double hybride avec Rad5, mais la mutation de *RAD5*, *MMS2* ou *UBC13* entraîne la disparition des formes poly-ubiquitinylées de PCNA (PCNA-polyUb) sans affecter l'abondance des formes mono-ubiquitinylée/sumoylée. De plus, la poly-ubiquitinylation de PCNA par Rad5-Ubc13-Mms2 requiert en amont sa mono-ubiquitinylation par Rad6-Rad18, confortant l'hypothèse de l'activation de la voie non mutagénique en aval de la voie mutagénique (Figure 12). Si la poly-ubiquitinylation de PCNA via la lysine 63 de l'ubiquitine semble donc nécessaire chez *S. cerevisiae* à la voie non mutagénique, l'activation des mécanismes moléculaires en aval de PCNA-polyUb n'est pas clairement connue.

b) Eucaryotes supérieurs

Contrairement à l'activation de la synthèse de translésion qui est conservée de la levure aux eucaryotes supérieurs, l'activation de la voie non mutagénique semble différente entre ces organismes. En effet, la poly-ubiquitinylation de PCNA n'a pas été observée chez les eucaryotes supérieurs chez lesquels l'équivalent de Rad5 ne semble pas exister, si on se base sur des homologies de séquence. Toutefois, l'orthologue humain de Mms2 existe et est

Figure 12. Ubiquitinylation de PCNA au niveau de la fourche de réplication. En absence de lésion, chaque monomère de PCNA est associé à une protéine (qui pourrait être p21) qui masque sa lysine 164 (K164). L'activité d'ATR est responsable de la polyubiquitinylation et de la dégradation par le protéasome de cette protéine, libérant ainsi la lysine 164 de PCNA, qui sert de substrat pour une mono-ubiquitinylation grâce à l'E2 Rad6 et l'E3 Rad18. Si une lésion bloque la fourche de réplication, l'enzyme de dés-ubiquitinylation de PCNA (USP1) s'auto-clive, ce qui permet le maintien de la mono-ubiquitinylation de PCNA et le recrutement des polymérasés de translésion. Si la lésion n'est toujours pas franchie, PCNA est alors poly-ubiquitinylée (chaîne d'ubiquitines reliées par leur lysine 63) grâce à l'E2 dimérique Ubc13-Mms2 et l'E3 Rad5. Ceci permet, chez la levure, le franchissement d'une lésion par la recombinaison. Chez les eucaryotes supérieurs, PCNA n'est pas poly-ubiquitinylée et on ne sait pas encore comment la voie de la recombinaison est privilégiée à la fourche de réplication.



nécessaire pour l'activation de la voie non mutagénique (Li et al., 2002). Li et al. ont mis au point un système leur permettant de différencier les deux types de franchissement d'une lésion de l'ADN suite à une irradiation UV de cellules humaines. Leur système consiste en deux copies du gène de résistance à l'hygromycine présentes sur le même chromosome mais pas dans la même orientation. Ces deux copies contiennent chacune une mutation positionnée soit en 5' du gène soit en 3'. Une des deux copies contient en plus de la mutation en 3' une lésion de l'ADN bloquant la progression de la fourche. Ainsi, si la cellule utilise pour répliquer le gène la voie de translésion, la descendance cellulaire hérite de deux copies toujours mutées du gène de résistance. Si au moment du blocage la cellule utilise une autre voie pour franchir la lésion (faisant intervenir une recombinaison avec l'autre copie du gène), la descendance peut hériter d'une copie fonctionnelle du gène de résistance. Grâce à ce système, ils ont montré que la présence de MMS2 est indispensable pour l'activation de la voie non mutagénique de franchissement d'une lésion. Cependant, les détails moléculaires de son activation sont encore méconnus.

3. Modèles de franchissement sans erreur d'une lésion

a) Chez *E. coli* : régression de la fourche de réplication

Le premier modèle de franchissement sans erreur d'une lésion par la fourche de réplication est venu de l'observation chez *E. coli* de l'existence de fourches de réplication régressées, formant des structures dites en « chicken foot » dans laquelle les deux brins d'ADN néo-synthétisés s'apparient (Higgins et al., 1976). Lorsque les fourches de réplication rencontrent une lésion non franchissable par les polymérase TLS, elles se bloquent et peuvent régresser (Cox et al., 2000; Gregg et al., 2002). Plusieurs explications ont été avancées pour expliquer cette régression, allant du relâchement des super-enroulements positifs créés par la progression de la fourche (Postow et al., 2001) à la stimulation par RecA (Robu et al., 2001) ou RecG même en absence de super-enroulements positifs (McGlynn and Lloyd, 2001; Singleton et al., 2001). Ces études ont été réalisées *in vitro*, les conditions expérimentales pouvant expliquer ces différences. Cependant, Robu et al. ont montré 3 ans plus tard que RecG est bel et bien capable de promouvoir la régression d'une fourche de réplication, nécessitant pour cela une hydrolyse d'ATP (Robu et al., 2004). Les auteurs ont conclu de ces travaux qu'*in vivo*, selon les conditions de blocage de la fourche, RecA ou RecG pouvait intervenir.

Quel que soit le mécanisme de régression, il permet un franchissement de la lésion. En effet, le blocage de la synthèse du brin leader ne bloque pas nécessairement la synthèse du brin

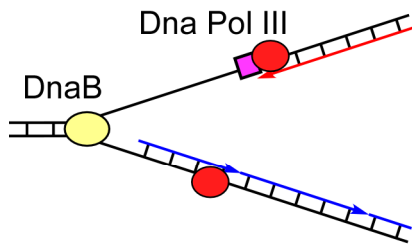
retardé (Pages and Fuchs, 2003), et leur appariement permet au brin qui était bloqué de poursuivre sa synthèse en utilisant comme modèle l'autre brin néo-synthétisé. Ce modèle, qualifié de « template switching », inclus aussi un retournement de la fourche régressée, permettant le franchissement de la lésion et la reformation de la fourche normale (Figure 13). Des études génétiques montrent que RecG est capable d'assurer *in vivo* le retournement de la fourche régressée pour rétablir la fourche de réplication normale (Gregg et al., 2002). Le réplisome bactérien est ensuite rechargé au niveau de la fourche grâce à la protéine PriA qui se fixe aux structures d'ADN en fourche pour y guider l'hélicase répllicative DnaB et la primase DnaG (Jones and Nakai, 1999; Liu et al., 1999). Cette activité de PriA permet donc la reprise de la réplication grâce à la reformation du réplisome loin de l'origine de réplication bactérienne.

b) Chez la levure

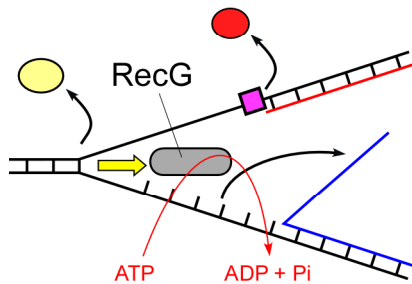
i. *La régression des fourches traduit un état pathologique*

Il y a encore peu de temps, on pensait que la régression des fourches de réplication pouvait être, grâce à la protéine Sgs1, un signal d'activation du point de contrôle de réplication chez *S. cerevisiae*. En effet, on savait que Sgs1 est impliquée dans l'activation du point de contrôle en réponse à un stress des fourches de réplication, car non seulement elle y co-localise avec Rad53, mais elle est en plus requise pour sa phosphorylation (Frei and Gasser, 2000). Sachant que Sgs1 intervient aussi au niveau des intermédiaires de recombinaison (Gangloff et al., 2000) et qu'elle interagit avec Rad51 (Bischof et al., 2001; Wu et al., 2001), il était confortable de penser qu'une fourche régressée, dont la structure est proche d'une jonction de Holliday, pouvait être un site de recrutement de Sgs1 lors du blocage des fourches de réplication, entraînant une activation du point de contrôle.

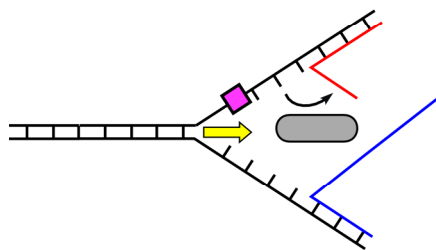
Plus récemment, des fourches régressées ont effectivement été observées chez *S. cerevisiae* en réponse à un blocage de la réplication, mais uniquement chez des mutants de Rad53 (Sogo et al., 2002). Ainsi, une régression de la fourche reflèterait plus un état pathologique que physiologique, qui serait évité en présence d'un point de contrôle actif veillant à la stabilité des fourches bloquées (cf. partie B). De plus, il est maintenant avéré que Sgs1 est constitutivement associée aux fourches de réplication (où elle interagit avec RPA), et pas uniquement en cas de blocage (Cobb et al., 2003). Ainsi, chez *S. cerevisiae*, il semble que les fourches de réplication bloquées possèdent la capacité intrinsèque à régresser, mais que cette régression est inhibée par l'activité du point de contrôle de réplication. Alors, comment relier



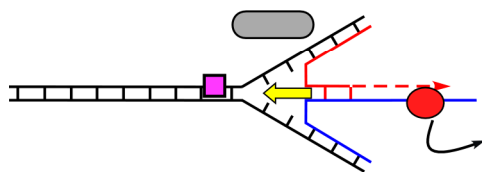
Blocage de la fourche de réplication, découplage entre l'hélicase DnaB et la polymérase répliquative DNA Pol III en train de synthétiser le brin leader (rouge).



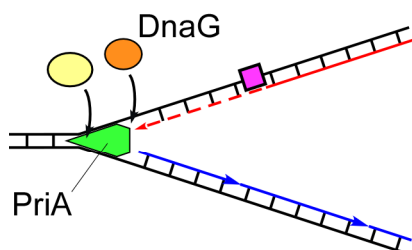
Régression de la fourche stimulée par RecG, avec l'hydrolyse d'ATP fournissant l'énergie nécessaire



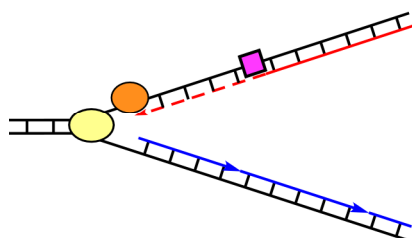
Appariement des brins néo-synthétisés



Synthèse du brin leader en utilisant comme modèle le brin retardé



Retournement de la fourche régressée stimulé par RecG et rechargement du réplisome (hélicase DnaB et primase DnaG) grâce à PriA



Reformation de la fourche de réplication en aval de la lésion

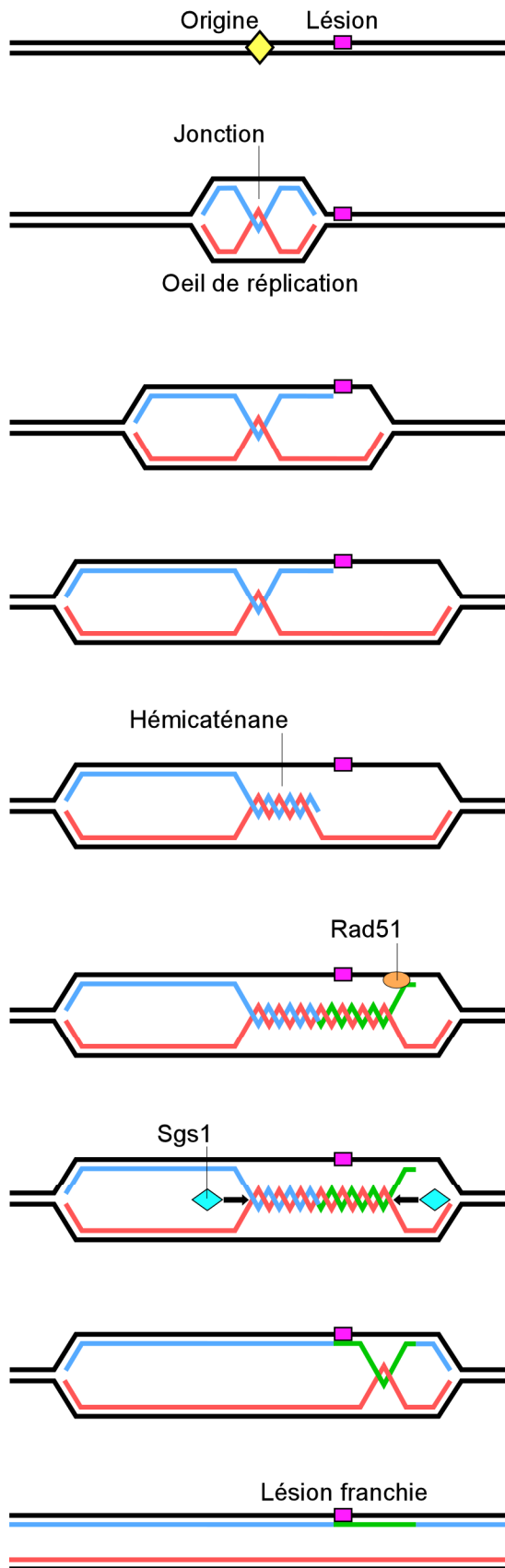
Figure 13. Modèle de franchissement d'une lésion par la fourche de réplication chez les procaryotes : régression puis retournement de la fourche.

cette fonction du point de contrôle avec l'activité de Sgs1 et le franchissement sans erreur des lésions par la fourche, tous ces mécanismes semblant entremêlés ?

ii. Modèle de l'hémi-caténane

Un modèle de franchissement sans erreur des lésions a été évoqué par le groupe de Foiani suite aux observations de Lopes et al. (Lopes et al., 2003) : en étudiant chez *S. cerevisiae* la topologie des molécules d'ADN en cours de réplication par migration de celles-ci sur gel d'agarose en deux dimensions, ils ont montré que des structures d'ADN en forme de X apparaissent lors de l'initiation de l'origine de réplication. De telles molécules avaient déjà été observées chez *S. cerevisiae* au cours du cycle méiotique (Schwacha and Kleckner, 1994) et chez *S. pombe* au cours du cycle mitotique (Segurado et al., 2002). Dans les deux cas elles avaient été associées à la recombinaison homologue. Lopes et al. (2003) ont montré que la structure en X qu'ils observent apparaît en phase S du cycle mitotique, et qu'elle dépend de l'activation des origines de réplication, mais pas de Rad51 ou Rad52. Cette structure se forme donc indépendamment de la recombinaison et, de plus, elle progresse sur l'ADN au cours de la réplication. Ils n'ont pas réussi à élucider la formation de cette structure, mais ils l'ont attribué à un croisement des brins néo-synthétisés lors du démarrage de la fourche de réplication. Le point intéressant est que ces jonctions entre chromatides sœurs peuvent être en théorie converties en hémi-caténanes suite à l'appariement des deux brins néo-synthétisés (Figure 14).

Ces observations ont été complétées en 2005 par Liberi et al., qui ont mis en évidence, chez des mutants *sgs1* de *S. cerevisiae*, l'accumulation de structures cruciformes au niveau des fourches bloquées (Liberi et al., 2005). Ces structures nécessitent pour s'accumuler la présence de Rad51, indiquant qu'elles correspondent à des intermédiaires de recombinaison. Les mutants *sgs1* seraient donc incapables de résoudre ces structures lorsqu'elles se forment suite à un blocage des fourches de réplication. Il en est de même pour les mutants de la topoisomérase 3, partenaire de Sgs1 dans la résolution des jonctions de Holliday au cours de la recombinaison homologue (Ira et al., 2003). En corrélant ces observations avec celles de Lopes et al., le groupe de Foiani avance un modèle intéressant de franchissement sans erreur des lésions. Lorsque la polymérase se retrouve bloquée sur un des deux brins de l'ADN, la jonction entre chromatides sœurs évoquée précédemment migre jusqu'au blocage, et cela permet l'appariement des deux brins néo-synthétisés et la reprise de la synthèse du deuxième brin en utilisant comme modèle le brin néo-synthétisé qui lui a progressé au-delà de la lésion (Figure 14). Ce modèle correspond bien au modèle de « template switching » évoqué en 1976 par Higgins et al. Après le franchissement de la lésion par l'hémi-caténane ainsi formé, le brin



Activation de l'origine de réplication

Formation de l'oeil et des fourches de réplication, jonction entre les brins néo-synthétisés

Blocage de la synthèse du brin leader

Découplage de synthèse des brins

Formation d'un hémicaténane: désappariement du brin leader qui forme une double hélice avec le brin retardé

Synthèse du brin leader avec le brin retardé comme modèle, puis réappariement avec le brin parental grâce à Rad51

Résolution de l'hémicaténane par l'hélicase RecQ Sgs1

Rétablissement de la fourche de réplication

Fin de la réplication

Figure 14. Modèle de franchissement sans erreur d'une lésion de l'ADN par la fourche de réplication chez la levure.

néo-synthétisé viendrait se ré-apparier sur son brin modèle initial, via l'activité de Rad51. Sgs1 interviendrait ensuite pour dérouler l'hémi-caténane et reformer la simple jonction entre les brins néo-synthétisés telle qu'elle existait juste après sa formation à l'origine de réplication. La lésion serait ainsi franchie, sans générer de mutations. Selon ce modèle, l'instabilité génomique observée dans les cellules *sgs1* (Myung et al., 2001) s'expliquerait par leur incapacité à franchir correctement les lésions de l'ADN par la voie non mutagénique.

Le modèle de l'hémi-caténane a l'avantage de correspondre avec la plupart des observations concernant le blocage des fourches chez *S. cerevisiae*. Nous avons vu précédemment qu'en l'absence de point de contrôle fonctionnel, les fourches bloquées avaient tendance à régresser. Le point de contrôle servant à stabiliser le réplisome et la fourche lors d'un blocage (Lopes et al., 2001; Tercero and Diffley, 2001), son absence entraînerait une perte du réplisome à la fourche. L'hémi-caténane migrant toujours, son arrivée au niveau de la fourche dépourvue de réplisome entraînerait sa fuite, libérant ainsi les extrémités des deux brins néo-synthétisés qui pourraient s'apparier à nouveau pour former la structure en « chicken foot » (Sogo et al., 2002) (Figure 15). Cette structure pourrait se former en absence de Rad51 étant donnée la proximité des extrémités des deux brins néo-synthétisés (Lopes et al., 2001). De plus, l'assemblage des nucléosomes pourrait la stabiliser, rendant ainsi le redémarrage de la réplication impossible. Cela expliquerait l'incapacité des cellules mutées pour Rad53 à redémarrer la réplication après un blocage transitoire (Lopes et al., 2001).

c) Chez les eucaryotes supérieurs

Chez les eucaryotes supérieurs, la régression d'une fourche peut être effectuée *in vitro* grâce à rad51 (Yoon et al., 2004), mais il est peu probable que cela intervienne *in vivo* étant donné que p53, stabilisée par le point de contrôle de réplication suite à un blocage des fourches (cf. partie B), inhibe cette régression dépendant de Rad51 (Yoon et al., 2004). Dans ce cas, le modèle de l'hémi-caténane est-il transposable aux eucaryotes supérieurs ? Des hémi-caténanes tels que ceux décrits par le groupe de Foiani chez *S. cerevisiae* ont aussi été observées sur gel d'agarose 2D lors d'études de réplication de plasmides dans des extraits d'œufs de Xénope (Lucas and Hyrien, 2000). Reste à savoir si les homologues de Sgs1, les hélicases BLM et WRN, peuvent aussi assurer la même fonction que Sgs1 dans la résolution des hémi-caténanes lors de la réplication. Ces deux hélicases sont capables de résoudre des jonctions de Holliday *in vitro* (Constantinou et al., 2001; Karow et al., 2000) et sont hyperphosphorylées pendant un blocage de la réplication (Franchitto and Pichierri, 2002).

Blocage / ralentissement des fourches

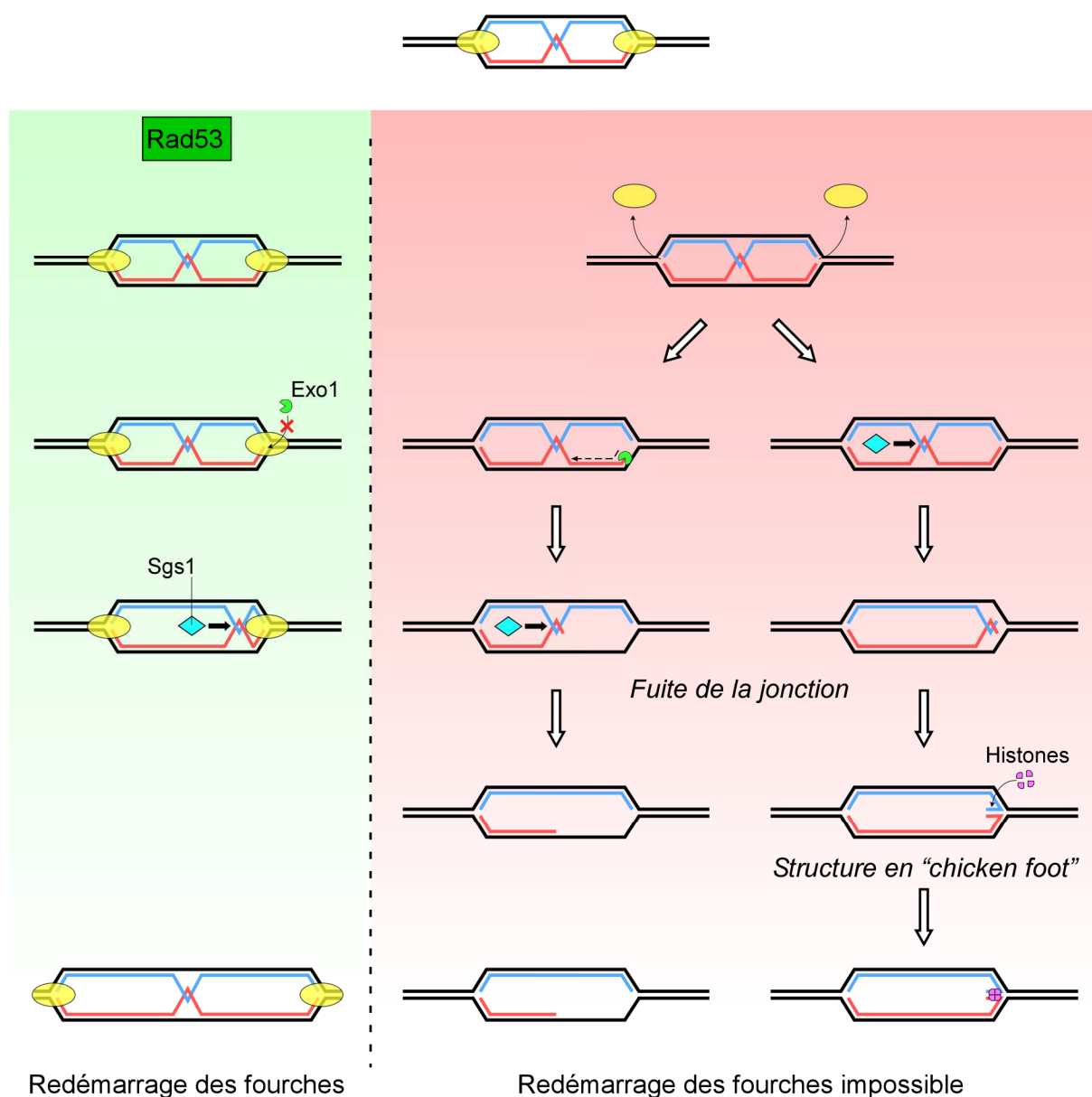


Figure 15. Devenir de la fourche de réplication bloquée chez la levure. En présence de Rad53 et d'un point de contrôle de la réplication fonctionnel (partie verte), le réplisome stabilisé aux fourches empêche l'attaque des brins néo-synthétisés par l'exonucléase 1 (Exo1) ainsi que la fuite de la jonction entre ces brins avec l'activité hélicase de Sgs1. En absence de point de contrôle fonctionnel (partie rouge), le réplisome quitte les fourches de réplication car il n'y est pas stabilisé. La libération des extrémités des brins néo-synthétisés peut engendrer la fuite de la jonction entre ces brins avec l'activité de Sgs1. Les extrémités peuvent avoir été préalablement attaquées par Exo1 (colonne de gauche), mais si tel n'est pas le cas, elles sont libres et suffisamment proches pour s'hybrider et former une structure en « chicken foot » qui sera ensuite stabilisée par la formation de nucléosomes. Dans ces deux cas, le redémarrage des fourches sera impossible après la levée du blocage.

Cette phosphorylation nécessite qu'ATR soit fonctionnelle (Davies et al., 2004; Franchitto and Pichierri, 2002) et constitue donc le lien entre le signal d'activation du point de contrôle qui part de la fourche bloquée et BLM/WRN. De plus, BLM est phosphorylée par CHK1 même en absence de dommages, ce qui a pour effet de la stabiliser car la déplétion de CHK1 par interférence ARN entraîne une diminution du niveau cellulaire de BLM (Sengupta et al., 2004). C'est peut-être l'activité basale de CHK1 qui est responsable de cette stabilisation, mais il faudra dans le futur déterminer comment la phosphorylation de BLM prévient sa dégradation, son ubiquitinylation n'ayant jamais été observée.

La phosphorylation dépendant d'ATR de BLM semble nécessaire pour relancer les fourches de réplication après un blocage transitoire (Davies et al., 2004). Cependant, elle ne semble pas indispensable pour terminer la réplication car les patients atteints des syndromes de Bloom ou Werner (mutation de BLM ou WRN) sont viables, bien qu'ayant des prédispositions à certains cancers. De plus, des cellules BS surexprimant un mutant de BLM incapable d'être phosphorylé par ATR sont capables de redémarrer la réplication après un blocage transitoire ; cependant elles ne progressent que jusqu'en phase G2 où elles s'arrêtent après l'activation du point de contrôle G2/M (Davies et al., 2004). Cela signifie que, suite à la surexpression de cette forme de BLM non phosphorylable par ATR, des lésions ont été introduites dans l'ADN et reconnues en G2. De plus, la mutation des sites de phosphorylation de BLM par ATR rend les cellules hypersensibles à l'hydroxyurée (Davies et al., 2004), de la même manière que l'absence totale de BLM (Rassool et al., 2003).

Ces résultats évoquent un rôle de BLM dans la réponse au blocage des fourches initiée par ATR. D'autres observations indiquent un tel rôle. Par exemple, BLM co-localise avec Rad51 au niveau des foyers Rad51 formés lors d'un blocage des fourches de réplication (Davies et al., 2004), mais cette co-localisation est indépendante d'une phosphorylation par ATR, indiquant que BLM pourrait être phosphorylée par ATR après son arrivée aux fourches bloquées. De plus, BLM interagit avec Rad51 (Bischof et al., 2001; Wu et al., 2001). Quant à WRN, elle co-localise aussi avec Rad51 et RPA au niveau des foyers Rad51 formés après des dommages de l'ADN (Constantinou et al., 2000; Sakamoto et al., 2001) et cette co-localisation nécessite son interaction avec 53BP1 (Sengupta et al., 2004). Bien que cela reste à démontrer, on peut imaginer pour BLM/WRN un modèle similaire à celui évoqué par le groupe de Foiani pour Sgs1. Il faudrait pour cela montrer l'existence d'hémicaténanes *in vivo* chez l'homme. Ce qui est évident est le rôle de ces hélicases pour maintenir l'intégrité des

fourches de réplifications, comme le montre les altérations de la topologie des fourches observées dans des cellules WRN (Rodriguez-Lopez et al., 2002).

Un autre rôle pour les hélicases BLM et WRN a été avancé, mais il intervient lorsque les fourches de réplification s'effondrent et que la cellule utilise la recombinaison homologue pour les réparer.

D - REPARATION DES FOURCHES DE REPLICATION PAR RECOMBINAISON

I. Effondrement des fourches de réplication : apparition de cassures double brin

Lorsqu'une cassure double brin apparaît dans le génome suite à un stress exogène ou endogène, il est impératif de réparer l'ADN immédiatement. La cellule est capable de détecter des cassures double brin n'importe quand dans le cycle cellulaire, et utilise deux moyens de réparer : Jonction d'Extrémités Non Homologues (« NHEJ », potentiellement mutagène) en G1, et recombinaison homologue en S ou G2, la présence des chromatides sœurs facilitant ce processus (Figure 16). Une seule cassure double brin est capable d'activer un point de contrôle dans la cellule, quelle que soit la phase du cycle cellulaire.

Outre les stress exogènes induisant des cassures double brin, la principale source endogène de ces lésions est la réplication. En effet, la fourche de réplication peut générer des cassures double brin de différentes façons. Tout d'abord, la rencontre de la fourche de réplication avec une cassure simple peut engendrer un effondrement de celle-ci et faire apparaître une extrémité double brin libre. D'autre part, la résolution des fourches bloquées peut nécessiter leur clivage, libérant aussi une extrémité double brin libre. Ce clivage est assuré chez tous les eucaryotes étudiés par l'hétérodimère Mus81-Eme1 (Mus81-Mms4 chez *S. cerevisiae*). Ce complexe possède une activité endonucléase et une forte affinité pour les structures d'ADN en fourche (Ciccina et al., 2003; Whitby et al., 2003). Les cassures double brin de la fourche engendrent une structure particulière avec une seule extrémité double brin libre (Figure 17). Cette structure, observée aussi chez *E. coli* (Kuzminov, 1995), doit être absolument réparée pour relancer la fourche de réplication. Même si certains aspects de la réparation, notamment les protéines qui interviennent, sont conservés avec la réparation d'une cassure double brin « conventionnelle », la nature même de la lésion (une seule extrémité libre) et sa localisation à proximité du réplisome font que l'activation des protéines de réparation est légèrement différente.

II. Reconnaissance des cassures double brin au niveau des fourches

Suite à une irradiation des cellules, les cassures double brin formées sont visibles en immunofluorescence suite au marquage de la forme phosphorylée de l'histone H2AX,

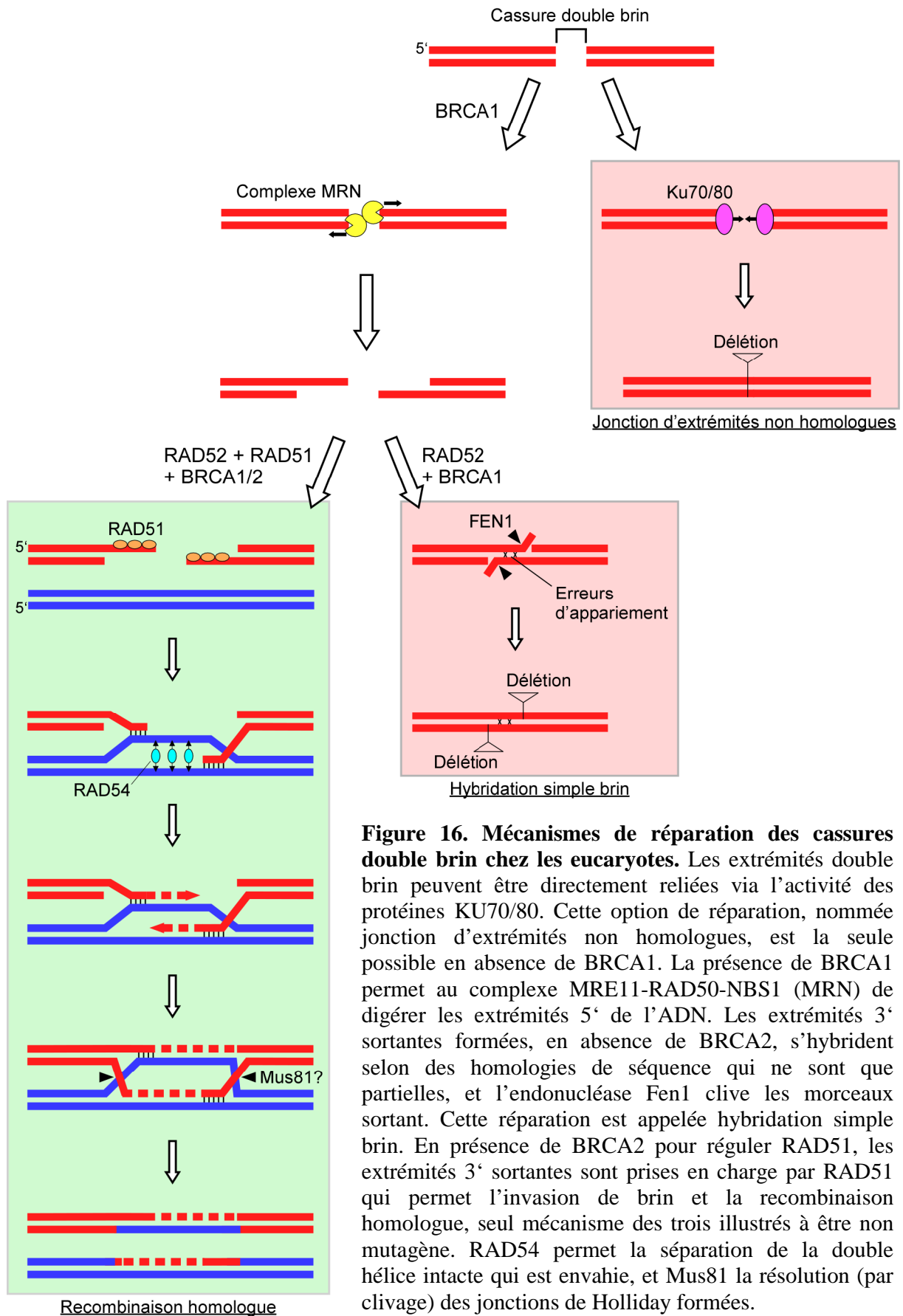


Figure 16. Mécanismes de réparation des cassures double brin chez les eucaryotes. Les extrémités double brin peuvent être directement reliées via l'activité des protéines KU70/80. Cette option de réparation, nommée jonction d'extrémités non homologues, est la seule possible en absence de BRCA1. La présence de BRCA1 permet au complexe MRE11-RAD50-NBS1 (MRN) de digérer les extrémités 5' de l'ADN. Les extrémités 3' sortantes formées, en absence de BRCA2, s'hybrident selon des homologies de séquence qui ne sont que partielles, et l'endonucléase Fen1 clive les morceaux sortant. Cette réparation est appelée hybridation simple brin. En présence de BRCA2 pour réguler RAD51, les extrémités 3' sortantes sont prises en charge par RAD51 qui permet l'invasion de brin et la recombinaison homologue, seul mécanisme des trois illustrés à être non mutagène. RAD54 permet la séparation de la double hélice intacte qui est envahie, et Mus81 la résolution (par clivage) des jonctions de Holliday formées.

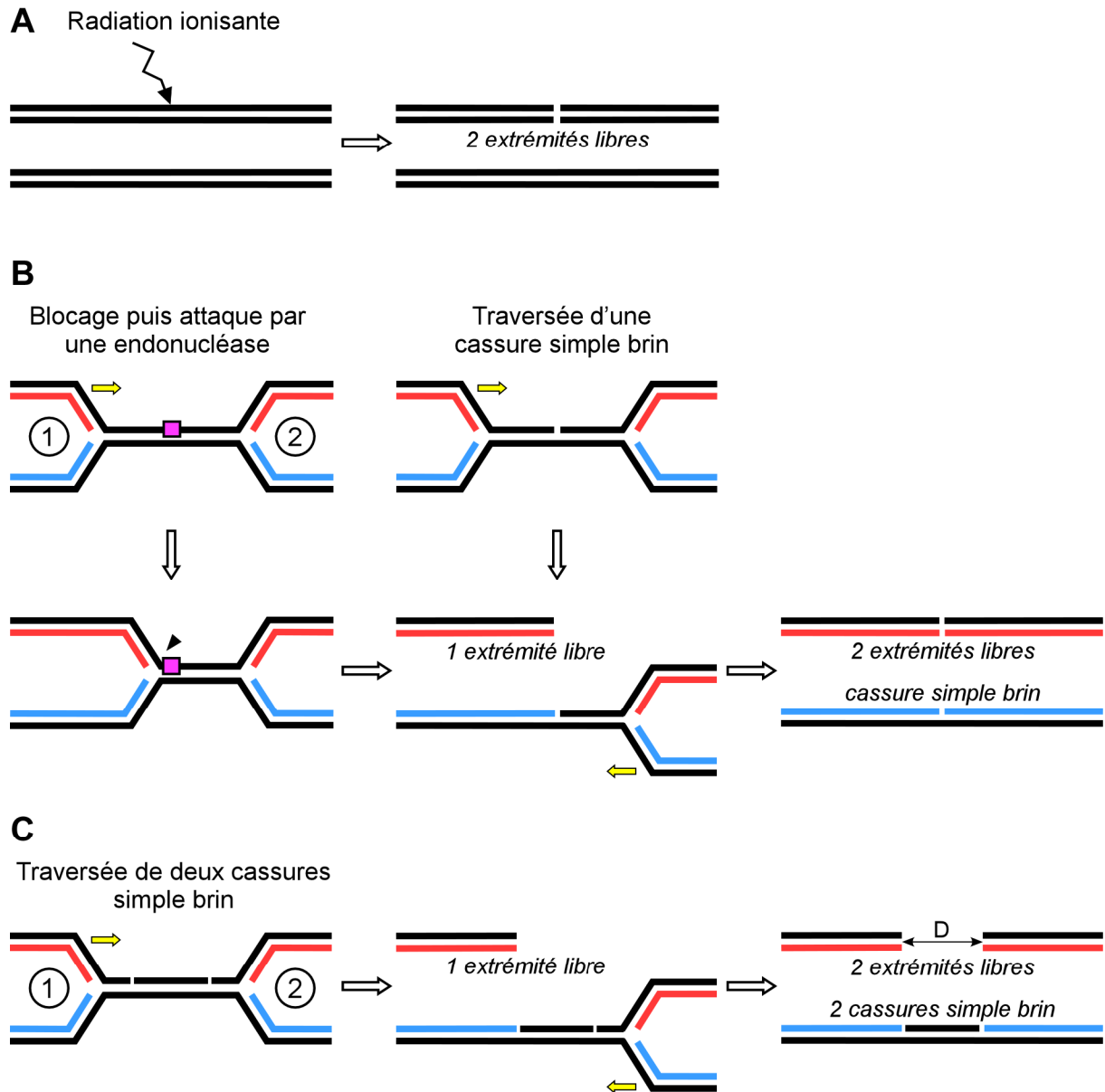


Figure 17. Particularités des cassures double brin de l'ADN générées aux fourches de réplication. (A) Une cassure double brin apparue suite à une irradiation est caractérisée par deux extrémités double brin libres sur une des deux chromatides, l'autre chromatide restant intacte. (B) Une cassure double brin apparaît au niveau de la fourche de réplication n°1 suite à son blocage et son attaque par une nucléase, ou sa traversée d'une cassure simple brin. Cette cassure ne comporte qu'une seule extrémité double brin libre. Si elle n'est pas réparée, on peut penser que la fourche n°2 parviendra jusqu'à son niveau, permettant l'apparition d'une deuxième extrémité double brin libre, donnant ainsi une cassure proche de celle apparaissant après irradiation. Dans ce cas cette cassure pourra être réparée par la recombinaison homologue traditionnelle, comme en (A). (C) Si deux cassures simple brin sont traversées par les fourches n°1 et 2, une cassure double brin apparaîtra dont les extrémités libres pourront être très espacées, en fonction de la distance séparant initialement les deux cassures simples brins. La réparation pourra s'avérer difficile si cette distance est importante. Le résultat sera identique si les deux fourches sont bloquées par des lésions puis clivées.

γ -H2AX (Rogakou et al., 1999; Rogakou et al., 1998). γ -H2AX permet le recrutement du complexe MRN (Mre11-Rad50-Nbs1) (Celeste et al., 2002; Paull et al., 2000) qui participe à l'activation de la kinase ATM et digère l'ADN via son activité exonucléase 5'-3' pour faire apparaître les extrémités 3' sortantes utilisées par Rad51 pour effectuer la réaction de recombinaison homologue (Bressan et al., 1999; Ivanov et al., 1992; Moore and Haber, 1996) (Figure 16). Ces processus de réponse aux cassures de l'ADN induites par une irradiation, quelle que soit la phase du cycle, sont bien documentés (voir (Shiloh, 2003)), mais qu'en est-il de l'activité du complexe MRN en phase S ?

Plusieurs indications relient le complexe MRN et la réplication. Tout d'abord, les phénotypes des cellules mutées pour *Nbs1* ou *Mre11* montrent une fragmentation de leurs chromosomes, caractéristique des cassures double brin non réparées qui apparaissent lors de la réplication (Carney et al., 1998; Stewart et al., 1999; Varon et al., 1998). Les mêmes conséquences sont obtenues si on mute *Mre11* dans la lignée de cellules de poulet DT40 (Costanzo et al., 2001; Yamaguchi-Iwai et al., 1999). De plus, lors de la phase S, le complexe MRN co-localise avec PCNA au niveau des sites d'incorporation de BrdU dans l'ADN, c'est-à-dire au niveau des fourches de réplication (Mirzoeva and Petrini, 2003). Cette association se renforce lors du blocage des fourches provoqué par un traitement à l'hydroxyurée (Limoli et al., 2002; Wang et al., 2000). Cependant, l'association du complexe MRN avec les fourches de réplication n'est pas restreinte à l'apparition de cassures double brin. En effet, comme les cassures double brin formées suite à une irradiation des cellules, les cassures apparaissant au niveau des fourches de réplication sont marquées par γ -H2AX (Limoli et al., 2002; Wang et al., 2000; Ward and Chen, 2001), mais la co-localisation du complexe MRN et de γ -H2AX reste très limitée au cours de la phase S (Mirzoeva and Petrini, 2003). Ainsi, en phase S, γ -H2AX ne semble pas responsable du recrutement du complexe MRN sur la chromatine. Un autre moyen de détecter des fourches en cours de réparation est d'observer BRCA1, qui intervient aussi dans la recombinaison homologue. Là encore, aucune co-localisation de *Mre11* et BRCA1 n'est visible en phase S, bien que ces deux protéines soient capables d'interagir et que BRCA1 forme aussi des foyers suite à un blocage des fourches de réplication (Wang et al., 2000; Zhong et al., 1999).

Bien que le complexe MRN soit indispensable à la recombinaison homologue, sa fonction au cours de la réparation des fourches de réplication par recombinaison n'est pas encore totalement claire. Une fonction possible pour le complexe MRN lors de la réplication pourrait être de participer à l'activation du point de contrôle de réplication, ou d'influencer la structure de la chromatine au niveau des fourches effondrées pour permettre leur réparation. On

pourrait aussi imaginer que son activité exonucléase n'est pas nécessaire étant donnée la particularité des cassures double brin formées aux fourches de réplication. Cela impliquerait que l'effondrement de la fourche de réplication résulte en une cassure possédant déjà l'ADN simple brin nécessaire à l'invasion de brin pour la recombinaison, ce qui reste à vérifier.

III. Les foyers nucléaires

1. Formation des foyers nucléaires

Les cellules procaryotes répondent aux dommages de l'ADN en activant la production de protéines de réparation, processus qui porte le nom de « réponse SOS » (Walker et al., 1985). Les eucaryotes ne disposent pas d'équivalent à la réponse SOS, mais ont développé une stratégie consistant à redistribuer les protéines de réparation de l'ADN existantes, afin de les concentrer au niveau des dommages, dans ce que l'on appelle des foyers, ou foci, nucléaires. Ces foyers sont visibles en immunofluorescence dans environ 10% des cellules et leur nombre augmente fortement après une irradiation, c'est-à-dire en présence de dommages nécessitant une réparation par recombinaison homologue (Bishop, 1994; Haaf et al., 1995). En phase S, ils apparaissent spontanément, sans aucun stress génotoxique (Golub et al., 1998; Raderschall et al., 1999; Tashiro et al., 1996). Ainsi, les cassures double brin qui apparaissent lors de la réplication de l'ADN semblent prises en charge par la recombinaison homologue, permettant la réparation des fourches de réplication effondrées.

2. Composition moléculaire des foyers nucléaires et fonction

L'aspect dynamique et la composition moléculaire des foyers nucléaires, contenant notamment la recombinase Rad51 et ses co-facteurs Rad52 et Rad54, a suggéré aux différents observateurs que les foyers Rad51 induits par irradiation correspondaient à des sites de réparation de l'ADN (Essers et al., 2002; Tashiro et al., 2000). En effet, l'activité d'échange de brin de Rad51 avait déjà été démontrée, aussi bien chez la levure (Shinohara et al., 1992; Sung and Robberson, 1995) que chez l'homme (Baumann et al., 1996).

Le chargement de Rad51 au niveau des cassures double brin requiert la présence d'ADN simple brin suite à la digestion de l'ADN par le complexe MRN. L'affinité de Rad51 pour l'ADN simple brin étant faible (McIlwraith et al., 2000), c'est Rad52 qui facilite son chargement (New et al., 1998; Shinohara and Ogawa, 1998). Rad52, en présence de Rad51, joue le rôle de médiateur pour la recombinaison homologue par la voie d'invasion de brin

(Milne and Weaver, 1993; Shen et al., 1996), tandis qu'en l'absence de Rad51, elle promeut la recombinaison par la voie d'hybridation simple brin, potentiellement mutagène (Mortensen et al., 1996). Quant à Rad54, elle permettrait le changement de conformation du duplex d'ADN intact pour favoriser son invasion par le brin d'ADN provenant du duplex lésé (Petukhova et al., 1999; Sigurdsson et al., 2002) (Figure 16).

IV. BRCA1 et BRCA2

1. BRCA1 et 2 assurent la stabilité génomique

Chez les mammifères, les gènes *Brca1* et 2 codent pour des protéines de haut poids moléculaire (Figure 18), structurellement différentes l'une de l'autre, et exprimées principalement lors des phases S et G2 du cycle cellulaire. *Brca1* a été identifié en 1994, et *Brca2* un an plus tard. Jusqu'à peu on pensait que les protéines qu'ils codent n'avaient d'homologues chez aucun autre eucaryote, traduisant leur arrivée tardive dans l'évolution et leur fonction spécifique chez les mammifères. Nous verrons plus loin que ce n'est pas le cas.

La mutation de *BRCA1* ou 2 chez les mammifères entraîne une instabilité chromosomique causant une prédisposition au cancer du sein et des ovaires. D'ailleurs, *Brca1* a été le premier gène associé au cancer spécifiquement chez la femme. Des cellules murines déficientes pour *BRCA1* ou 2 montrent des aberrations chromosomiques telles que des cassures, des délétions ou translocations (englobées sous le nom de GCR, pour « Gross

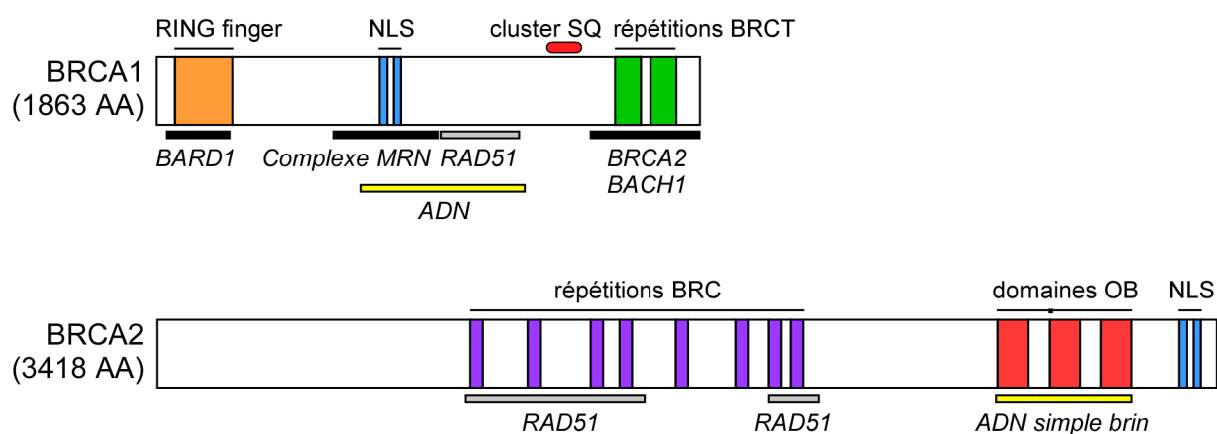


Figure 18. Domaines fonctionnels de BRCA1 et BRCA2. Les deux protéines, dont les tailles en acides aminés (AA) sont indiquées sur la gauche, interagissent entre elles, avec beaucoup d'autres protéines et avec l'ADN. Certains interacteurs et les domaines impliqués sont indiqués par des barres horizontales colorées. Abréviations: NLS: Signal de Localisation Nucléaire; BRCT: BRCA1 « Carboxy-Terminal » ; OB: « Oligonucleotide Binding ».

Chromosomal Rearrangements »), des structures tri- et quadriradiales (Patel et al., 1998; Xu et al., 1999; Yu et al., 2000). De telles aberrations sont aussi présentes dans des lignées cellulaires humaines cancéreuses déficientes pour BRCA1 ou 2 (Gretarsdottir et al., 1998; Tirkkonen et al., 1997) et peuvent s'expliquer par une déficience de recombinaison homologue (Moynahan et al., 1999; Moynahan et al., 2001; Snouwaert et al., 1999; Zhang et al., 2004). Cela illustre le rôle de BRCA1 et 2 dans la réparation des cassures double brin apparues lors de la réplication, dont la réparation est nécessaire pour assurer la stabilité du génome. En conséquence, les cellules déficientes pour BRCA1 sont hypersensibles à l'irradiation (Chen et al., 1998; Gowen et al., 1998).

2. Rôle de BRCA1 et 2 dans la recombinaison homologue

a) Après une irradiation

Suite à une irradiation, BRCA1 et Mre11 interagissent et les foyers qu'elles forment co-localisent (Wang et al., 2000; Zhong et al., 1999). De plus, BRCA1 est recrutée aux foyers de γ -H2AX avant Rad51 (Paull et al., 2000) et est nécessaire à la formation des foyers Rad51 (Bhattacharyya et al., 2000). Ce recrutement de Rad51 par BRCA1 pourrait se faire via l'intermédiaire de BRCA2, car BRCA2 interagit avec Rad51 (Mizuta et al., 1997; Wong et al., 1997) et avec BRCA1 (Chen et al., 1998). Cela expliquerait pourquoi les deux protéines, BRCA1 et 2, sont nécessaires à l'assemblage des foyers Rad51 après une irradiation et à des niveaux de recombinaison normaux pour réparer les cassures double brin de l'ADN (Bhattacharyya et al., 2000; Moynahan et al., 1999; Moynahan et al., 2001; Sharan et al., 1997; Xia et al., 2001; Yuan et al., 1999).

b) Pendant la réplication

En phase S, BRCA1 est fortement exprimée et forme des foyers qui, suite à un blocage de la réplication, se déplacent au niveau des fourches de réplication, au vu de leur co-localisation partielle avec PCNA (Scully et al., 1997; Wang et al., 2000). Ce profil de localisation fait penser à celui du complexe MRN que nous avons évoqué précédemment, et indique un rôle de BRCA1 dans la réparation des fourches de réplication effondrées. Une hypothèse qui paraît plausible est le recrutement par BRCA1 de BRCA2 et Rad51 aux fourches. Cependant, en phase S, l'assemblage des foyers Rad51 aux fourches de réplication bloquées ou effondrées peut se faire sans BRCA2 (Tarsounas et al., 2003). Le modèle actuel stipule qu'en phase S, BRCA2 participe plutôt à la stabilisation des fourches bloquées (cf. partie E) qu'au guidage de Rad51 pour la réparation par recombinaison homologue des

fourches effondrées. Le mécanisme moléculaire du recrutement de Rad51 au niveau des cassures double brin apparaissant en phase S reste donc encore à expliquer, de même que la fonction de BRCA1. Il faut tenir compte du fait que la structure à réparer est différente de celle résultant d'une irradiation (Figure 17), et que le modèle de réparation connu ne se transpose pas forcément à la réplication. Un point qui sera peut-être important pour résoudre ces interrogations, est l'activité biochimique de BRCA1.

3. Activité biochimique de BRCA1

a) Domaine RING finger, association avec BARD1

BRCA1 appartient à la famille des ubiquitine E3 ligase à domaine RING finger. L'importance de ce domaine et de l'activité E3 ligase putative de BRCA1 est traduite par la fréquence de mutations du RING finger dans les cancers héréditaires liés une déficience de BRCA1 (Brzovic et al., 2003; Brzovic et al., 2001; Hashizume et al., 2001; Ruffner et al., 2001). De plus, l'hypersensibilité à l'irradiation des cellules déficientes pour BRCA1 ne peut pas être complétée par l'apport de la protéine mutée dans le domaine RING finger.

Le domaine RING Finger de BRCA1 lui permet notamment de s'associer à BARD1, une autre protéine comportant comme elle un domaine RING finger et des domaines BRCT (BRCA1 C-Terminal) en tandem (Wu et al., 1996). La cristallisation des fragments de BRCA1 et BARD1 permettant l'interaction (et contenant les domaines RING finger) a montré que l'interaction BRCA1-BARD1 dépend des deux hélices α bordant les séquences de fixation du zinc de chaque domaine RING finger (Brzovic et al., 2001) (Figure 19). L'hétérodimère ainsi formé a une activité E3 ligase bien plus importante que BRCA1 seule (Hashizume et al., 2001; Wu et al., 1996; Xia et al., 2003), bien que seule BRCA1 soit capable d'interagir avec la E2 du système, UbcH5c (Brzovic et al., 2003). L'activité E3 de BRCA1 avait d'ailleurs été observée la première fois *in vitro* en absence de BARD1 (Lorick et al., 1999). Les auteurs avaient démontré que la chélation du zinc bloquait cette activité, montrant l'importance de la bonne conformation du RING finger. L'importance du RING finger a été confirmée par la suite avec la démonstration que seule la moitié N-terminale de BRCA1 le contenant est capable d'avoir une activité E3 ligase (Ruffner et al., 2001). Cependant, cette activité étant fortement stimulée par l'association de BRCA1 avec BARD1, il faut considérer la fonction de BRCA1 en rapport avec BARD1. C'est pourquoi des mutations de BARD1 sont aussi retrouvées dans des cancers héréditaires du sein et des ovaires (Ghimenti et al., 2002; Ishitobi et al., 2003). Une déplétion de BARD1 chez la souris entraîne quasiment le même phénotype que l'absence de BRCA1 : léthalité embryonnaire et

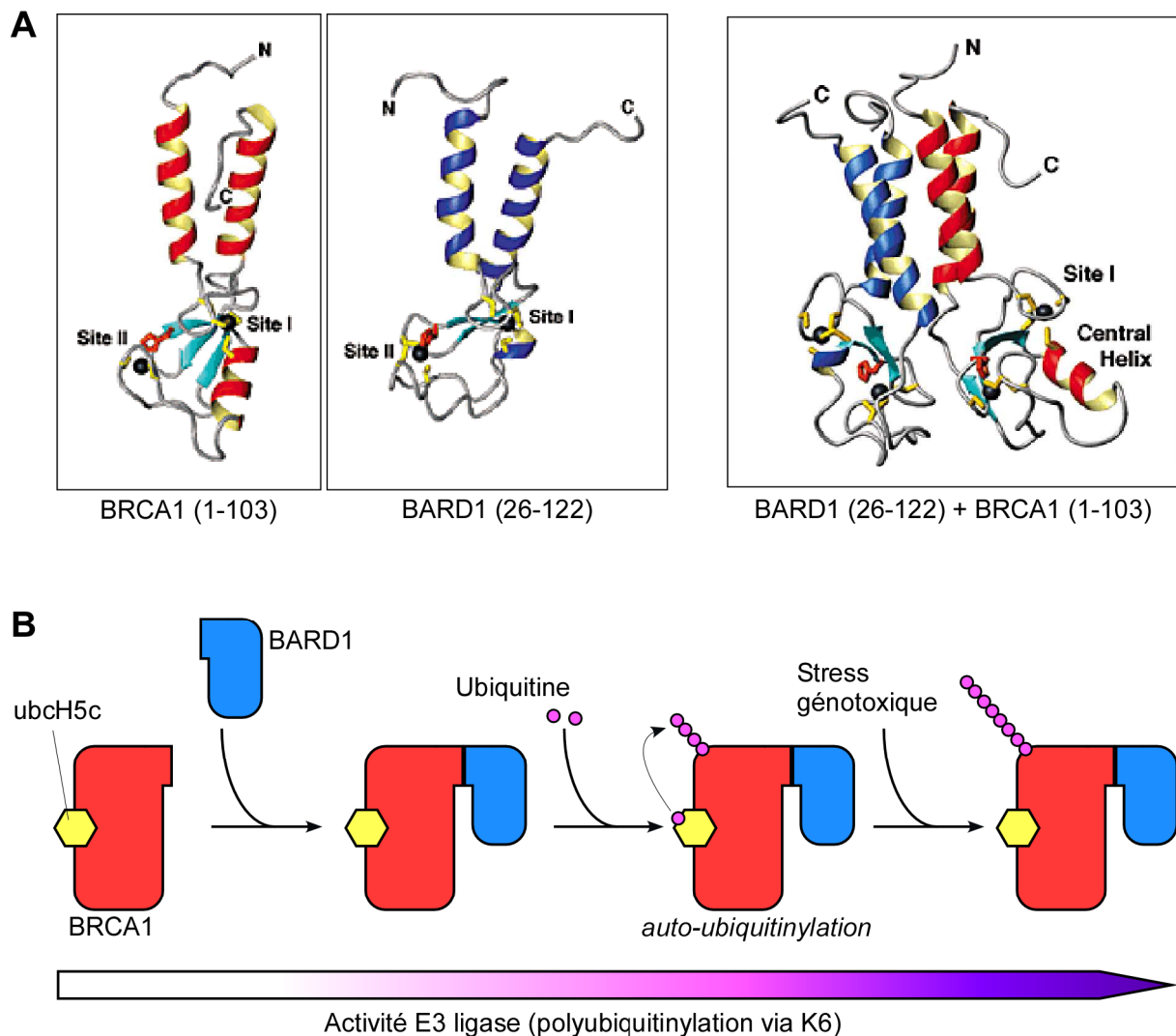


Figure 19. Assemblage et fonctionnement du dimère BRCA1-BARD1. (A) D'après Brzovic et al., 2001. Structure des portions de BRCA1 (en rouge) et BARD1 (en bleu) cristallisées par les auteurs. Les domaines RING Finger, permettant l'assemblage entre BRCA1 et BARD1, sont situés entre les résidus 23 et 76 de BRCA1 et 49 et 101 de BARD1. Ils contiennent chacun deux sites de fixation au zinc (Site I et II). Les résidus Cys (jaune) ou His (orange) fixant l'ion Zn^{2+} (boule noire) sont indiqués. Le domaine RING Finger de BRCA1 est encadré par 3 hélices α (résidus 8–22, 46–53 and 81–96) et 3 feuillets β (résidus 35–37, 42–44 and 74–76), celui de BARD1 par 2 hélices α (résidus 36–48 and 101–116) et 2 feuillets β (résidus 61–63 and 69–71). (B) Stimulation de l'activité E3 ligase du dimère BRCA1-BARD1. BRCA1, associée à l'enzyme E2 ubcH5C, s'associe à BARD1 via son domaine RING Finger. Cette dimérisation permet l'auto-ubiquitylation du dimère, augmentant son activité. La pleine activité, catalysant la formation de chaînes d'ubiquitines reliées via leur lysine 6, est atteinte en présence d'un stress génotoxique.

instabilité chromosomique (McCarthy et al., 2003). De plus, la présence de BARD1 est indispensable pour la stabilité de BRCA1 (Hashizume et al., 2001; Joukov et al., 2001; Xia et al., 2003).

b) Fonction dans la réparation de l'ADN

Un blocage de la réplication entraîne une co-localisation de BRCA1 et BARD1 avec Rad51 et PCNA au niveau des fourches bloquées (Scully et al., 1997). Suite à une irradiation, une telle co-localisation de BRCA1 et BARD1 est aussi observée avec le complexe MRN (Wang et al., 2000; Zhong et al., 1999). Ces observations indiquent que l'activité E3 ligase du dimère BRCA1-BARD1 joue un rôle fondamental dans la réparation des cassures double brin par la recombinaison homologue. Il faut souligner que l'activité E3 ligase du dimère augmente dans les foyers induits par des dommages ou un arrêt de la réplication (Lomonosov et al., 2003). Une étude plus récente a d'ailleurs révélé que les événements d'ubiquitylation par BRCA1-BARD1 au niveau des cassures induites par une irradiation sont dépendants de la E2 ubcH5c, et qu'ils sont activés via γ -H2AX et ATM/ATR (Polanowska et al., 2006). Cette étude a aussi révélé que ces mécanismes sont conservés chez *C.elegans*, organisme chez lequel l'homologue de BRCA1 est connu depuis 2004 comme un élément nécessaire à la réparation de l'ADN (Boulton et al., 2004). Ces études étendent la fonction de BRCA1-BARD1 aux métazoaires autres que les mammifères.

c) Substrats de BRCA1-BARD1

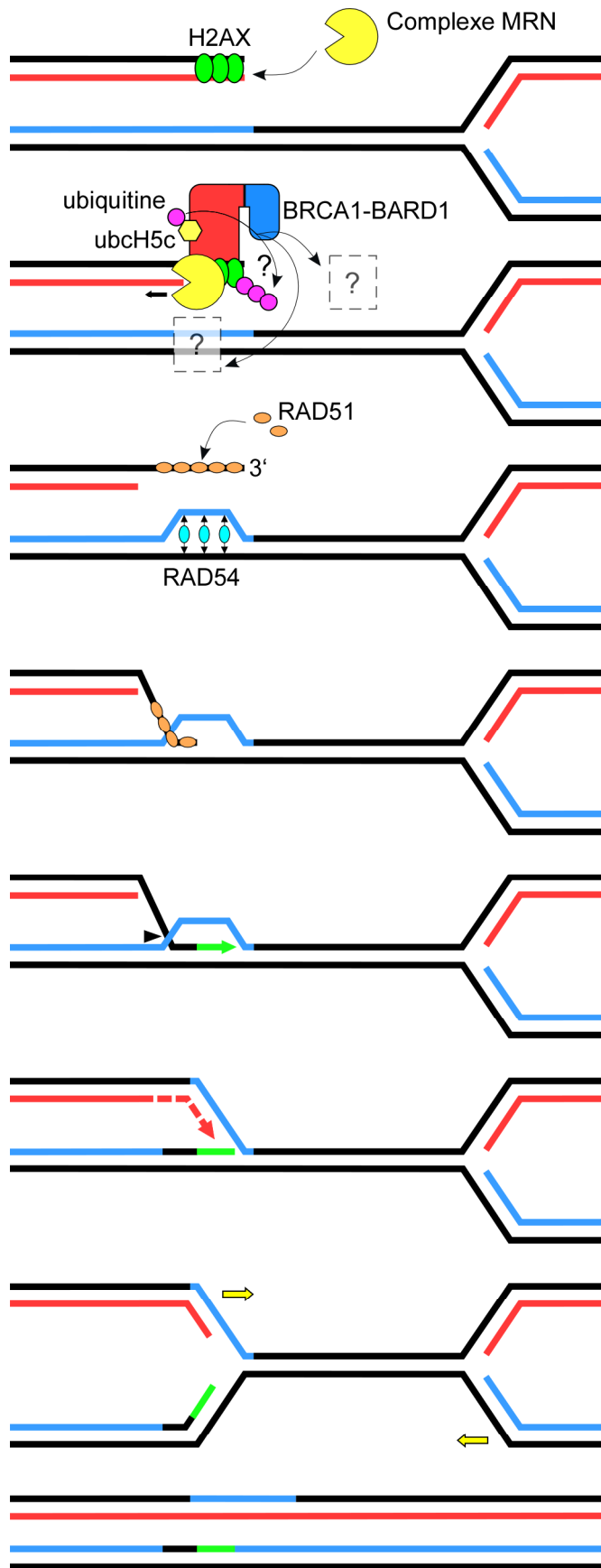
Le point important pour expliquer la fonction du dimère BRCA1-BARD1 dans la réparation des fourches de réplication est l'identification de ses substrats. Malheureusement, pour l'instant, aucune cible n'a été identifiée *in vivo*, les quelques études disponibles ayant toutes été réalisées *in vitro*.

In vitro, BRCA1-BARD1 est incapable de catalyser la formation de chaînes de polyubiquitine via la lysine 48 de l'ubiquitine (Chen et al., 2002; Xia et al., 2003), ce qui implique que son activité ligase n'a pas pour fonction d'envoyer ses substrats vers la dégradation par le protéasome. Au contraire, les chaînes formées le sont via la lysine 6 (K6) de l'ubiquitine (Nishikawa et al., 2004; Wu-Baer et al., 2003). Ces données sont en accord avec l'observation qu'une surexpression de l'ubiquitine mutée pour K6 (remplacée par une arginine) inhibe l'ubiquitylation dépendant de BRCA1-BARD1 au niveau des foyers de réparation de l'ADN (Morris and Solomon, 2004). Ce type de chaîne atypique peut être pris en charge par le protéasome, non pas pour une dégradation mais pour une désubiquitylation (Nishikawa et al., 2004). L'idée actuelle est que la poly-ubiquitylation d'une protéine via K6 a tendance à la

stabiliser, par un mécanisme qui reste à expliquer. Cela explique peut-être la déstabilisation de BRCA1 observée en absence de BARD1 : en effet, le dimère est capable de s'auto-poly-ubiquitinyler sur BRCA1 par une chaîne K6 *in vitro*, ce qui a pour effet d'augmenter d'un facteur 20 l'activité E3 ligase du dimère (Chen et al., 2002; Mallery et al., 2002) (Figure 19). On peut donc imaginer un rétro-contrôle positif : quand le dimère BRCA1-BARD1 est localisé aux foyers de réparation, son activité est stimulée par des composants du point de contrôle, puis il s'auto-ubiquitinye, ce qui augmente encore son activité, etc... Ce système de contrôle aurait comme avantage de concentrer l'activité du dimère au niveau des sites de recombinaison. Un substrat possible à ces sites est l'histone H2AX, qui peut être ubiquitinylée par BRCA1-BARD1 *in vitro* (Mallery et al., 2002). Si cela s'avérait aussi le cas *in vivo*, cela pourrait avoir par exemple un effet sur la structure de la chromatine pour enclencher la recombinaison.

d) Inactivation de BRCA1-BARD1 ?

Si l'activité de BRCA1-BARD1 est stimulée par l'ubiquitinylation de BRCA1, et que cette modification n'entraîne pas BRCA1 vers la dégradation par le protéasome, comment la cellule met-elle fin à l'activation de BRCA1 une fois les dommages réparés ? On pense immédiatement à une désubiquitinylation, mais pour l'instant rien ne prouve que cela soit le cas. Deux études ont montré que BRCA1 interagit avec une ubiquitine hydrolase, BAP1 (Jensen et al., 1998; Mallery et al., 2002). Cependant, BAP1 n'est pas capable de désubiquitinyler BRCA1 (Mallery et al., 2002), et au contraire, elle fonctionne plutôt en synergie avec BRCA1 pour inhiber la croissance cellulaire (Jensen et al., 1998). BAP1 n'est donc à priori pas le bon candidat comme « désactivateur » de BRCA1. Par contre, rien ne permet de dire si BAP1 est capable de désubiquitinyler les substrats potentiels de BRCA1-BARD1. D'autres études seront nécessaires pour savoir si une enzyme de désubiquitinylation existe pour BRCA1, ou si la prise en charge de sa chaîne K6 par le protéasome est suffisante pour inactiver BRCA1. En tout cas, il faut garder à l'esprit que l'activité E3 ligase de BRCA1 est indispensable pour la réparation des fourches par recombinaison homologue (modèle présenté en Figure 20), et que cette activité est sans doute soumise à une régulation.



L'extrémité double brin libre apparue après la rupture de la fourche est marquée par l'histone H2AX, à la manière d'une cassure double brin standard, permettant le recrutement du complexe MRN.

Le dimère BRCA1-BARD1 est recruté et poly-ubiquitinye des substrats restant à déterminer, H2AX étant un candidat potentiel. Le complexe MRN digère l'ADN pour produire une extrémité 3' sortante.

RAD51 se fixe à l'extrémité 3' sortante créée tandis que RAD54 permet le relâchement de la double hélice intacte.

Invasion de brin menée par RAD51.

Re-synthèse du brin parental et clivage de la jonction: la fourche est rétablie.

Progression de la fourche rétablie.

Fin de la réplication.

Figure 20. Modèle de réparation d'une cassure double brin apparue au niveau d'une fourche de réplication.

E - LA VOIE FANCONI ANEMIA : REPOSE AUX PONTAGES INTER-BRINS

I. Particularités des pontages inter-brins de l'ADN

Les pontages inter-brins, en plus de bloquer les ADN polymérase, bloquent l'hélicase répliquative. Ainsi, ils ne causent pas d'accumulation d'ADN simple brin et, de ce fait, ne permettent pas à la cellule de mettre en œuvre les mécanismes de franchissement que nous avons vu précédemment, et doivent donc être réparés afin de relancer les fourches de répliquation. Cette réparation des pontages inter-brins constitue chez l'homme le modèle le mieux étudié de réparation de la fourche de répliquation lorsqu'elle se retrouve bloquée par une lésion de l'ADN infranchissable. Le terme de réparation est dans ce cas parfaitement approprié, car la prise en charge des pontages inter-brins permet leur franchissement par la fourche de répliquation ainsi que leur réparation, contrairement à la synthèse de translésion ou le changement de brin modèle (cf. partie C). De plus, aucun système n'existe pour détecter et réparer les pontages inter-brins en dehors de la phase S, contrairement aux autres types de lésions. Seule la rencontre entre le pontage et la fourche de répliquation va permettre sa détection et sa réparation via la recombinaison homologue. C'est pourquoi les cellules déficientes pour la recombinaison sont surtout hypersensibles aux agents pontant l'ADN (Thompson and Schild, 2001) en comparaison de leur faible radio-sensibilité, les cassures double brin présentes ailleurs qu'aux fourches pouvant être réparées par d'autres voies de réparation indépendantes de la recombinaison (NHEJ par exemple).

II. Prise en charge des pontages inter-brins

La voie Fanconi anemia (FA) regroupe plusieurs protéines participant collectivement à la réponse aux lésions bloquant les fourches de répliquation, pour coordonner leur signalement à la cellule et leur réparation par recombinaison homologue. Ces protéines sont spécifiquement impliquées dans la réparation des pontages inter-brins, à en juger par l'hypersensibilité spécifique aux agents pontant de l'ADN (cisplatine, mitomycine C), mais pas à l'irradiation, des cellules déficientes pour la voie FA (Patel et al., 1998; Xu et al., 1999; Yu et al., 2000). La mutation d'une seule de ces protéines cause un syndrome clinique rare, l'anémie de Fanconi, caractérisée par des anomalies congénitales, des défaillances de la

moëlle osseuse et une prédisposition à différents cancers (D'Andrea and Grompe, 2003). Les patients atteints de ce trouble autosomal récessif montrent une instabilité chromosomique et une sensibilité aux agents pontant de l'ADN augmentée d'un facteur huit (D'Andrea, 2003; Niedernhofer et al., 2005), et développent à l'âge adulte des carcinomes squameux (Alter, 2003).

Les différents gènes dont la mutation entraîne l'anémie de Fanconi ont été classés en fonction de leur complémentation dans des expériences de fusion de cellules FA (présentant le phénotype de déficience dans la voie FA). Cette complémentation se traduit par la correction de leur hypersensibilité aux agents pontant. A ce jour, douze groupe de complémentation ont été identifiés : FANCA, B, C, D1, D2, E, F, G, I, J, L et M, les plus répandus étant FANCA (60% des cas), FANCC (15%) et FANCG (10%) (Tableau 4).

III. Présentation de la voie FA

1. FANCD2

FANCD2 est une protéine nucléaire de 160 kDa qui assure le lien entre la voie FA et la réparation de l'ADN à proprement parler. Elle est mono-ubiquitinylée en phase S sur la lysine 561, en absence ou en présence d'agents génotoxiques (Garcia-Higuera et al., 2001; Gregory et al., 2003). Cette modification entraîne sa relocalisation du nucléoplasme à la chromatine (Wang et al., 2004), jusqu'en mitose où elle est désubiquitinylée et relâchée de la

Tableau 4. Groupes de complémentation Fanconi Anemia (FA).

Groupe	Protéine	Masse moléculaire (kDa)	Fréquence de mutation chez les patients FA
A	FANCA*	163	60
B	FANCB*	95	rare
C	FANCC*	63	15
D1	FANCD1 / BRCA2**	380	5
D2	FANCD2**#	160	5
E	FANCE*	60	rare
F	FANCF*	42	rare
G	FANCG*	68	10
I	Inconnue	?	rare
J	FANCI / BRIP1**	130	rare
L	FANCL*	52	rare
M	FANCM*	250	rare

*: appartiennent au complexe FA E3 ligase. **: actives sur la chromatine.

#: mono-ubiquitinylée par le complexe FA E3 ligase.

chromatine (Mi and Kupfer, 2005; Montes de Oca et al., 2005; Wang et al., 2004). Le mécanisme du recrutement de la forme mono-ubiquitinylée de FANCD2 (FANCD2-Ub) sur la chromatine est encore méconnu, mais on peut imaginer qu'elle s'y fixe via un partenaire contenant un motif UBD, ou bien que sa mono-ubiquitinylation change sa conformation générale, lui conférant ainsi de l'affinité pour la chromatine.

Sur la chromatine en cours de réplication, FANCD2-Ub co-localise au niveau des foyers contenant BRCA1 et 2, PCNA, Rad51 et NBS1 (Garcia-Higuera et al., 2001; Hussain et al., 2004; Nakanishi et al., 2002; Taniguchi et al., 2002; Wang et al., 2004). Ces foyers sont supposés représenter les sites de réparation des fourches de réplication s'étant bloquées ou effondrées (cf. partie D), évoquant un rôle de FANCD2-Ub et plus généralement de la voie FA dans la réponse au blocage des fourches de réplication intervenant spontanément ou suite à un stress génotoxique. Dans ce processus, la mono-ubiquitinylation de FANCD2 est centrale car c'est elle qui permet le chargement de FANCD2 sur la chromatine. L'identification de l'enzyme E3 intervenant et la régulation du système sont donc incontournables pour comprendre le fonctionnement de la voie FA.

Le dimère BRCA1-BARD1 a été évoqué comme E3 ligase de FANCD2, car il est capable de la mono-ubiquitinyler *in vitro* (Vandenberg et al., 2003). Cependant, la suppression de BRCA1 par interférence d'ARN ou la mutation de son domaine RING Finger n'affecte pas la mono-ubiquitinylation de FANCD2 *in vivo* (Garcia-Higuera et al., 2001; Vandenberg et al., 2003). Par contre, il semble que BRCA1 est requise pour la co-localisation de FANCD2-Ub au niveau des foyers Rad51 (Garcia-Higuera et al., 2001; Vandenberg et al., 2003). Ainsi, malgré sa fonction évidente dans la voie FA, BRCA1 n'est pas la E3 ligase responsable de l'ubiquitinylation de FANCD2.

2. Complexe FA E3 ligase

Huit des douze protéines de la voie FA forment un complexe qui contiendrait l'activité E3 ligase responsable de la mono-ubiquitinylation de FANCD2. Ce complexe est formé des protéines FANCA, B, C, E, F, G, L et M (de Winter et al., 2000; Meetei et al., 2003; Meetei et al., 2005; Pace et al., 2002; Taniguchi and D'Andrea, 2002). De nombreuses expériences de co-immunoprécipitation et de double hybride ont été réalisées pour préciser les interactions exactes entre les différentes sous unités, que je ne détaillerai pas ici (Figure 21). Il faut retenir que FANCE est fondamentale pour l'assemblage correct du complexe (Pace et al., 2002; Taniguchi and D'Andrea, 2002) et que toutes les sous unités sont requises pour l'activation de la voie FA via la mono-ubiquitinylation de FANCD2 en absence ou en

présence d'agents génotoxiques (Garcia-Higuera et al., 2001; Gregory et al., 2003). C'est pourquoi l'absence d'une seule de ces sous unités entraîne une hypersensibilité aux agents pontant (Patel et al., 1998; Xu et al., 1999; Yu et al., 2000). On pense que FANCL constitue la sous unité catalytique du complexe, car elle est pourvue d'un domaine PHD dont la structure est proche du domaine RING Finger, et montre des homologies avec d'autres E3 ligases (Meetei et al., 2003). Cependant, quelle est l'utilité pour la cellule de disposer d'un complexe de huit protéines pour assurer spécifiquement la mono-ubiquitylation de FANCD2 étant donné le nombre de E3 ligases dont elle dispose par ailleurs ? Nous verrons plus loin que le complexe FA E3 ligase possède d'autres fonctions qui assurent le bon timing d'ubiquitylation de FANCD2.

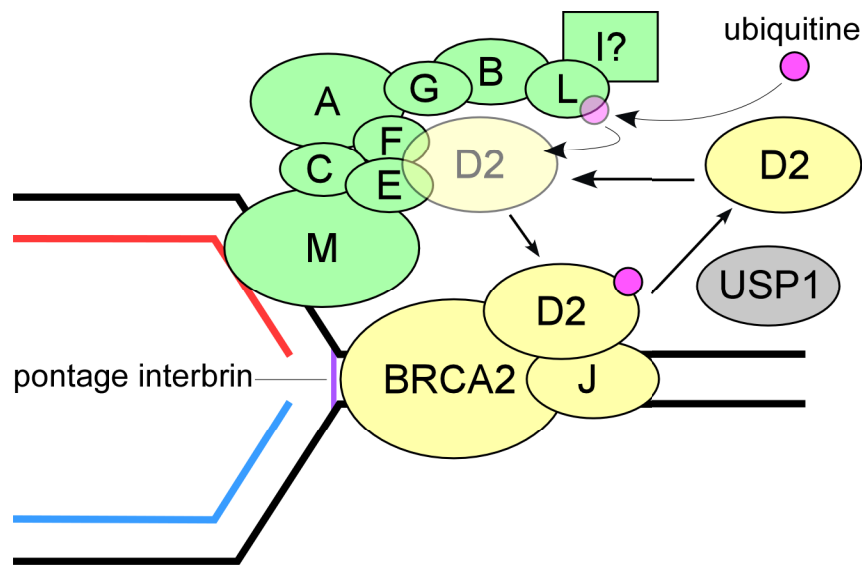


Figure 21. Composants de la voie Fanconi Anemia. Les protéines FANCA, B, C, E, F, G, L et M forment le complexe FA E3 ligase (en vert) responsable de la mono-ubiquitylation de FANCD2. FANCM permettrait au complexe de se déplacer sur l'ADN en même temps que la fourche, tandis que FANCL constituerait la sous unité responsable de l'activité E3 ligase. FANCI pourrait être associée au complexe E3 ligase et constituer l'enzyme E2 du système. L'activité E3 ligase du complexe est stimulée lorsque la fourche est bloquée suite à la rencontre d'un pontage inter-brin. La kinase ATR pourrait être responsable de cette activation, mais cela reste à démontrer. Une fois ubiquitylée, FANCD2 se fixe sur la chromatine, au niveau de la fourche, où sont déjà présentes BRCA2 (FANCD1) et FANCI. BRCA2 permettrait la stabilisation de la fourche le temps de la réparation, après laquelle FANCD2, dés-ubiquitylée par USP1, quitte la chromatine.

3. FANCI, E2 du système ?

FANCI est le seul gène de la voie FA identifié qui n'a pas encore été cloné, ce qui pour l'instant limite quelque peu son étude. On sait toutefois que son absence n'affecte pas l'assemblage du complexe FA-E3, mais inhibe la mono-ubiquitinylation de FANCD2 (Levitus et al., 2004). L'hypothèse de FANCI fonctionnant comme l'enzyme E2 lors de l'ubiquitinylation de FANCD2 est donc plausible. Dans le cas contraire, FANCI jouerait un rôle accessoire pour cette modification. Dans tous les cas, FANCI est soit indépendante du complexe FA-E3, soit en périphérie du complexe, et non fondamentale pour son assemblage (Figure 21). Le clonage du gène aidera sans doute à élucider sa fonction exacte. Il sera notamment important de vérifier si FANCI est capable d'interagir avec le domaine PHD de FANCL pour être guidée à FANCD2 via FANCL et le complexe FA E3.

4. FANCD1 code pour la protéine BRCA2

La mutation de BRCA2 a été récemment identifiée comme responsable des déficiences des cellules FA-D1, car BRCA2 peut compléter leur phénotype (Howlett et al., 2002). Les cellules FA-D1, en plus des autres aspects phénotypiques classiques d'une déficience de la voie FA, montrent des cassures spontanées des chromosomes et des chromosomes quadri-radiaux (Hirsch et al., 2004). Ces aberrations interviennent suite à des déficiences de la recombinaison homologue.

La mono-ubiquitinylation de FANCD2 est normale dans les cellules FA-D1, indiquant que FANCD1/BRCA2 intervient en aval de FANCD2-Ub (Siddique et al., 2001). Apparemment, FANCD2-Ub permet le recrutement de BRCA2 et la formation d'un complexe FANCD2-Ub-BRCA2 sur la chromatine (Wang et al., 2004). Bien que ce complexe se forme tant au niveau des cassures double brin induites par une irradiation qu'au niveau des fourches de réplication bloquées (Lomonosov et al., 2003; Wang et al., 2004), il semble uniquement essentiel pour la réparation des pontages aux fourches. En effet, BRCA2 aurait une fonction de stabilisation des fourches bloquées pendant qu'elles sont en cours de réparation par la voie FA (Lomonosov et al., 2003). Si l'on observe les échanges entre chromatides sœurs (induits par les réactions de recombinaison aux fourches de réplication), on constate qu'ils sont inchangés en phase S dans les cellules déficientes pour BRCA2. Par contre, l'augmentation des échanges visible dans les cellules sauvages après un pontage de l'ADN (augmentation de la réparation)

ne l'est pas dans les cellules mutées pour BRCA2 (Kraakman-van der Zwet et al., 2002; Wilson et al., 2001; Yamamoto et al., 2003). Les échanges sont inexistant, pontage ou pas, dans les cellules déficientes pour Rad51 (Kraakman-van der Zwet et al., 2002). Cela montre que BRCA2 est nécessaire à la stabilité des fourches bloquées par des pontages inter-brins pour les réparer par recombinaison homologue, mais son mode d'action précis n'est pas encore connu.

5. FANCI

Trois groupes différents ont récemment montré que les patients appartenant au groupe de complémentation FANCI sont atteints de mutations dans le gène BRIP1, aussi connu sous le nom de BACH1 (Levitus et al., 2005; Levrin et al., 2005; Litman et al., 2005). La protéine BRIP1/BACH1 (BRCA1 Interacting Protein C-Terminal Helicase BRIP1) avait été identifiée en 2001 grâce à son interaction avec un domaine BRCT de BRCA1 (Cantor et al., 2001). Elle semble avoir la fonction de suppresseur de tumeur via son activité hélicase (Cantor et al., 2004), mais sa fonction exacte est inconnue.

Les cellules FA-J montrent, comme les autres cellules FA, une hypersensibilité aux agents pontant de l'ADN (Bridge et al., 2005; Litman et al., 2005). Par ailleurs, des siRNA dirigés contre BRIP1 dans des cellules humaines (Litman et al., 2005) ou une disruption du gène BRIP1 dans des cellules DT40 de poulet (Bridge et al., 2005) entraînent un phénotype de type FA. Levitus et al. ont montré qu'*in vivo*, huit mutations différentes du gène BRIP1 touchent son domaine hélicase, soulignant son importance dans la réparation des pontages de l'ADN. BRIP1 appartient à la famille des hélicases RecQ, comme BLM, et possède *in vitro* une activité hélicase 5'-3' (Gupta et al., 2005; Karow et al., 1997). Sa fonction dans la voie FA n'est pas encore bien définie, et nous verrons plus loin les modèles existant à son sujet. Elle semble intervenir en aval de FANCD2 car l'assemblage du complexe FA-E3 et la mono-ubiquitinylation de FANCD2 sont normaux dans les cellules FA-J.

IV. Activation de la voie FA

1. Rôle d'ATR

Il semble que plusieurs protéines de la voie FA sont la cible d'ATR suite à un blocage des fourches de réplication. Tout d'abord, FANCD2 est phosphorylée par ATR suite à un blocage des fourches après un traitement des cellules par un agent pontant ou une

irradiation UV (Pichierri and Rosselli, 2004; Shiloh, 2003). La fonction de cette phosphorylation reste encore inconnue, mais elle intervient en aval de la mono-ubiquitinylation de FANCD2 car elle n'est pas requise pour la formation des foyers de FANCD2-Ub (Pichierri and Rosselli, 2004). Néanmoins la présence d'ATR, qui est capable de répondre à des blocages des fourches par des pontages (Zou and Elledge, 2003), est nécessaire pour la mono-ubiquitinylation de FANCD2 car des siRNA dirigés contre ATR provoquent une nette diminution du niveau de FANCD2-Ub dans la cellule et une hypersensibilité aux agents pontant (Andreassen et al., 2004). Si ce n'est pas par sa phosphorylation de FANCD2, comment intervient l'activité d'ATR dans la voie FA ? Sachant que la phosphorylation de FANCD2 par ATR n'est pas nécessaire à sa mono-ubiquitinylation, on peut d'ores et déjà exclure un changement de conformation de FANCD2 via une phosphorylation par ATR afin d'en faire un meilleur substrat du complexe FA-E3. Restent alors deux niveaux potentiels d'activité pour ATR : l'activation du complexe FA-E3 via sa phosphorylation, ou l'inactivation de l'enzyme de dés-ubiquitinylation de FANCD2, USP1. Une piste intéressante concernant la cible d'ATR a été ouverte en 2005 avec l'identification de FANCM, un des composants du complexe FA-E3.

2. Rôle de FANCM

FANCM a été identifiée comme composant du complexe FA-E3 grâce à sa co-immunoprécipitation avec FANCD2 et F (Meetei et al., 2005). Les auteurs ont montré qu'elle est indispensable pour la mono-ubiquitinylation de FANCD2, comme les autres composants du complexe FA-E3.

FANCM est une protéine de 250 kDa chez l'homme, et correspond à l'orthologue de la protéine Hef présente chez les archaebactéries. Hef (Helicase associated Endonuclease for Forked structured DNA) a la propriété de résoudre par clivage les fourches de réplication bloquées en cassures double brin (Komori et al., 2002). Hef est présente aussi chez le poulet, et son ablation dans la lignée de cellules DT40 provoque une instabilité chromosomique et une hypersensibilité à la mitomycine C (Mosedale et al., 2005), caractéristiques du phénotype FA. Chez l'homme, FANCM ne semble pas détenir d'activité endonucléase car le domaine qui en est responsable chez les archaebactéries est dégénéré. Cependant, FANCM montre *in vitro* de l'affinité pour l'ADN simple brin et les structures d'ADN en fourche. De plus, elle possède une activité ATPase ADN-dépendante et une activité ADN translocase (Meetei et al., 2005). Cette activité translocase lui permet de séparer d'une double hélice d'ADN un troisième brin d'ADN apparié par des liaisons Hoogsteen à un des deux brins de la double

hélice, formant ainsi une triple hélice. Cette activité translocase de FANCM suggère qu'elle est capable de se déplacer sur une double hélice d'ADN, et pourrait constituer un lien entre la chromatine et le complexe FA-E3. Ce complexe voyagerait ainsi sur la chromatine via FANCM avec la fourche de réplication, et la rencontre d'un pontage inter-brin par FANCM provoquerait l'activation du complexe FA-E3 et la mono-ubiquitinylation de FANCD2. Cette hypothèse a été émise par Meetei et al. car FANCM est hyperphosphorylée en réponse à un blocage des fourches de réplication. De plus, FANCM contient de nombreux sites consensus de phosphorylation par ATR, ce qui expliquerait, si la phosphorylation de FANCM par ATR était démontrée, la fonction de l'activité d'ATR dans l'activation de la voie FA.

Le rôle potentiel de FANCM dans la détection des pontages et l'activation de la voie FA est intéressant, mais même s'il venait à être confirmé, il faudrait trouver la façon dont le signal se propage de FANCM au reste du complexe FA-E3, et plus particulièrement à FANCL, responsable de l'activité catalytique du complexe.

V. Fonctions de la voie FA

1. Activation des point de contrôles de phase S

Les fonctions de la voie FA dépendent essentiellement de FANCD2. Outre son rôle dans la réparation des fourches que nous allons détailler ci-dessous, FANCD2 a été impliquée dans les deux point de contrôles de la phase S. En effet, elle est phosphorylée par ATM sur la sérine222 suite à l'apparition de cassures double brin après une irradiation (Taniguchi et al., 2002). Cette phosphorylation dépend de NBS1, est nécessaire pour l'arrêt des cellules en phase S (D'Andrea and Grompe, 2003; Nakanishi et al., 2002; Pichierri and Rosselli, 2004; Taniguchi et al., 2002), et participe à l'amplification du signal ATM, mais sans impliquer CHK2 (Pichierri and Rosselli, 2004). De plus, elle est indépendante de la mono-ubiquitinylation de FANCD2 et donc du complexe FA-E3 (Nakanishi et al., 2002). C'est pourquoi parmi les différents types de cellules FA, seules les cellules FA-D2 ou FA-D1 (BRCA2) présentent un phénotype RDS (« Radioresistant DNA synthesis ») après une irradiation (Taniguchi et al., 2002). Ce phénotype est caractérisé par une réplication ininterrompue, quantifiée par une incorporation de thymidine tritiée dans l'ADN, en présence de cassures double brin induites par une irradiation des cellules. En réponse à un blocage des fourches de réplication, l'activation du point de contrôle de réplication nécessite FANCD2 et le complexe FA-E3 (Centurion et al., 2000; Pichierri and Rosselli, 2004; Sala-Trepat et al.,

2000). Nous avons vu que la mono-ubiquitinylation de FANCD2 dépend de la présence d'ATR, et qu'ATR est capable de phosphoryler FANCD2, apparemment en aval de sa mono-ubiquitinylation. Toutefois, la fonction exacte de la voie FA dans l'activation du point de contrôle de réplication demeure inconnue.

Les deux fonctions de FANCD2 dans l'activation des point de contrôles de phase S sont dissociables expérimentalement (Figure 22): la protéine mutée pour la lysine 561 sera toujours capable de participer à l'activation du point de contrôle intra-S, tandis que la mutation de la sérine 222 n'empêchera pas sa participation à la réparation des fourches, mais causera un phénotype RDS (Wang et al., 2004).

2. Réparation des fourches de réplication

a) Complexité de réparation des pontages inter-brins

Les pontages inter-brins ne peuvent être franchis comme d'autres lésions et doivent être excisés avant de relancer les fourches de réplication. Cette excision provoque l'apparition de cassures double brin au niveau des fourches (Dronkert and Kanaar, 2001; Rothfuss and Grompe, 2004), qui doivent être réparées par la recombinaison homologue. La voie FA semble coordonner tous les mécanismes moléculaires assurant la prise en charge des pontages inter-brins. Son absence est caractérisée par la persistance des cassures double brin générées aux fourches par l'excision des pontages (Rothfuss and Grompe, 2004), montrant l'incapacité des cellules FA à enclencher leur réparation par recombinaison homologue.

b) Liens entre voie FA et recombinaison homologue

Premièrement, FANCD2-Ub co-localise avec la sous unité Nbs1 du complexe MRN qui est capable de digérer les cassures double brin de l'ADN précédant leur réparation par la recombinaison (Kobayashi et al., 2004; Nakanishi et al., 2002). Une défaillance dans la voie FA entraîne une incapacité du complexe MRN à se former au niveau des cassures (Pichierri and Rosselli, 2004). De plus, des composants du complexe FA-E3 s'associent avec BLM et la topoisomérase III (Meetei et al., 2003), et FANCD2-Ub co-localise avec BLM après un pontage de l'ADN (Pichierri and Rosselli, 2004).

Deuxièmement, la mono-ubiquitinylation de FANCD2 est requise pour la relocalisation de BRCA2 et Rad51 au niveau des fourches en réparation (Hussain et al., 2004; Wang et al., 2004). Les cellules FA, incapables d'assurer la mono-ubiquitinylation de FANCD2, sont incapables de réparer les cassures induites par l'excision des pontages, alors qu'elles réparent parfaitement les cassures induites par une irradiation (Donahue et al., 2003; Nakanishi et al.,

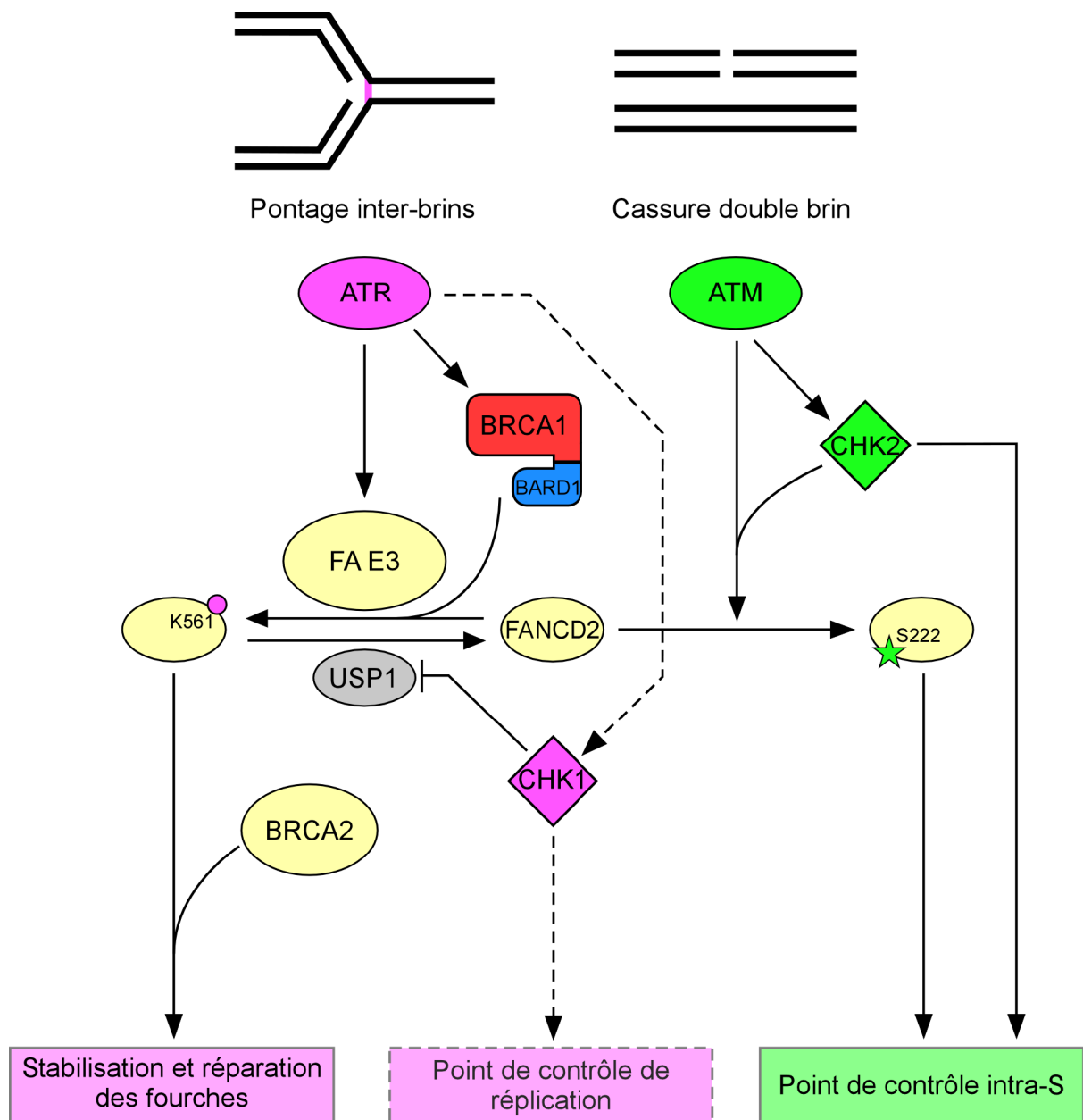


Figure 22. FANCD2 joue un rôle central dans les réponses aux stress génotoxiques initiées par la voie FA. Lors de la phase S, la voie FA est capable de répondre à différents types de stress génotoxiques: blocage des fourches par des pontages interbrins (en rose) ou cassures double brin (en vert). L'apparition d'une cassure double brin active les kinases ATM et CHK2, permettant la phosphorylation de FANCD2 sur le résidu Ser 222. CHK2 et FANCD2 phosphorylée participent à l'activation du point de contrôle intra-S, indépendamment des fourches de réplication. Lorsque les fourches sont bloquées par des pontages interbrins, ATR et CHK1 sont modérément activées, permettant une activation modeste du point de contrôle de réplication. Cependant, la stabilisation des fourches est surtout assurée par la voie FA, de même que leur réparation. Le complexe FA E3 ligase catalyse la mono-ubiquitinylation de FANCD2 sur le résidu K561. Ce processus nécessite la présence du dimère BRCA1-BARD1, mais on ne connaît pas sa fonction exacte. Les complexes FA E3 ligase et BRCA1-BARD1 sont susceptibles d'être activés par ATR, tandis que CHK1 inhiberait USP1, permettant ainsi l'accumulation de la forme mono-ubiquitinylée de FANCD2. Celle-ci et BRCA2 participent à la stabilisation et la réparation des fourches de réplication.

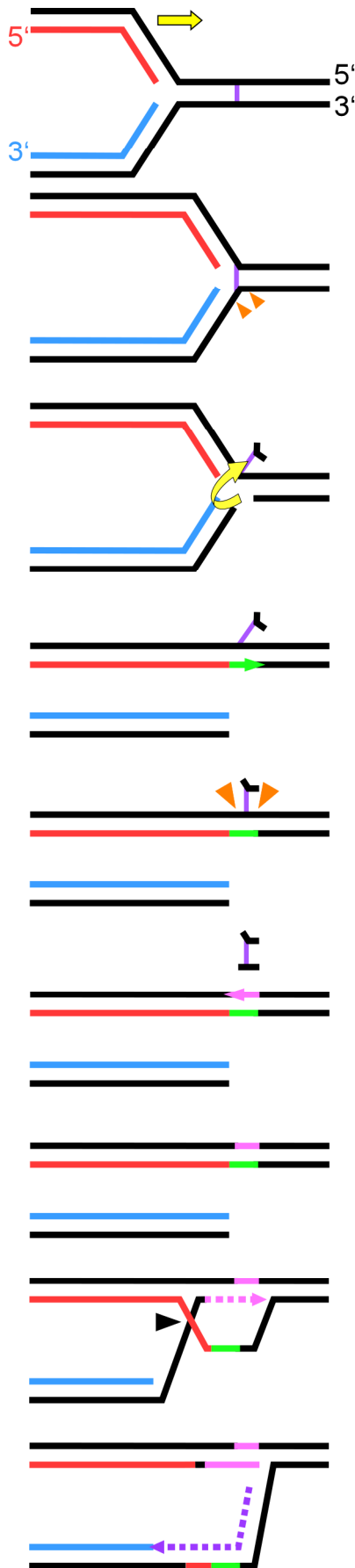
2005; Niedzwiedz et al., 2004; Yamamoto et al., 2003). L'activité correcte de Rad51 pourrait dépendre de la stabilisation de la fourche par BRCA2 évoquée par Lomonosov et al. (2003), et dans ce cas, le recrutement de BRCA2 par FANCD2-Ub serait crucial.

Si l'on ajoute à ces observations le rôle éventuel de FANCM dans la détection des pontages, on peut avancer l'hypothèse d'un rôle de la voie FA dans la détection des pontages bloquant les fourches de réplication. Cette détection permettrait d'engager leur excision, mais aussi d'assurer les mécanismes moléculaires en aval, comme la recombinaison de la fourche.

c) Liens entre voie FA et synthèse de translésion

Des observations intéressantes ont été effectuées dans la lignée DT40 de poulet, qui établissent un lien entre la voie FA et la synthèse de translésion d'ADN. En effet, des cellules DT40 mutées pour la polymérase de translésion Rev1 sont, comme les cellules FA, hypersensibles aux pontages de l'ADN (Ross et al., 2005). De plus, la mutation de Rev1 est épistatique avec celle de FANCC si l'on considère la sensibilité des cellules DT40 aux agents pontant, ce qui implique les deux protéines dans la même voie de réponse (Niedzwiedz et al., 2004). Si l'on considère en plus la co-localisation de Rev1 et FANCD2-Ub aux fourches bloquées observée par Niedzwiedz et al., on peut aisément imaginer que FANCD2-Ub constitue un site d'ancrage des polymérase TLS, de la même manière que PCNA-Ub lors de lésions moins « lourdes » (cf. partie C). Ce recrutement permettrait au réplisome de franchir la base comportant le pontage partiellement excisé. Cependant, les voies FA et Rad6-Rad18 semblent indépendantes dans le recrutement des polymérase TLS : des disruptions simultanées de KO FANCC et RAD18 provoquent une sensibilité à la cisplatine supérieure à une seule d'entre elles (Hirano et al., 2005).

Un modèle d'action de la voie FA pour réparer les pontages inter-brins est représenté en Figure 23. La coordination de tous ces processus moléculaires par la voie FA en réponse aux pontages explique que les cellules FA soient hypersensibles à ce type de dommage particulier. En effet, tout autre type de dommage peut être réparé par une autre voie moléculaire, et seuls les pontages inter-brins nécessitent la coordination de plusieurs procédés. C'est pourquoi, dans les cellules DT40, la recombinaison homologue, la voie TLS et la voie FA sont toutes les trois requises pour la réparation des pontages (Niedzwiedz et al., 2004).



Progression de la fourche jusqu'au pontage inter-brins.

Blocage de la fourche, pontage détecté par le complexe FA E3 ligase. Stabilisation de la fourche par BRCA2. Première digestion du pontage.

Pontage repoussé vers l'extérieur de la double hélice.

Recrutement des polymérase de translésion, synthèse en face du pontage.

Deuxième digestion du pontage qui est éliminé.

Comblement du trou par une ADN polymérase.

Rétablissement de la fourche par recombinaison homologue.

Figure 23. Modèle de réparation d'une fourche bloquée par un pontage inter-brin.

VI. Inactivation de la voie FA

FANCD2 est mono-ubiquitinylée en phase S et désubiquitinylée en sortie de phase S ou une fois la réparation des pontages effectuée (Garcia-Higuera et al., 2001). Ce profil implique que l'ubiquitinylation de FANCD2 est régulée, et avec elle toute la voie FA. C'est logique si on considère le potentiel mutagène de la voie FA du à son recrutement des polymérase TLS. Ce cas de figure est d'ailleurs similaire à celui de PCNA, qui doit être désubiquitinylée pour éviter le recrutement de ces mêmes polymérase une fois la lésion franchie par la fourche de réplication. Ce n'est donc peut-être pas un hasard si l'enzyme qui désubiquitinye PCNA et FANCD2 est la même. En effet, USP1 a été identifiée comme responsable de l'inactivation de la voie FA par Nijman et al. (2005). Ils ont utilisé une librairie de rétrovirus comportant des shRNA inhibant l'expression d'enzymes de désubiquitinylation spécifiques et ont montré que l'inhibition de USP1 cause une augmentation du niveau de FANCD2-Ub dans la cellule, et une meilleure réponse aux pontages induits par la mitomycine C (moins de cassures chromosomiques après inhibition de USP1). USP1 fonctionne donc comme un régulateur négatif de la voie FA. Lors d'un fractionnement biochimique des cellules, USP1 est présente dans la fraction chromatiniene avec FANCD2-Ub, et son activité de désubiquitinylation doit s'exercer dans ce compartiment. Il est vraisemblable que l'activité de USP1 est réprimée en présence de dommages et en phase S, mais le mécanisme de l'inhibition reste à élucider. Nous avons vu précédemment qu'USP1 s'autoclive en réponse à une irradiation UV, mais il faut encore démontrer si ce mécanisme est conservé après un pontage de l'ADN. Quelle qu'elle soit, l'inhibition d'USP1 doit être levée en fin de phase S ou après réparation des dommages, pour permettre au niveau de FANCD2-Ub de redescendre.

VII. Principaux points à approfondir

La voie FA constitue pour la cellule le seul moyen de faire face aux pontages inter-brins de l'ADN. Lors de la réponse à ces lésions, la mono-ubiquitinylation de FANCD2 est centrale. Cependant, nous ignorons encore beaucoup à son sujet. Par exemple, quelle est l'enzyme E2 qui participe ? FANCL est-elle réellement la E3 ligase impliquée ? Comment est régulée USP1 en présence ou en absence de dommages ?

Au-delà de FANCD2, il faudra confirmer le rôle de FANCM dans la détection des pontages et l'association du complexe FA-E3 avec la fourche de réplication. Il faudra aussi déterminer la nature du rôle d'ATR dans l'activation de la voie FA, et pourquoi pas chercher un effet direct ou indirect d'ATR, indispensable à la mono-ubiquitylation de FANCD2, sur USP1... Dans cette optique, l'absence d'ATR provoquerait une sur-activation d'USP1, empêchant l'accumulation des formes ubiquitylées de FANCD2. Enfin, il faudra décortiquer les différentes fonctions possibles de FANCI/BACH1, qui semble indispensable pour la survie des cellules humaines à des traitements par des agents pontant (Litman et al., 2005), alors qu'elle n'est pas nécessaire pour la recombinaison dans les cellules de poulet DT40 (Bridge et al., 2005).

Chapitre 2

Résultats des travaux de thèse :

**Régulations de MCM7, facteur de
réplication de l'ADN**

A - THEMATIQUE DE RECHERCHE

Nous venons d'illustrer l'importance des fourches de réplication dans la réplication et la maintenance de l'ADN. Au sein de la fourche, le complexe MCM joue un rôle central : il permet via son activité ADN hélicase d'ouvrir la double hélice d'ADN afin de la dupliquer, et il participe à l'activation du point de contrôle de réplication en favorisant l'accumulation d'ADN simple brin au niveau de la fourche bloquée. La sous unité MCM7 est directement impliquée dans ces activités : elle participe à l'activité catalytique du complexe et interagit avec des médiateurs de l'activation du point de contrôle de réplication. Mes travaux de thèse ont porté sur différents aspects de la régulation de MCM7 lors du métabolisme de l'ADN.

La thématique initiale de notre laboratoire était l'étude de l'oncoprotéine Tax du virus HTLV-1. Or, la recherche de ses partenaires, afin de mieux comprendre son effet transformant, a révélé son interaction avec MCM7 et avec une proto-oncoprotéine, Int6. Par la suite, une interaction entre Int6 et MCM7 a également été suggérée par des expériences de double hybride dans la levure. MCM7, Int6 et Tax... Quelle pouvait être la signification de cette relation triangulaire ? Au départ, j'ai essayé de déterminer si Int6 et Tax pouvaient avoir des effets (éventuellement antagonistes) sur la réplication de l'ADN via l'activité hélicase du complexe MCM. Les données concernant plus particulièrement Tax seront exposées.

Entretemps, le rôle de MCM7 dans le maintien de l'intégrité génomique a été identifié, et notre équipe a montré une interaction entre Int6 et deux complexes protéiques en rapport avec l'ubiquitinylation des protéines : le protéasome et avec le signalosome. Le premier dégrade les protéines ubiquitinylées, tandis que le second régule l'activité des E3 ligases multimériques. Sachant qu'une étude menée par Kuhne et Banks (1998) avait montré une poly-ubiquitinylation de MCM7, nous avons décidé d'étudier l'effet éventuel d'Int6 sur la dégradation de MCM7 et sur l'intégrité du génome. J'ai montré que MCM7 est poly-ubiquitinylée pour être dégradée pendant la phase S, et qu'Int6 intervient en aval de cette modification pour protéger MCM7 de la dégradation. L'absence d'Int6 cause une déstabilisation de MCM7 et des dommages à l'ADN.

J'ai également observé une ubiquitinylation de MCM7, non dégradative, en réponse à des cassures double brin de l'ADN causées par un irradiation des cellules. Nous avons vu

dans le premier chapitre le rôle joué par l'activité E3 ligase de BRCA1, dont très peu de substrats sont connus *in vivo*, dans la réponse cellulaire à ces dommages. J'ai donc essayé de caractériser les relations entre ces deux protéines. Les résultats indiquent que MCM7 est un substrat potentiel de l'activité E3 ligase de BRCA1. En effet, cette dernière interagit avec MCM7 et stimule son ubiquitinylation *in vivo*. L'implication de MCM7 dans la réponse cellulaire aux dommages de l'ADN pourrait donc passer par son ubiquitinylation dépendant de BRCA1.

B - LA PROTO-ONCOPROTEINE INT6 REGULE LA STABILITE DE MCM7

NB : dans cette partie, les renvois précédés d'un « p. » font références aux figures de la publication située dans le paragraphe III.

I. Présentation de la protéine Int6

La thématique initiale de notre laboratoire était l'étude du virus HTLV-1 et de sa protéine transformante, Tax (nous y reviendrons plus tard). Dans le cadre de cette étude, des partenaires cellulaires de Tax ont été identifiés, dont la protéine Int6.

1. Int6 est une proto-oncoprotéine

Le gène *int6* (« Integration site 6 ») est le sixième membre d'une famille de gènes dont l'expression est dérégulée par l'intégration du virus MMTV (« Mouse Mammary Tumor Virus ») provoquant des tumeurs mammaires chez la souris (Marchetti et al., 1995). Ce gène a été très conservé durant l'évolution, suggérant une fonction essentielle pour la protéine Int6 (48kDa). Int6 est ubiquitaire et possède une localisation aussi bien cytoplasmique que nucléaire car elle est pourvue à la fois d'un NES (« Nuclear Export Sequence ») et de deux NLS (« Nuclear Localisation Signal »), ce qui est caractéristique des protéines navettes (Figure 24). De plus, Int6 contient un domaine particulier, nommé PCI, retrouvé dans plusieurs sous unités du protéasome, du signalosome COP9 et du facteur d'initiation de la traduction eIF3. La zone d'interaction avec MCM7, déterminée en double hybride, est indiquée par une barre noire.

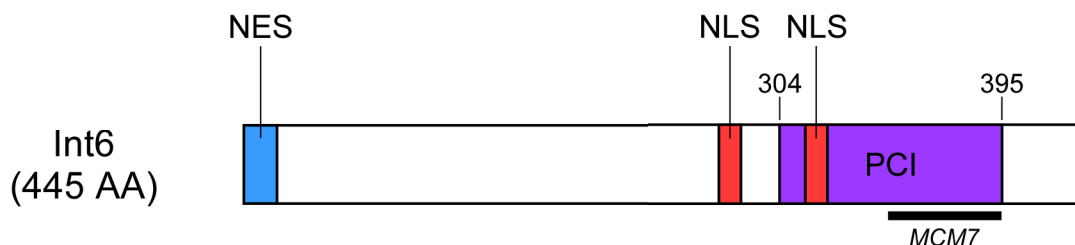


Figure 24. Structure d'Int6. Int6 est une protéine nucléo-cytoplasmique de 445 acides aminés. Elle possède à la fois une séquence d'exclusion nucléaire (NES) contenu dans les 20 acides aminés N-terminaux et deux signaux de localisation nucléaire (NLS), ce qui en fait une protéine navette. Son domaine PCI (Proteasome, COP9 signalosome, translation Initiation factor 3), compris entre les acides aminés 304 et 395, est partagé par différentes sous unités du protéasome, du signalosome COP9 et du facteur d'initiation de la traduction eIF3. La zone d'interaction avec MCM7, déterminée en double hybride, est indiquée par une barre noire.

L'effet oncogénique de la mutation d'int6 est suggéré par plusieurs observations. Tout d'abord, la surexpression d'une forme d'Int6 tronquée de sa moitié C-terminale induit la transformation de lignées cellulaires murines et humaines (Mayeur and Hershey, 2002; Rasmussen et al., 2001). De plus, une diminution du niveau de l'ARNm int6 est observée dans 27% des carcinomes pulmonaires non à petites cellules ; cet événement constitue un indice de mauvais pronostic (Buttitta et al., 2005).

2. Effets de la déplétion d'Int6 dans une lignée cellulaire humaine

Des travaux menés dans notre laboratoire avaient déjà montré qu'une perte d'Int6 provoque des altérations de la mitose en induisant des défauts de ségrégation des chromosomes, aboutissant à l'apparition de cellules plurinucléées (Morris and Jalinet, 2005). Nous avons effectué des analyses supplémentaires du déroulement de la mitose dans les cellules appauvries en Int6, et avons constaté que celle-ci est considérablement ralentie, aboutissant à des événements de catastrophe mitotique (Figures p.1 et p.S1). La catastrophe mitotique est une forme d'apoptose particulière activée en réponse à des dommages à l'ADN et/ou des défauts réplcatifs. Ces dommages sont d'ailleurs visibles dans des cellules appauvries en Int6 par le niveau élevé de la forme phosphorylée de l'histone H2AX (Figure p.1B).

Nous avons cherché à expliquer l'origine des dommages à l'ADN observés en absence d'Int6, en nous intéressant tout particulièrement à la réplication. Aucun rôle d'Int6 dans la réplication n'a été évoqué jusqu'à présent, mais une recherche de ses partenaires cellulaires par des expériences de double hybride nous avait indiqué qu'elle est capable d'interagir avec MCM7 qui est une des sous unités du complexe MCM, présumé comme l'hélicase réplcative (Figure p.S2). Cette interaction a été confirmée *in vivo* par des co-immunoprécipitations des protéines endogènes dans deux lignées cellulaires différentes (Figure p.2). Nous avons donc décidé d'étudier en détail l'interaction entre Int6 et MCM7, afin de vérifier si les dommages à l'ADN observés suite à la perte d'Int6 sont dus à des défauts réplcatifs.

II. Caractérisation de l'interaction entre Int6 et MCM7

1. Int6 interagit avec les formes poly-ubiquitinylées de MCM7

Nous nous sommes dans un premier intéressés à l'ubiquitylation de MCM7, car certaines observations indiquent un rôle d'Int6 dans la dégradation des protéines. Chez *S.*

pombe, l'homologue d'Int6 est nécessaire pour l'activité du protéasome en permettant l'import nucléaire de sa sous unité Rpn5 (Yen et al., 2003). Par ailleurs, notre laboratoire a montré qu'Int6 interagit avec des sous unités du protéasome et du signalosome, complexe protéique impliqué dans la régulation des E3 ligases multimériques (Hoareau Alves et al., 2002).

Nous avons constaté que MCM7 est poly-ubiquitinylée, ce qui n'est pas le cas pour MCM4 et 6, les deux autres sous unités du sous complexe MCM4,6,7 (Figure p.3A,B,C). De plus, le niveau des formes poly-ubiquitinylées de MCM7 augmente après un traitement au MG132, un inhibiteur du protéasome (Figure p.3A,B). Ces formes poly-ubiquitinylées de MCM7 sont principalement retrouvées sur la chromatine, où elles sont stabilisées après une surexpression d'Int6 (Figure p.3D). De plus, elles interagissent directement avec Int6 (Figures p.4, p.5B), et cette association augmente avec un traitement au MG132 (Figures p.4, p.S3A). Ces observations indiquent que i) MCM7 est poly-ubiquitinylée sur la chromatine, ii) la poly-ubiquitinylation de MCM7 est pro-dégradative, iii) Int6 protège ces formes de la dégradation. Nous avons donc étudié l'effet d'Int6 sur la stabilité de MCM7.

2. Int6 stabilise MCM7 pendant la phase S

Dans des cellules 293T asynchrones, la surexpression d'Int6 augmente la demi-vie de MCM7 (Figure p.5A), mais pas celle de MCM6 (Figure p.S4). Par ailleurs, la transfection de cellules HeLa par des siRNA dirigés contre Int6 induit une diminution du niveau de MCM7 (Figure p.5C), due essentiellement à une baisse de son niveau chromatinien (Figure p.5D). Souvenons-nous que c'est dans ce compartiment subcellulaire que les formes poly-ubiquitinylées de MCM7 sont majoritairement présentes. La chromatine est aussi le compartiment fonctionnel de MCM7, qui est indispensable à l'activité hélicase du complexe MCM.

Pour affiner ces observations, nous avons étudié la demi-vie de MCM7 au cours de la phase S dans des cellules HeLa appauvries en Int6 et synchronisées (Figure p.6A). La baisse d'Int6 entraîne une déstabilisation de MCM7 (Figures p.6B et p.8A), sans pour autant affecter la demi-vie de MCM6 (Figure p.S5). Ces observations indiquent un effet d'Int6 spécifique à MCM7. De plus, nous avons vérifié que la perte d'Int6 n'affectait ni la traduction, ni la répartition nucléo-cytoplasmique, ni l'engagement dans les polysomes, de l'ARNm *mcm7* (Figure p.S6). L'effet d'Int6 sur la stabilité de MCM7 semble donc reposer uniquement sur la régulation de sa dégradation

3. La perte d'Int6 entraîne des défauts de réplication

Les protéines MCM ont tendance à quitter la chromatine au fur et à mesure que la réplication progresse (Fujita et al., 1996). Or, la déstabilisation de MCM7 observée dans les cellules appauvries en Int6 entraîne précisément son départ prématuré de la chromatine au cours de la phase S (Figure p.6C,D). Cela suggère une fonction d'Int6 pour stabiliser les protéines MCM sur la chromatine en cours de réplication. Etant donné qu'Int6 semble protéger les formes poly-ubiquitinylées de MCM7 de la dégradation, et que ces formes sont principalement chromatinienne, nous nous sommes demandés si l'ubiquitinylation de MCM7, en promouvant sa dégradation, pouvait constituer le signal pour son départ de la chromatine au cours de la phase S. Nous avons donc étudié l'effet d'une inhibition du protéasome, dans des cellules synchronisées en phase S, sur la répartition nucléo-chromatinienne de MCM7. Nous avons observé qu'au cours de la phase S, un traitement au MG132 empêche le départ de MCM7 de la chromatine évoqué précédemment (Figure p.7), et provoque l'accumulation de ses formes poly-ubiquitinylées dans ce compartiment (non représenté). Cela suggère que l'ubiquitinylation et la dégradation de MCM7 sont nécessaires à son départ de la chromatine au fur et à mesure que la réplication progresse.

Etant donné les effets d'Int6 observés jusqu'à présent, nous avons pensé que cette protéine, en protégeant de la dégradation les formes poly-ubiquitinylées de MCM7, peut être responsable de la régulation du départ de MCM7 de la chromatine. Dans un tel contexte, la perte de la fonction d'Int6 entraînerait des défauts réplcatifs en provoquant un départ prématuré de MCM7 de la chromatine. Pour vérifier cette hypothèse, nous avons quantifié l'incorporation de thymidine tritiée dans des cellules appauvries en Int6. Elle s'est avérée diminuée (Figure p.9), alors que les cellules entrent en G2 tout à fait normalement, sans délai supplémentaire (Morris and Jalinot, 2005). Cette observation indique qu'en absence d'Int6, les cellules ne parviennent pas à répliquer complètement leur génome avant la fin de la phase S, lui infligeant ainsi des lésions. Nous avons étudié le niveau chromatinien de deux protéines, RPA et claspine, dont l'augmentation est caractéristique des dommages à l'ADN (cf introduction bibliographique). Effectivement, la perte d'Int6 provoque une augmentation de ce niveau, et ce pour les deux protéines (Figure p.10). Cela traduit la présence de dommages à l'ADN dans les cellules appauvries en Int6, qui sont sans doute à l'origine des événements de catastrophe mitotique observés dans ces cellules.

III. Publication n°1

Human Int6 interacts with MCM7 and regulates its stability during S phase of the cell cycle

Samuel Buchsbaum, Christelle Morris, Valérie Bochar and Pierre Jalinot

(en cours de révision à EMBO Journal)

The mouse *int6* gene is a frequent integration site of the Mouse Mammary Tumor Virus and Int6 silencing by RNA interference in HeLa cells causes mitotic defects. We report here that depletion of Int6 also triggers DNA damage and mitotic catastrophe. To gain insight into the molecular mechanisms underlying these effects, we investigated the functional significance of the interaction between Int6 and MCM7, which was observed in a two-hybrid screen performed with Int6 as bait. We found that proteasome inhibition augments this interaction and that Int6 overexpression stabilizes MCM7. Removal of MCM7 from chromatin as replication proceeds was accelerated in Int6-silenced cells and reduced MCM7 protein amounts were transiently observed, followed by a reincrease due to a stimulation of *mcm7* gene expression. Synchronized cells depleted for either Int6 or MCM7 display a reduction in thymidine incorporation and a reinforced association of RPA and claspin with chromatin. These data show that chromatin bound MCM7 is stabilized by Int6 during replication. Loss of this effect correlates with replication deficiency and DNA damage.

Human Int6 interacts with MCM7 and regulates its stability during S phase of the cell cycle

*Samuel Buchsbaum, *Christelle Morris, Valérie Bochard and Pierre Jalinot#

Laboratoire de Biologie Moléculaire de la Cellule
UMR5161 CNRS / ENS de Lyon
IFR 128 Biosciences Lyon Gerland
46 Allée d'Italie
69364 Lyon cedex 07
France

Running title: Int6 regulates MCM7 stability

* These authors contributed equally to this work

Corresponding author. LBMC – UMR5161. ENS de Lyon. 46 Allée d'Italie. 69364 Lyon cedex 07. France. Tel.: (33)472728563. Fax: (33)472728080. e. mail: pjalinot@ens-lyon.fr.

Character count: 59624

Abstract

The mouse *int6* gene is a frequent integration site of the Mouse Mammary Tumor Virus and Int6 silencing by RNA interference in HeLa cells causes mitotic defects. We report here that depletion of Int6 also triggers DNA damage and mitotic catastrophe. To gain insight into the molecular mechanisms underlying these effects, we investigated the functional significance of the interaction between Int6 and MCM7, which was observed in a two-hybrid screen performed with Int6 as bait. We found that proteasome inhibition augments this interaction and that Int6 overexpression stabilizes MCM7. Removal of MCM7 from chromatin as replication proceeds was accelerated in Int6-silenced cells and reduced MCM7 protein amounts were transiently observed, followed by a reincrease due to a stimulation of *mcm7* gene expression. Synchronized cells depleted for either Int6 or MCM7 display a reduction in thymidine incorporation and a reinforced association of RPA and claspin with chromatin. These data show that chromatin bound MCM7 is stabilized by Int6 during replication. Loss of this effect correlates with replication deficiency and DNA damage.

Keywords: Int6 / MCM7 / protein degradation / DNA replication / DNA damage

Introduction

The *int6* gene was first identified as a frequent integration site of the MMTV virus in preneoplastic and neoplastic mammary lesions (Marchetti et al., 1995). Viral insertion might lead to *int6* haploinsufficiency or to production of C-terminally-truncated proteins. Overexpression of such Int6-truncated forms was found to transform murine and human cell lines (Rasmussen et al., 2001; Mayeur and Hershey, 2002). Moreover, *int6* mRNA level is decreased in 27% of non-small cell lung carcinomas and this event represents a predictor of poor prognosis (Buttitta et al., 2005). However, molecular basis of cellular transformation resulting from Int6 alteration remains so far ill-defined. Int6 has been characterized as an eIF3 translation initiation factor subunit in rabbit (Asano et al., 1997), *Schizosaccharomyces pombe* (Akiyoshi et al., 2001; Bandyopadhyay et al., 2000; Crane et al., 2000) and *Arabidopsis Thaliana* (Burks et al., 2001; Yahalom et al., 2001), but evidence of its functional role in eIF3 is lacking. A study in fission yeast showed that disruption of the Int6 homolog (Yin6) triggers a reduction in polysome content (Akiyoshi et al., 2001) but this has not been confirmed by others (Zhou et al., 2005). Moreover, in contrast to other eIF3 subunits, suppression of Yin6 marginally affects overall translation efficiency (Bandyopadhyay et al., 2000; Zhou et al., 2005). Several other observations indicate a role of Int6 in protein degradation. Indeed Int6, which includes a protein domain shared by several subunits of the lid of the proteasome 19S regulatory particle, of the COP9 signalosome (CSN) and of eIF3, and thereafter named PCI, is known to interact with both the 26S proteasome and the CSN (Hoareau Alves et al., 2002). In *A. Thaliana*, Int6 is predominantly nuclear and associated with CSN in root cells, but cytoplasmic and associated with eIF3 in leaf cells (Yahalom et al., 2001). In fission yeast, Yin6 enables proteasome activity by promoting the nuclear import of its Rpn5 subunit, and Yin6 inactivation causes defective cyclin B and securin degradation, leading to mitotic

anomalies (Yen and Chang, 2000; Yen et al., 2003). In human cells, we showed that Int6 silencing also leads to mitosis alteration due to defects in spindle formation, chromosome segregation and cytokinesis (Morris and Jalinot, 2005).

In this manuscript it is additionally shown that Int6 depletion causes DNA damage and mitotic catastrophe. As a two-hybrid screen with Int6 as bait led to isolation of the MCM7 DNA replication licensing factor, a possible role of the disruption of the normal MCM7 functioning in generation of DNA damage was explored. MCM7 is a subunit of the MCM complex (MCM2-7) that plays a key role in DNA replication licensing. Replication origins are competent or “licensed” to initiate replication only once per cell cycle by recruiting during late mitosis and G1 the MCM complex. This recruitment depends on ORCs, Cdc6 and Cdt1 proteins (Cook et al., 2004; Gillespie et al., 2001; Yanagi et al., 2002). In the course of replication, MCMs dissociate from DNA and re-association can not occur before the next cell division. Besides its role in replication initiation, MCM7 is necessary for the helicase activity of the MCM complex. Indeed, the mammalian MCM4,6,7 sub-complex purified from cultured cells (Ishimi, 1997) or reconstituted with recombinant proteins (Lee and Hurwitz, 2001), exerts in vitro an helicase activity that requires the MCM7 ATPase motifs (You et al., 2002).

We show here that Int6 interacts with polyubiquitinated forms of MCM7 and that Int6 silencing destabilizes this replication factor during S phase. Conversely, Int6 overexpression stabilizes MCM7 and increases the amount of its polyubiquitinated forms on chromatin. From the data presented in this report, we propose that Int6 contributes to the replication process by protecting MCM7 from degradation during S phase. Impairment of this function would generate replication defects and DNA damage triggering mitotic catastrophe.

Results

Silencing of Int6 in HeLa cells entails mitotic catastrophe

We have previously shown that Int6 suppression causes various mitotic abnormalities (Morris and Jalinet, 2005). To understand better how Int6 depletion affects mitotic progression, video time-lapse experiments were performed and phase-contrast images were recorded. Mitosis of control siRNA-transfected cells, from onset of rounding to formation of two daughter cells, was completed in approximately 1 h (Figure 1A, panel 1). By contrast, mitotic cells silenced for Int6 never divided over a 3-h duration of recording (Figure 1A, panels 2 to 4). Instead, many cells remained blocked in mitosis and some of them suddenly developed multiple protrusions and get fragmented, clearly suggestive of cell death (arrowheads on panels 2 and 4). This occurred specifically during mitosis as evaluation of apoptosis in the whole cell population did not show any pro-apoptotic effect of Int6 silencing (Figure 1B). A 15-h observation period revealed that Int6-depleted cells could be arrested in mitosis for at least 11 h, after which they died (Figure 1A, arrowhead on panel 5). A quantitative assessment (n= 87) indicated that 77 % of Int6-silenced cells showed an abnormally long mitosis, which was never observed in control cells. This prolonged block in M-phase followed by cell death is characteristic of a case of apoptosis termed mitotic catastrophe (Castedo et al., 2004), viewed as a suicidal mechanism in response to DNA damage and/or DNA replication defects. It requires a functional spindle checkpoint that prevents the metaphase-anaphase transition until all chromosomes are attached and under spindle tension (Nitta et al., 2004). Activation of this checkpoint depends on recruitment at kinetochores of several proteins, including Mad2 and Bub1. As expected, Mad2 staining was completely lost at kinetochores of control metaphase cells (Figure S1A, images 1-3). By contrast, it persisted at some kinetochores of Int6-depleted cells with a metaphase-like appearance (Figure S1A, images 4-9). We also examined the staining of Bub1, a sensor of both attachment and tension of the spindle at kinetochores

(Skoufias et al., 2001). Again, higher levels of Bub1 were observed at kinetochores of Int6-silenced cells as compared to control cells (Figure S1B). From these data, we concluded that Int6 suppression triggers activation of the spindle checkpoint. Based on the above results, we hypothesized that mitotic cell death following Int6 suppression might be a consequence of DNA damage during interphase. We thus monitored the amount of phosphorylated histone H2AX (γ -H2AX), a specific marker of DNA damage. As compared to control cells, Int6-silenced cells showed higher levels of γ -H2AX, similarly to hydroxyurea treatment conditions (Figure 1C, upper panel).

These observations show that even if Int6-silenced cells contain DNA lesions, they do enter mitosis that ends in mitotic catastrophe. We further investigated the origin of DNA alteration following Int6 silencing in light of results obtained from a two-hybrid screen performed with Int6 as bait.

Int6 interacts with the MCM7 subunit of the MCM complex

A two-hybrid screen of a cDNA library from human lymphocytes (Durfee et al., 1993) with Int6 as bait led to isolation of clones corresponding to the C-terminal part of MCM7 (Figure 2A and Figure S2A). In vivo interaction of Int6 with MCM7 was tested by cotransfecting human 293T cells with vectors expressing MCM7 tagged at its N-terminus with the MYC epitope, and Int6 fused to the FLAG tag at its C-terminus in order to preserve its N-terminal NES (Guo and Sen, 2000). Reciprocal coimmunoprecipitation of the two proteins was observed using antibodies to both tags (Figure 2B, lane 8). We next confirmed that the interaction occurs with endogenous proteins. Extracts of Jurkat (Figure 2C, lanes 1-3) and HeLa cells (Figure 2C, lanes 4-6) were immunoprecipitated using preimmune and Int6 antisera. Immunoblot analysis revealed that MCM7, which appears as a doublet, was clearly coprecipitated with Int6 in both cell types, although slightly more efficiently in Jurkat cells (Figure 2C, compare lanes 2 and 5).

Mapping studies of the Int6-MCM7 interaction with the yeast two-hybrid system delimited the region of Int6 necessary for MCM7 binding between amino acids 351 and 395 (Figure S2B). This region corresponds to the C-terminal half of the PCI domain. Using the same assay, the minimal region of MCM7 able to bind Int6 was found to encompass amino acids 579 to 595 (Figure S2C). Experiments using a peptide corresponding to the domain mapped in MCM7 and Jurkat whole cell extract (Figure S2D) or purified recombinant Int6 (Figure S2E), confirmed the interaction between both proteins and showed that it is direct (Figure S2E).

MCM7 is modified by polyubiquitination

As Int6 has been functionally involved in protein degradation, we investigated the possibility that it acts on MCM7 stability. We first tested whether MCM7 can be polyubiquitinated. When endogenous MCM7 was immunoprecipitated and analyzed using an antibody recognizing polyubiquitinated proteins, a weak smear of bands above the position of unmodified MCM7 was observed and its intensity was reinforced by a proteasome inhibitor treatment (Figure 3A, compare lanes 2 and 4), strongly suggesting that endogenous MCM7 is polyubiquitinated and that these polyubiquitinated forms are processed by the proteasome. Polyubiquitination of endogenous MCM7 was also indicated by transfecting cells with a vector encoding ubiquitin fused at its N-terminus to the FLAG tag, an approach which allows a more sensitive visualization of MCM7 modification (Figure 3B, lane 2). It was further analyzed whether this polyubiquitination was specific of MCM7 or also intervenes with other MCMs. Cells were transfected with expression vectors for MCM4, MCM6 or MCM7 fused at their N-terminus to the HA epitope, along with a plasmid producing FLAG-ubiquitin. In agreement with previous results, immunoprecipitation using the HA antibody showed that MCM7 is polyubiquitinated, but this was not seen for MCM4 and MCM6 (Figure 3C).

In mammalian cells, MCM7 is tightly associated with chromatin in G1 and progressively unloaded during S phase as replication proceeds (Fujita et al., 1996). Hence, we examined whether ubiquitination affects distribution of MCM7 between nucleoplasm and chromatin. For this, 293T cells transfected with vectors expressing HA-ubiquitin and FLAG-MCM7 were separated into non-chromatin and chromatin fractions. Fractionation was controlled by detection of origin recognition complex subunit 2 (ORC2) constitutively associated with chromatin, and also of ribonucleotide reductase polypeptide M2 (RRM2) localized within the cytoplasm (Figure 3D, lower panels). Overexpression of ubiquitin augmented the signal corresponding to tagged MCM7 in the chromatin fraction (Figure 3C, compare lanes 6 and 7), and high molecular weight bands corresponding to polyubiquitinated MCM7 were specifically detected in this fraction (Figure 3C, compare lanes 7 and 3). Hence, ubiquitination of MCM7 does not preclude its association with chromatin but appears to reinforce it. Interestingly, Int6 overexpression was found to increase both unmodified and polyubiquitinated forms of MCM7 in the chromatin fraction (Figure 3D, compare lanes 8 and 7).

Proteasome inhibition augments association of Int6 with MCM7

We next examined whether ubiquitination of MCM7 affects its interaction with Int6. As MG132 treatment increases the amount of MCM7 polyubiquitinated forms (Figure 3A), cells transfected with combinations of vectors expressing MYC-MCM7 and Int6-FLAG were either untreated or treated with MG132. Immunoprecipitation of MYC-MCM7 triggered a weak coprecipitation of Int6 (Figure 4, lower panel, lane 7) which was reinforced by MG132 (Figure 4, lower panel, compare lanes 7 and 8). Similarly, by precipitating Int6-FLAG, a higher amount of MCM7 was coprecipitated when the proteasome was inhibited (Figure 4, upper panel, compare lanes 11 and 12). These differences are not due to a better recovery of proteins recognized by antibodies used for immunoprecipitation (Figure 4, upper panel, lanes

7 and 8, and lower panel, lanes 11 and 12). In the presence of MG132, the ladder of bands corresponding to ubiquitinated MCM7 was detected after immunoprecipitation of MYC-MCM7 and also Int6-FLAG (Figure 4, upper panel, lanes 8 and 12). This indicates that Int6 interacts with both unmodified and polyubiquitinated MCM7. It was further verified whether a similar effect was observed using non-tagged forms of the two proteins. To this end cells were transfected with vectors expressing wild-type Int6 and MCM7. Overexpression of FLAG-ubiquitin together with Int6 and MCM7 was found to increase the amount of MCM7 coprecipitated with Int6 when cells were treated with MG132, and also revealed the presence of polyubiquitinated forms of MCM7 (Figure S3A, lower panel, lane 8). Next, we examined whether Int6 associates with nucleoplasmic or chromatin-associated MCM7. Although both MCM7 and Int6 (data not shown) were present in the cytoplasmic fraction with the fractionation process which was used (see legend to Figure S3), MCM7 was not detected in the Int6 immunoprecipitate from this fraction, either without or with MG132 treatment (Figure S3B, lower panel, lanes 1 and 4). By contrast, a low amount of MCM7 was coprecipitated with Int6 in the nucleoplasmic fraction and this was increased following proteasome inhibition (Figure S3B, lanes 2 and 5). Using the chromatin fraction, Int6 was also found to bind MCM7, but mainly when cells were treated with MG132 (Figure S3B, lane 6). Collectively, these data indicate that Int6 interacts with both unmodified and polyubiquitinated MCM7 within the nucleus, either associated with chromatin or present in the nucleoplasm. The fact that association of the two proteins is strengthened following proteasome inhibition suggests that Int6 interacts with MCM7 species that are subjected to proteasomal processing. Hence, we studied further if Int6 may affect MCM7 stability.

Stabilization of MCM7 by Int6

As a first attempt to see whether Int6 regulates the half-life of MCM7, pulse-chase experiments were performed in 293T cells. These experiments showed that raising the

intracellular amount of Int6 reduces the decrease in radiolabeled endogenous MCM7 as a function of time (Figure 5A). Stability of MCM6 or RRM2 was marginally modified by Int6 overexpression (Figure S4). In agreement with a stabilizing role of Int6 overexpression, an increase in polyubiquitinated MCM7 was observed when the intracellular amount of Int6 was raised (Figure 5B, compare lanes 7 and 8). This was likely to result from hindered degradation of these polyubiquitinated forms. To confirm that Int6 acts on the stability of MCM7, we assessed the consequence of its suppression by RNA interference. Immunoblot analysis of extracts obtained from cells treated with the *int6* siRNAs showed a lower MCM7 signal (Figure 5C, compare lanes 3 and 4 with lanes 1 and 2). That the same outcome was obtained with two different siRNA duplexes indicates that it results from silencing of Int6 and not from an off-target effect. Such decreased protein amounts were not observed for MCM4 or HSPC021 (Figure 5C), and for MCM3, a slight decrease was seen but only with one *int6* siRNA couple. It was next examined which pool of MCM7 was decreased by Int6 silencing. Cells transfected with control, *int6* or *mcm7* siRNAs were separated in non-chromatin and chromatin fractions. When Int6 was silenced, a decreased MCM7 immunoreactivity was apparent in the chromatin fraction, but not in the non-chromatin extract (Figure 5D, upper panel, lanes 7 and 3). By contrast, cells transfected with *mcm7* siRNAs displayed reduced MCM7 protein amounts in both fractions (Figure 5D, upper panel, lanes 4 and 8). These data show that Int6 controls the amount of MCM7 associated with chromatin.

We previously reported that silencing of Int6 in HeLa cells does not modify duration of the G1 phase (Morris and Jalinot, 2005), thus providing an indication that the onset of DNA replication is not altered. By contrast, occurrence of mitotic catastrophe and higher γ -H2AX amounts in these cells are suggestive of possible defects during the replication process. To test this prediction, we first measured the stability of MCM7 in control or Int6-depleted cells synchronized at the G1/S transition by a double thymidine block (Figure 6A). A much more

rapid degradation of MCM7 during S phase was observed following Int6 silencing: MCM7 half-life was calculated to 2.9 h in Int6-depleted cells versus 8.2 h in control cells (Figure 6B). Such an increased degradation was not found for MCM6 or RRM2 (Figure S5).

It is known that MCM proteins start to dissociate from chromatin during S phase (Fujita et al., 1996). Thus, we investigated whether this dissociation process was affected by Int6 knockdown. HeLa cells synchronized by a double thymidine block were harvested at different times during S and G2 phases and fractionated into chromatin and non-chromatin extracts. Immunoblots from these fractions showed that the levels of MCM7 and MCM6 in chromatin fractions decline progressively and are very weak when cells enter G2 (Figure 6C). Interestingly, when Int6 was silenced, the progressive decline was accelerated and a lower amount of MCM7 was associated with chromatin during S phase (Figure 6C, lanes 7 and 8, compare MCM7 signals in chromatin fraction at times 2 h and 4 h from control and int6 siRNA-transfected cells). Quantitation of this effect is shown on Figure 6D. These results suggest that stabilization by Int6 of the MCM7 polyubiquitinated forms on chromatin slows down their removal from this compartment and that this removal process is dependent on proteasome activity. To evaluate this point, we analyzed how blockade of the proteasome with MG132 affects MCM7 chromatin unloading. HeLa cells synchronized by a double thymidine block were treated or not with MG132 1h after block release, collected at different times and fractionated into non-chromatin and chromatin fractions. In untreated cells, MCM7 unloading took place as expected whereas in MG132-treated cells, it was strongly inhibited (Figure 7A lanes 5-8; Figure 7B). Cell cycle analysis showed that this was not due to an arrest of these cells in G1/S. Indeed at the 3h time point, no modification in the cell cycle distribution was observed following MG132 treatment, although a clear inhibitory effect on unloading was visible (Figure 7B). At later times, MG132 slows down progression of cells towards G2/M. Interestingly, at the 6 and 9 h time points, a long exposure of the immunoblot

carried out with the antibody to MCM7 showed a smear of high molecular weight bands in the chromatin fraction corresponding to polyubiquitinated MCM7. This smear was not visible at shorter time points or in the absence of MG132 treatment (data not shown). These observations thus support the notion that MCM7 unloading from chromatin during S phase depends on processing of its polyubiquitinated forms by the proteasome.

Int6 depletion activates expression of *mcm7*

The MCM7 level is almost constant during cycling of control cells as compared with Int6-silenced cells where it decreases during S phase and then re-increases during G2 (Figure 8A). As Int6 is associated with the eIF3 translation initiation factor, we investigated if its depletion affected *mcm7* mRNA translation. So we analyzed incorporation of radiolabeled methionine into MCM7 as a function of time in mock- or *int6* siRNA-transfected cells, but we did not find any effect of Int6 silencing (Figure S6A). The distribution of the *mcm7* mRNA between cytoplasm and nucleus was also observed to be insensitive to Int6 depletion (Figure S6B). Finally, it was also observed that Int6 suppression did not alter the presence of *mcm7* mRNA in polysomes (Figure S6C). We concluded from these observations that Int6 depletion affects neither nuclear export nor translation of the *mcm7* mRNA.

In yeast, MCM7 is able to inhibit its own transcription (Fitch et al., 2003). So we hypothesized that reduced abundance of MCM7 in S phase of Int6-silenced cells may induce higher *mcm7* transcription, leading to the re-increase in MCM7 amount observed in G2. We quantified *mcm4*, *mcm6* and *mcm7* mRNAs in cells synchronized at different times in S and G2 phases and showed that only *mcm7* mRNA increases during S phase of Int6-silenced cells (Figure 8B), the time at which MCM7 protein appears the most unstable. This indicates that reduction in chromatin-bound MCM7 triggers re-expression of its gene, which is likely to compensate in G2 the loss of MCM7 in S phase due to Int6 depletion.

Int6 depletion causes a DNA replication defect

Finally, we examined if the effects of Int6 depletion observed for MCM7 correlate with DNA replication alterations. DNA synthesis was monitored by incorporation of radiolabeled thymidine in cells transfected with control, mcm7 and int6 siRNAs (Figure 9B and C). As expected, MCM7 silencing slows down thymidine incorporation which remains 40% lower at the end of S phase (Figure 9A). Int6 silencing has an even stronger effect, showing a 60% diminished thymidine incorporation (Figure 9A). This indicates that MCM7, but also Int6 silencing causes DNA replication defects. We anticipated that MCM7 depletion impedes activity of the whole MCM complex, causing replication stress and DNA damage, and in fact, chromatin-bound RPA increased after mcm7 siRNA transfection (Figure 10A). Int6 silencing also led to such an increase in chromatin-bound RPA, whereas chromatin-bound MCM7 was reduced, as already noticed (Figure 5D). We also analyzed distribution of claspin, another protein of which association with replication forks is increased in case of replication stress (Lin et al., 2004; Sar et al., 2004). As for RPA, Int6 silencing increases its abundance on chromatin, in a more efficient way than MCM7 silencing (Figure 10B). This suggests that Int6 is important for DNA replication, its depletion leading to replication fork stress and DNA damage, as seen with increased phosphorylation of H2AX.

Discussion

Regulation of MCM7 by polyubiquitination

To ensure genome stability during replication, molecular mechanisms have evolved to avoid non-replicated or over-replicated DNA regions. The MCM complex, recruited onto origins during G1, acts in this surveillance by allowing only one round of replication per cell cycle. MCM7 contributes in various aspects of the MCM complex functioning and is most likely

regulated by post-translational modifications (Wang et al., 2000). In agreement with a previous report, we show here that MCM7 can be polyubiquitinated (Kuhne and Banks, 1998) and that the resulting modified forms are processed by the proteasome as they increase when cells are treated with an inhibitor of this proteolytic complex. Interestingly, we observed that MCM7 polyubiquitinated forms were associated with chromatin, suggesting they can be degraded when still associated with DNA. Moreover, we show that MCM7 is less stable in S phase as compared with G2/M. From these observations, we propose that removal of MCM7 from chromatin during S phase results from its degradation. This notion is supported by the strong inhibition of MCM7 unloading observed after proteasome blockade by MG132 treatment. It has been shown that several MCM complexes are loaded per replication origin (Blow and Dutta, 2005) and, considering the limited helicase activity of the MCM complex, one can speculate that a single MCM complex separate both DNA strands on a limited distance. At a certain point the MCM complex would be disassembled, possibly as a consequence of polyubiquitinated MCM7 degradation. Another MCM complex would then exert the helicase activity on a new portion of DNA. Such a sequential intervention of numerous MCM complexes and their progressive disassembly could explain gradual removal of the MCM proteins from chromatin in the course of DNA replication.

Int6 increases MCM7 stability

Our data show that Int6 interacts with a C-terminal domain of MCM7. Conversely to what could have been expected considering interaction of Int6 with the 26S proteasome (Hoareau Alves et al., 2002), Int6 overexpression increases MCM7 stability and Int6 silencing destabilizes this replication factor specifically during S phase. So, association of Int6 with polyubiquitinated MCM7 possibly hampers its efficient processing by the 26S proteasome, as shown for the yeast protein Rad23. With its ubiquitin-like (UbL) and ubiquitin-associated domains (UBA), Rad23 can bind both the proteasome and ubiquitinated proteins, thus

strongly inhibiting their degradation, at least in some instances (Raasi and Pickart, 2003; Ortolan et al., 2004; Hwang et al., 2005). Another interesting example is the adenovirus E1a protein which interacts with the Rpn1, Rpt2 and Rpt6 subunits of the proteasome 19S regulatory particle and protects p53 from degradation, likely by impairing processing of its polyubiquitinated forms by the proteasome (Zhang et al., 2004). As Int6 interacts with Rpt4 (Hoareau Alves et al., 2002) and Rpn5 (Yen et al., 2003), it might similarly inhibit the processing of MCM7 polyubiquitinated forms by hindering their association with the proteasome. Our results suggest that this protective effect can occur when Int6 and MCM7 are on DNA, because they interact in chromatin extracts. This interaction was also observed in a nucleoplasmic extract, but not in a cytoplasmic extract containing both proteins in abundance. In this latter case, binding of Int6 to other proteins (as eIF3 subunits) is likely to preclude its association with MCM7. Collectively, our observations suggest that Int6 restrains the increased degradation of MCM7 occurring during DNA replication by protecting its polyubiquitinated derivatives from the proteasome activity.

Regulation of MCM7 amount in response to its destabilization

The total amount of MCM7 was reduced in S phase of Int6-silenced cells, due to its decreased half-life, but normal levels were recovered in late G2. Unexpectedly, this fluctuation appeared to result not from an effect of Int6 silencing on *mcm7* mRNA translation but from an increase in the amount of *mcm7* mRNA that occurred mainly during S phase. In yeast, Mcm7 inhibits its own expression by binding to its promoter in association with Mcm1 (Fitch et al., 2003). A likely explanation to the increased transcription of *mcm7* in Int6-silenced cells is that MCM7 also negatively regulates its own expression in mammalian cells. Its destabilization accelerates its removal from chromatin and this would enhance transcription of its gene, thereby constituting a feedback loop that would normalize the amount of MCM7 in G2 since the protein is more stable in this phase. Concerning the model previously evoked linking

removal of MCM7 from chromatin to its degradation, such a retro control also explains why its level remains nearly constant during cell cycle progression despite its lower stability in S phase.

Alteration of genomic integrity by modification of DNA replication factors stability

As reported previously, Int6 silencing in HeLa cells triggers various mitotic abnormalities. We show here that Int6-silenced cells end in mitotic catastrophe, likely due to DNA damage as supported by data obtained on γ -H2AX levels. The effects of Int6 on MCM7 stability suggest that damaged DNA originates from a replication defect. Examination of thymidine incorporation kinetics in MCM7 and Int6-silenced cells showed a similar alteration, although stronger in the latter case, possibly due to an effect on the stability of other proteins participating to replication. Alternatively, premature MCM7 unloading might impede replication more profoundly than a reduction in its total amount. Loss of MCM7 at early steps of replication is likely to impair helicase activity of the MCM complex, causing replication fork stress and DNA damage as supported by the increase in the chromatin-bound pool of RPA and claspin, both binding single-stranded DNA. That DNA alterations occurring in S phase do not arrest cycling of Int6-silenced cells likely results from a defective checkpoint response, in which MCM7 plays an important role. Cortez et al. (2004) have shown that reducing MCM7 level alters the replication blockade normally occurring in response to irradiation. Interaction of MCM7 with hRAD17 is also important for the response to UV irradiation (Tsao et al., 2004). These studies suggest a key role of MCM7 in DNA damage sensing. In line with these observations, preliminary results indicate that both ATM and ATR activities are perturbed in Int6-silenced cells (Morris, unpublished results). Future studies should allow determining whether these defects result only from MCM7 alteration or also involve perturbation of other factors. Whatever the precise molecular explanation, abrogation

of normal S and G2 arrest by ATM and ATR activation explains why Int6-silenced cells enter mitosis despite clear signs of DNA damage.

In conclusion, our results show that Int6 exerts a key role in completion of DNA replication by controlling MCM7 proteolysis. Int6 interacts with MCM7 and its silencing is associated with replication defects and DNA damage, as attested by induction of H2AX phosphorylation. This offers a tentative molecular rationalization for the genomic instability observed after Int6 silencing and might explain why a reduction of its expression is a poor prognosis indicator in non-small cell lung carcinomas (Buttitta et al., 2005). However, as Int6 silencing leads to a stronger phenotype than MCM7 suppression, it is likely that other factors important for DNA replication or mitosis completion are sensitive to its absence.

Materials and methods

Time-lapse video microscopy and flow cytometry

HeLa cells treated with siRNAs were time-lapse recorded every 5 min from 60 h to 72 h after transfection. Cells were imaged using a Zeiss equipment consisting of a humidified chamber kept at 37°C under an atmosphere of 5% CO₂ and an Axiovert 100M microscope equipped with a coolSNAP HQ camera (Photometrics) controlled by Metaview 4.9 imaging software (Universal Imaging). Cell cycle analysis and DNA content analysis was performed as previously described (Morris and Jalinot, 2005).

Constructs

pSGM-MCM7 and pSGF-MCM7 were generated by amplifying with appropriate primers the MCM7 coding sequence from a plasmid including the complete human MCM7 ORF kindly provided by M. Fujita (Fujita et al., 1996). PCR products were inserted between XhoI and

BglII sites of pSGM or XhoI filled in and BamHI sites of pSGF vector which are pSG5 derivatives including the MYC or FLAG epitope. pSGHA-MCM4, pSGHA-MCM6 and pSGHA-MCM7 were generated by inserting the MCM4, MCM6 and MCM7 coding sequences, respectively, in pSG-HA, a pSG5 derivative including the HA epitope.

pSGF-Ub was generated by amplifying and inserting between BamHI and XhoI sites of pSGF the human ubiquitin coding sequence. pSG-HA-Ub, which expresses human ubiquitin fused at its N-terminus with three HA epitopes, was generated by inserting the HindIII BamHI restriction fragment of plasmid pcDNA-HA-Ub, kindly provided by V. Dixit (Zhou et al., 2004), between the HindIII and BglII restriction sites of pTL1.

Cell culture and transfection

Jurkat cells were cultured in RPMI 1640 medium with 10% fetal calf serum (FCS) (Sigma), 100 units/ml penicillin and 100 µg/ml streptomycin (Gibco) at 37°C in a 10% CO₂-humidified atmosphere. HeLa, 293T and COS7 cells were cultured in Dulbecco's Modified Eagle Medium with 10% FCS (Gibco), 100 units/ml penicillin and 100 µg/ml streptomycin at 37°C in a 5% CO₂-humidified atmosphere. For transfection FCS concentration was reduced to 5% and antibiotics were omitted for siRNA transfection which was performed using the Lipofectamine 2000 reagent (Invitrogen). Int6 and control siRNA duplexes have been described previously (Morris et al., 2005). mcm7 siRNAs corresponded to nucleotide 247 to 265 with respect to the initiation codon on the sense strand of the mcm7 mRNA, with addition of two T residues at each 3' end. Expression vectors were transfected using the calcium phosphate precipitation method. To achieve inhibition of the proteasome, MG132 (Sigma) was added at 10 or 20 µM. For G1/S synchronization, 2.5 mM of thymidine (Sigma) was added for 18 h, then removed for 10 h and added at the same concentration for 14 h. For pulse chase experiments, cells were incubated for a 2-h pulse in culture medium with 150 µCi/ml

³⁵S-Methionine (Amersham Pharmacia Biotech), washed, incubated for chase in DMEM 5% FCS and finally washed with PBS and frozen. For thymidine incorporation assay, cells were incubated in culture medium containing 10 μ Ci/ml methyl³H-thymidine (Amersham Pharmacia Biotech), then washed twice with cold 10% TCA and lysed in 0.2 N NaOH. Radioactivity of lysates was counted in a Wallac apparatus with ³H mode by adding 30 μ l of lysate in 1 ml of Supermix (Perkin-Elmer). Values in cpm were normalized with respect to protein concentrations which were quantified with the DC protein assay kit (BioRad).

Cell fractionation

HeLa or 293T cells were lysed in 300 μ l buffer F (10 mM Hepes pH 7.5; 300 mM sucrose; 100 mM NaCl; 3 mM MgCl₂; 0.5% NP40; 1 mM DTT; 5 mM iodoacetamide) during a 20 min incubation on ice with resuspension every 5 min. Chromatin was isolated by a centrifugation of 3 min at 350 g, washed three times and sonicated in 300 μ l buffer F.

Immunoprecipitation and immunoblot

To analyse interaction between endogenous Int6 and MCM7, 1×10^7 HeLa or Jurkat cells were lysed in 300 μ l buffer N (50 mM Tris-HCl, pH 7.4; 300 mM NaCl; 0.05% NP-40; 0.5 mM TCEP (Sigma); 0.5 mM Pefabloc (Roche)) by four 10 s sonication time using a Bioruptor system (Diagenode) and centrifuged at 10,000 g for 10 min at 4 °C. Lysates were precleared by incubation with 40 μ l of protein A-agarose beads for 1 h and supernatants were incubated overnight at 4 °C with a mix of two Int-6 antisera (C-20 and N-19). 80 μ l of protein A-agarose beads were then added for 1 h, washed 3 times for 10 min and resuspended in 20 μ l of 2X SDS sample buffer. For all other immunoprecipitations, cells were lysed in 300 μ l RIPA buffer (Harlow and Lane, 1988) containing 1 mM iodoacetamide (Sigma) and centrifuged for 15 min at 14,000 rpm. Supernatants adjusted to equal protein concentrations were incubated

for 1 h 30 with antibodies diluted 1:250. 40 μ l of protein A beads were then added to the mixes which were further incubated for an additional hour. Beads were collected by centrifugation at 2,000 rpm for 2 min and washed three times in lysis buffer. Proteins were eluted in 2x SDS sample buffer at 80°C for 10 min. After separation by SDS-PAGE, proteins were transferred to PVDF membrane (Amersham Biosciences). For immunoblot, primary antibodies were diluted 1:1,000 or as indicated by the manufacturer and detection was performed by chemiluminescence.

The antibody against MCM7 was obtained by immunization of rabbits with a peptide corresponding to the N-terminal 20 amino acids of MCM7 coupled to a carrier protein. Antibodies against MCM3 and 4 were kindly provided by H. Kimura (Kimura et al., 1995), those against MCM6 and RRM2 by R. Knippers (Holthoff et al., 1998) and by T. Kinsella (Kuo and Kinsella, 1997). The C-20 rabbit polyclonal antibody to Int6 has been previously described (Morris-Desbois et al., 1999). Following antibodies were purchased: γ -H2AX (#2577, Cell Signaling Technology); polyubiquitinated proteins (P4D1, Cell Signaling Technology), dimethylH3 (#07-030, Upstate), MYC (clone 9E10, Sigma), FLAG (clone M2, Sigma), β -actin (Sigma), ORC2 (#559266, BD Biosciences), RPA p70 subunit (#NA13, Oncogene), claspin (#NB100-247, Novus Biologicals) and HA (clone 12CA5, Roche).

Real-time quantitative RT-PCR

Total RNAs were extracted from frozen cells using the RNeasy mini-kit (Qiagen). For cytoplasmic and nuclear RNAs, cells were harvested, washed in PBS and incubated for 5 min on ice in buffer R (10 mM Tris-HCl pH 7.8; 10 mM NaCl; 2 mM MgCl₂; 5 mM DTT). NP40 was then added at 0.5% and incubation pursued for 5 min. Nuclei were centrifuged for 4 min at 1,300 g and RNAs from cytoplasmic supernatant precipitated with ethanol. Nuclei and cytoplasmic RNAs were then extracted using the RNeasy mini-kit. One step RT-PCR reactions

were performed using the QuantiTect™ SYBR Green RT-PCR kit (Qiagen) and the LightCycler apparatus (Roche). Sequences of sense and antisense primers (designed using the Primer3 software) used for quantitative PCR were as follows: MCM4: 5'-ACCCTCAGGACGAAGCCTAT-3', 5'-CGAGGGTATGCAGAAACCAT-3'; MCM6: 5'-CATGTCCCGATTCGATCTCT-3', 5'-TCTCTCTGGCGGAGATGTTT-3'; MCM7: 5'-CCCACTTTCATGCCTCTGAT-3', 5'-ATACCAGTGACGCTGACGTG-3'; β -actin: 5'-GGACTTCGAGCAAGAGATGG-3', 5'-AGCACTGTGTTGGCGTACAG-3'.

Acknowledgements

We wish to thank G. Chyderiotis, V. Dixit, M. Fujita, H. Kimura and R. Knippers for the generous gifts of plasmids and antibodies. We are also grateful to A. Roisin for help with cell culture and to F. Simian-Lermé and C. Lionnet for assistance with video time-lapse microscopy. This work was supported by a grant from the “Fondation pour la Recherche Médicale” and by a fellowship from the “Ligue Nationale contre le cancer” (S.B.).

References

- Akiyoshi, Y., Clayton, J., Phan, L., Yamamoto, M., Hinnebusch, A.G., Watanabe, Y. and Asano, K. (2001) Fission yeast homolog of murine Int-6 protein, encoded by mouse mammary tumor virus integration site, is associated with the conserved core subunits of eukaryotic translation initiation factor 3. *J. Biol. Chem.*, **276**, 10056-10062.
- Asano, K., Merrick, W.C. and Hershey, J.W. (1997) The translation initiation factor eIF3-p48 subunit is encoded by int-6, a site of frequent integration by the mouse mammary tumor virus genome. *J Biol Chem*, **272**, 23477-23480.
- Bandyopadhyay, A., Matsumoto, T. and Maitra, U. (2000) Fission yeast Int6 is not essential for global translation initiation, but deletion of int6(+) causes hypersensitivity to caffeine and affects spore formation. *Mol. Biol. Cell.*, **11**, 4005-4018.
- Blow, J.J. and Dutta, A. (2005) Preventing re-replication of chromosomal DNA. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*, **6**, 476-486.
- Burks, E.A., Bezerra, P.P., Le, H., Gallie, D.R. and Browning, K.S. (2001) Plant initiation factor 3 subunit composition resembles mammalian initiation factor 3 and has a novel subunit. *J. Biol. Chem.*, **276**, 2122-2131.
- Buttitta, F., Martella, C., Barassi, F., Felicioni, L., Salvatore, S., Rosini, S., D'Antuono, T., Chella, A., Mucilli, F., Sacco, R., Mezzetti, A., Cuccurullo, F., Callahan, R. and Marchetti, A. (2005) Int6 expression can predict survival in early-stage non-small cell lung cancer patients. *Clin. Cancer Res.*, **11**, 3198-3204.
- Castedo, M., Perfettini, J.L., Roumier, T., Andreau, K., Medema, R. and Kroemer, G. (2004) Cell death by mitotic catastrophe: a molecular definition. *Oncogene*, **23**, 2825-2837.
- Cook, J.G., Chasse, D.A. and Nevins, J.R. (2004) The regulated association of Cdt1 with minichromosome maintenance proteins and Cdc6 in mammalian cells. *J. Biol. Chem.*, **279**, 9625-9633.

- Cortez, D., Glick, G. and Elledge, S.J. (2004) Minichromosome maintenance proteins are direct targets of the ATM and ATR checkpoint kinases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **101**, 10078-10083.
- Crane, R., Craig, R., Murray, R., Dunand-Sauthier, I., Humphrey, T. and Norbury, C. (2000) A fission yeast homolog of Int-6, the mammalian oncoprotein and eIF3 subunit, induces drug resistance when overexpressed. *Mol. Biol. Cell.*, **11**, 3993-4003.
- Durfee, T., Becherer, K., Chen, P.-L., Yeh, S.-H., Yang, Y., Kilburn, A.E., Lee, W.-H. and Elledge, S.J. (1993) The retinoblastoma protein associates with the protein phosphatase type 1 catalytic subunit. *Genes and Dev.*, **7**, 555-569.
- Fitch, M.J., Donato, J.J. and Tye, B.K. (2003) Mcm7, a subunit of the presumptive MCM helicase, modulates its own expression in conjunction with Mcm1. *J. Biol. Chem.*, **278**, 25408-25416.
- Fujita, M., Kiyono, T., Hayashi, Y. and Ishibashi, M. (1996) hCDC47, a human member of the MCM family. Dissociation of the nucleus-bound form during S phase. *J. Biol. Chem.*, **271**, 4349-4354.
- Gillespie, P.J., Li, A. and Blow, J.J. (2001) Reconstitution of licensed replication origins on *Xenopus* sperm nuclei using purified proteins. *BMC Biochem.*, **2**, 15.
- Guo, J. and Sen, G.C. (2000) Characterization of the interaction between the interferon-induced protein P56 and the Int6 protein encoded by a locus of insertion of the mouse mammary tumor virus. *J. Virol.*, **74**, 1892-1899.
- Harlow, E. and Lane, D. (1988) Immunoprecipitation. In CSH Laboratory, C.S.H. (ed.), *Antibodies: A laboratory manual*, N.Y., pp. 447-470.
- Hoareau Alves, K., Bochard, V., Rety, S. and Jalinot, P. (2002) Association of the mammalian proto-oncoprotein Int-6 with the three protein complexes eIF3, COP9 signalosome and 26S proteasome. *FEBS Lett.*, **527**, 15-21.

- Holthoff, H.P., Baack, M., Richter, A., Ritzi, M. and Knippers, R. (1998) Human protein MCM6 on HeLa cell chromatin. *J. Biol. Chem.*, **273**, 7320-7325.
- Hwang, G.W., Sasaki, D. and Naganuma, A. (2005) Overexpression of Rad23 Confers Resistance to Methylmercury in *Saccharomyces cerevisiae* via Inhibition of the Degradation of Ubiquitinated Proteins. *Mol. Pharmacol.*
- Ishimi, Y. (1997) A DNA helicase activity is associated with an MCM4, -6, and -7 protein complex. *J. Biol. Chem.*, **272**, 24508-24513.
- Kimura, H., Takizawa, N., Nozaki, N. and Sugimoto, K. (1995) Molecular cloning of cDNA encoding mouse Cdc21 and CDC46 homologs and characterization of the products: physical interaction between P1(MCM3) and CDC46 proteins. *Nucleic Acids Res.*, **23**, 2097-2104.
- Kuhne, C. and Banks, L. (1998) E3-ubiquitin ligase/E6-AP links multicopy maintenance protein 7 to the ubiquitination pathway by a novel motif, the L2G box. *J. Biol. Chem.*, **273**, 34302-34309.
- Kuo, M.-L. and Kinsella, T. (1997) Overexpression of a hexa-histidine and T7 peptide-tagged human ribonucleotide reductase small subunit, R2 in *Escherichia coli* and the generation of human R2 antibodies. *Intl. J. Oncol.*, **10**, 515-520.
- Lee, J.K. and Hurwitz, J. (2001) Processive DNA helicase activity of the minichromosome maintenance proteins 4, 6, and 7 complex requires forked DNA structures. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **98**, 54-59.
- Lin, S.Y., Li, K., Stewart, G.S. and Elledge, S.J. (2004) Human Claspin works with BRCA1 to both positively and negatively regulate cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 6484-6489.

- Marchetti, A., Buttitta, F., Miyazaki, S., Gallahan, D., Smith, G.H. and Callahan, R. (1995) Int-6, a highly conserved, widely expressed gene, is mutated by mouse mammary tumor virus in mammary preneoplasia. *J. Virol.*, **69**, 1932-1938.
- Mayeur, G.L. and Hershey, J.W. (2002) Malignant transformation by the eukaryotic translation initiation factor 3 subunit p48 (eIF3e). *FEBS Lett.*, **514**, 49-54.
- Morris, C. and Jalinet, P. (2005) Silencing of human Int-6 impairs mitosis progression and inhibits cyclin B-Cdk1 activation. *Oncogene*, **24**, 1203-1211.
- Morris-Desbois, C., Bochar, V., Reynaud, C. and Jalinet, P. (1999) Interaction between the Ret finger protein and the Int-6 gene product and co-localisation into nuclear bodies. *J. Cell Sci.*, **112**, 3331-3342.
- 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.
- Ortolan, T.G., Chen, L., Tongaonkar, P. and Madura, K. (2004) Rad23 stabilizes Rad4 from degradation by the Ub/proteasome pathway. *Nucleic Acids Res.*, **32**, 6490-6500.
- Raasi, S. and Pickart, C.M. (2003) Rad23 ubiquitin-associated domains (UBA) inhibit 26 S proteasome-catalyzed proteolysis by sequestering lysine 48-linked polyubiquitin chains. *J. Biol. Chem.*, **278**, 8951-8959.
- Rasmussen, S.B., Kordon, E., Callahan, R. and Smith, G.H. (2001) Evidence for the transforming activity of a truncated Int6 gene, in vitro. *Oncogene*, **20**, 5291-5301.
- Sar, F., Lindsey-Boltz, L.A., Subramanian, D., Croteau, D.L., Hutsell, S.Q., Griffith, J.D. and Sancar, A. (2004) Human claspin is a ring-shaped DNA-binding protein with high affinity to branched DNA structures. *J Biol Chem*, **279**, 39289-39295.

- Skoufias, D.A., Andreassen, P.R., Lacroix, F.B., Wilson, L. and Margolis, R.L. (2001) Mammalian mad2 and bub1/bubR1 recognize distinct spindle-attachment and kinetochore-tension checkpoints. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **98**, 4492-4497.
- Tsao, C.C., Geisen, C. and Abraham, R.T. (2004) Interaction between human MCM7 and Rad17 proteins is required for replication checkpoint signaling. *Embo J.*, **23**, 4660-4669.
- Wang, Y., Xu, F. and Hall, F.L. (2000) The MAT1 cyclin-dependent kinase-activating kinase (CAK) assembly/targeting factor interacts physically with the MCM7 DNA licensing factor. *Febs Lett.*, **484**, 17-21.
- Yahalom, A., Kim, T.H., Winter, E., Karniol, B., von Arnim, A.G. and Chamovitz, D.A. (2001) Arabidopsis eIF3e (INT-6) associates with both eIF3c and the COP9 signalosome subunit CSN7. *J. Biol. Chem.*, **276**, 334-340.
- Yanagi, K., Mizuno, T., You, Z. and Hanaoka, F. (2002) Mouse geminin inhibits not only Cdt1-MCM6 interactions but also a novel intrinsic Cdt1 DNA binding activity. *J. Biol. Chem.*, **277**, 40871-40880.
- Yen, H.C. and Chang, E.C. (2000) Yin6, a fission yeast Int6 homolog, complexes with Moe1 and plays a role in chromosome segregation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **97**, 14370-14375.
- Yen, H.C., Gordon, C. and Chang, E.C. (2003) *Schizosaccharomyces pombe* Int6 and Ras homologs regulate cell division and mitotic fidelity via the proteasome. *Cell*, **112**, 207-217.
- You, Z., Ishimi, Y., Masai, H. and Hanaoka, F. (2002) Roles of Mcm7 and Mcm4 subunits in the DNA helicase activity of the mouse Mcm4/6/7 complex. *J. Biol. Chem.*, **277**, 42471-42479.

- Zhang, X., Turnell, A.S., Gorbea, C., Mymryk, J.S., Gallimore, P.H. and Grand, R.J. (2004) The targeting of the proteasomal regulatory subunit S2 by adenovirus E1A causes inhibition of proteasomal activity and increased p53 expression. *J. Biol. Chem.*, **279**, 25122-25133.
- Zhou, C., Arslan, F., Wee, S., Krishnan, S., Ivanov, A.R., Oliva, A., Leatherwood, J. and Wolf, D.A. (2005) PCI proteins eIF3e and eIF3m define distinct translation initiation factor 3 complexes. *BMC Biol.*, **3**, 14.
- Zhou, H., Wertz, I., O'Rourke, K., Ultsch, M., Seshagiri, S., Eby, M., Xiao, W. and Dixit, V.M. (2004) Bcl10 activates the NF-kappaB pathway through ubiquitination of NEMO. *Nature*, **427**, 167-171.

Figure legends

FIGURE 1

Int6-depleted HeLa cells arrested in mitosis undergo mitotic catastrophes and show signs of DNA damage. **(A)** Mitotic progression of control and int6 siRNA-transfected cells. Time is indicated in h:min in each frame. Panel 1 shows a video time-lapse sequence of a typical control cell that completed its mitosis in 1 h. Panels 2-4 illustrate mitotic block and cell death of Int6-silenced cells from a 3-h long time-lapse experiment. Nuclear fragmentation is visible on panel 4 (arrowhead). Panel 5 shows a cell arrested in mitosis for at least 11 h that finally entered mitotic catastrophe. **(B)** HeLa cells were transfected with control, I6.1 or I6.3 siRNAs and DNA content was analyzed by flow cytometry 84 h after transfection. M1, M2, M3 and M4 correspond to cells with a DNA content $<2N$, $2N$, $>2N$ and $<4N$ and $4N$, respectively. The percentage of apoptotic cells with a $<2N$ DNA content is given for each siRNA couple. **(C)** HeLa cells were transfected for 72 h with annealing buffer (lane 1), control siRNAs (lane 2), siRNA duplexes I6.1 (lane 3) and I6.3 (lane 4). As a control, untransfected cells were left untreated (lane 5) or treated with 0.5 mM hydroxyurea for 18 h (lane 6). Immunoblot analysis was performed using a phospho-specific antibody against serine 139 of histone H2AX (γ -H2AX) (top panel). Int6 silencing was controlled by immunoblot using an antibody to Int6 (sc-31746, Santa Cruz Biotechnology) and protein loading with an antibody to β -actin. Signals corresponding to γ -H2AX and β -actin were quantified by densitometry and the ratios (set to 1 for cells either transfected with annealing buffer alone or mock-treated) are represented on the bottom diagram.

FIGURE 2

Int6 binds MCM7. **(A)** Schematic representation of MCM7 and of clones isolated by a two-hybrid screen with Int6 as bait. The ATP binding motif inside the MCM box is shown as a black box and the C-terminal PDZ binding site (PDZ-BS) as a grey box. The two-hybrid screen was performed as previously described (Morris-Desbois et al., 1999). Three cDNA clones partially encoding MCM7 were isolated and sequenced: THI43 (amino acids 482 to 719), THI44 (501 to 719) and THI56 (514 to 719). **(B)** 293T cells were transfected with pSG5 alone (lanes 2 and 6), pSGM-MCM7 (lanes 1 and 5), pSG-Int6-FLAG (lanes 3 and 7) or both of these latter plasmids (lanes 4 and 8). Lanes 1 to 4 correspond to cell lysates and lanes 5 to 8 to immunoprecipitates. Upper panel: immunoprecipitations were done with the FLAG antibody and immunoblotting with the MYC antibody. Lower panel: immunoprecipitations were performed with the MYC antibody and immunoblotting with the FLAG antibody. A band migrating above Int6 due to the heavy chain of the antibody used for immunoprecipitation is marked ns. **(C)** Jurkat (lanes 1 and 2) and HeLa (lanes 4 and 5) cell extracts were immunoprecipitated with preimmune serum (lanes 1 and 4) or a mix of the C-20 and N-19 antibodies to Int6 (lanes 2 and 5). Immunoprecipitated proteins and lysates (lanes 3 and 6) were analyzed by immunoblotting MCM7 (upper panel) and Int6 (lower panel) to verify Int6 pull-down.

FIGURE 3

MCM7 is modified by polyubiquitylation. **(A)** Lysates from untreated (lanes 1 and 2) or MG132-treated 293T cells (20 μ M, 6 h, lanes 3 and 4) were immunoprecipitated with preimmune (lanes 1 and 3) and MCM7 (lanes 2 and 4) antisera. Immunoprecipitated proteins were analyzed by immunoblot with antibodies to polyubiquitinated proteins (top panels) and to MCM7 (bottom panels). Polyubiquitinated MCM7s are indicated by a bar on the right and

positions of the 175 and 83 kD bands of a molecular weight marker run in parallel are given on the left. **(B)** 293T cells were transfected with 0.2 μ g of pSGFLAG-Ub and lysates were immunoprecipitated with preimmune or MCM7 antisera. Immunoblot analysis was done using antibodies to FLAG (top panel) and to MCM7 (bottom panel). **(C)** 293T cells were transfected with 0.2 μ g of pSGFLAG-Ub and 1 μ g of pSGHA-MCM4 (lane 1), pSGHA-MCM6 (lane 2) or pSGHA-MCM7 (lane 3). Lysates were immunoprecipitated with an antibody to HA. Immunoblot was done using antibodies to FLAG (top panel) and to HA (bottom panel). **(D)** 293T cells transfected with pSGF-MCM7 (1 μ g), pSGHA-Ub (0.2 μ g) and pTL1-Int6 (1 μ g) as indicated, were separated into non-chromatin (NC, lanes 1 to 4) and chromatin (C, lanes 5 to 8) fractions which were analyzed by immunoblot using a FLAG antibody (top panel). These extracts were also analyzed with antibodies directed against ORC2 (middle panel) or RRM2 (bottom panel) to control the fractionation process.

FIGURE 4

Proteasome inhibition increases the amount of MCM7 associated with Int6. 293T cells transfected with combinations of pSGM-MCM7 and pTL1-Int6FLAG (1 μ g each), as indicated, were either mock-treated or incubated with 20 μ M MG132 for 6 h. Immunoprecipitation was carried out in RIPA buffer with antibodies to MYC (lanes 5 to 8) or to FLAG (lanes 9 to 12). Lysates and immunoprecipitates were analyzed by immunoblot using antibody to MYC (top panel) or to FLAG (bottom panel). Positions of the 175-, 83- and 62-kD bands of a molecular weight marker are indicated. Between lanes 8 and 9, the star marks a non specific signal due to immunoglobulins (lanes 5-8) and the hyphen indicates position of the Int6 band.

FIGURE 5

Int6 stabilizes MCM7. **(A)** 293T cells transfected with 2 μg of pTL1 control vector or pTL1-Int6 were pulsed for 2 h with ^{35}S -Methionine (150 $\mu\text{Ci/ml}$) and then harvested at times 0, 2, 4 and 8 h. Corresponding lysates were used for immunoprecipitation with an antibody to MCM7. ^{35}S -labeled MCM7 and total immunoprecipitated MCM7 were quantified and the mean of the ratios of values at different times with respect to that at time 0 obtained from three independent experiments were plotted against time. **(B)** 293T cells were transfected with vectors pSGHA-Ub (0.2 μg), pSGM-MCM7 (1 μg) and pTL1-Int6 (1 μg), as indicated. Following immunoprecipitation with the antibody to MYC, lysates and immunoprecipitates were analyzed by immunoblot using antibodies to HA, MYC, Int6 or β -actin. **(C)** Cells were either mock-transfected (lane 1) or transfected with control siRNAs (lane 2) or two different int6 siRNAs (I6.1, lane 3 and I6.3, lane 4). 72 h after transfection, lysates in SDS sample buffer were analyzed by immunoblot with antibodies to Int6, MCM7, MCM4, MCM3 and HSPC021. **(D)** Cells transfected with annealing buffer (lanes 1 and 5), control siRNAs (lanes 2 and 6), int6 siRNAs (I6.1, lanes 3 and 7) or mcm7 siRNAs (lanes 4 and 8) were collected 72 h after transfection and separated into non-chromatin (NC, lanes 1 to 4) and chromatin (C, lanes 5 to 8) fractions which were analyzed by immunoblot using antibodies to MCM7, Int6 or β -actin. Signals were quantified by densitometry and normalized to β -actin protein levels. The ratios with respect to cells transfected with annealing buffer are indicated on the graph below immunoblots and represent the mean of two different experiments.

FIGURE 6

Int6 is necessary for MCM7 stability during S phase. **(A)** Schematic representation of HeLa cells synchronization at G1/S transition by double thymidine block performed after siRNA transfection (see materials and methods). **(B)** Lysates of cells harvested at 2, 3, 4, 6 or 10 h

after thymidine release were immunoprecipitated with an antibody to MCM7. Signal corresponding to ^{35}S -labeled MCM7 was detected using a phosphorimager and normalized with respect to amount of total immunoprecipitated MCM7 detected by immunoblot. Means of corresponding values obtained from three independent experiments, expressed as ratio with respect to time 0, were plotted against time. **(C)** HeLa cells transfected with control or int6 siRNAs were harvested at 0, 2, 4, 6 or 8 h after thymidine release and fractionated into non-chromatin (NC) and chromatin (C) fractions which were analyzed by immunoblot with antibodies directed against MCM7, MCM6, Int6, ORC2, RRM2 and β -actin as indicated. **(D)** MCM7 and ORC2 chromatin fraction signals of two independent experiments were quantified and means of the MCM7 signal normalized with respect to the ORC2 signal are represented as ratios with respect to time 0 for control (black bars) and I6.1 siRNAs (light grey bars).

FIGURE 7

Proteasome blockade inhibits MCM7 unloading from chromatin during S phase. **(A)** HeLa cells synchronized by a double thymidine block were mock-treated or treated with 20 μM MG132 1 h after thymidine release. Cells were collected at 0, 3, 6 and 9 h after block release and separated in non-chromatin and chromatin fractions which were analyzed by immunoblot using antibodies to MCM7 and to β -actin. **(B)** Immunoblots from (A) were analyzed by densitometry and MCM7 signals normalized with respect to β -actin were plotted against time as ratios with respect to time 0. **(C)** For each time point of the experiment an aliquot of cells was subjected to flow cytometry analysis. Data were analyzed for DNA content (2N, >2N and <4N, and 4N).

FIGURE 8

Int6 silencing increases *mcm7* transcription. **(A)** Immunoblot analysis of MCM7 in whole cell extracts from synchronized cells transfected with control or *int6* siRNAs. Signals were quantified by densitometry and data expressed as ratio with respect to the value obtained for control siRNAs at time 2 h after thymidine block release. **(B)** HeLa cells transfected with control or I6.1 siRNAs were synchronized by a double thymidine block and harvested 0, 2, 4, 6 or 8 h after thymidine release. Total RNAs were extracted and *mcm4*, *mcm6* and *mcm7* mRNAs were quantified by quantitative RT-PCR. Ratios of their amounts in Int6-silenced versus control cells, calculated from three different experiments, are represented at the different time points.

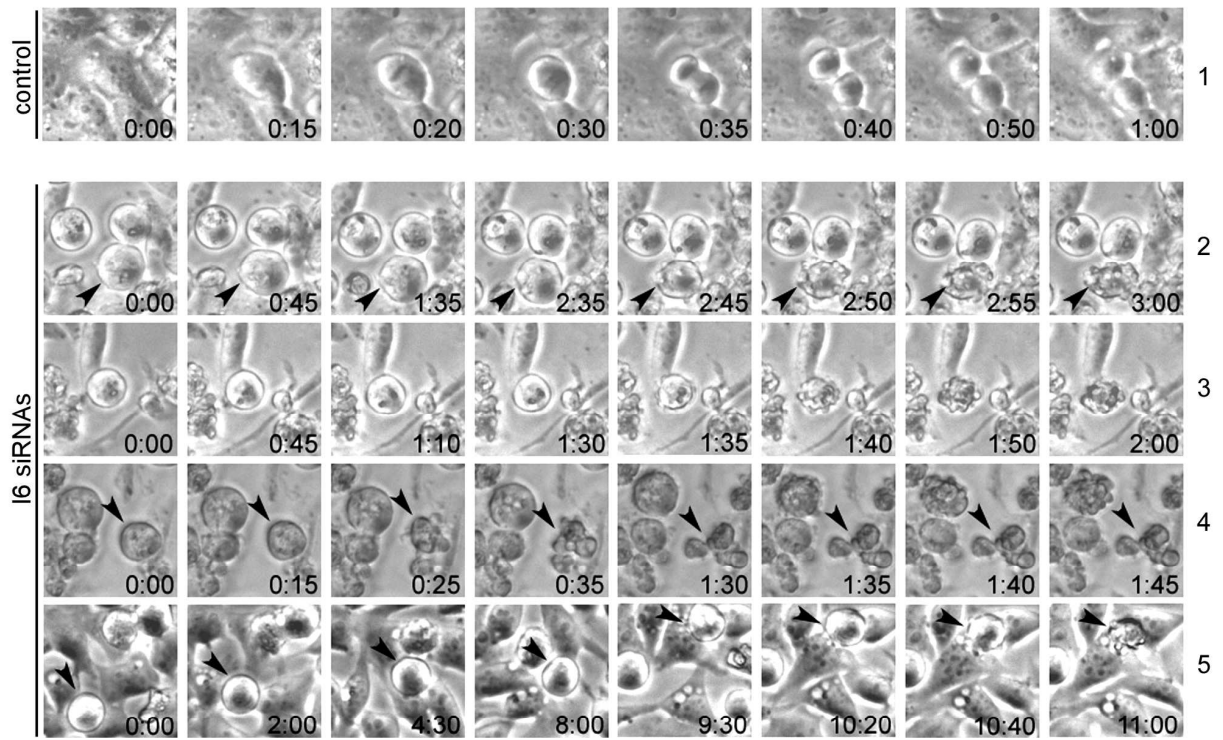
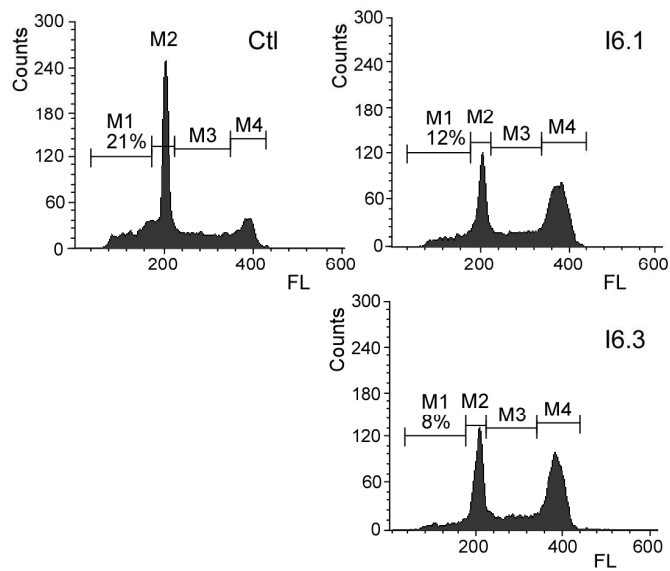
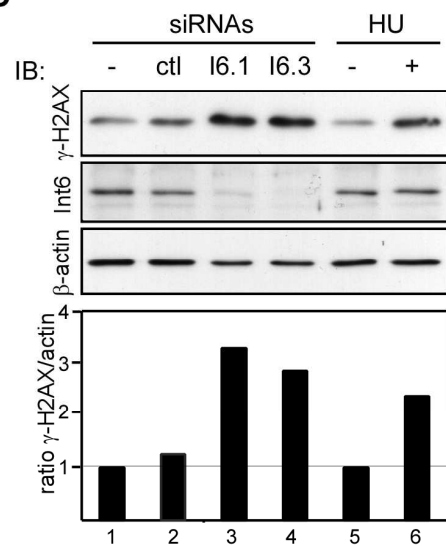
FIGURE 9

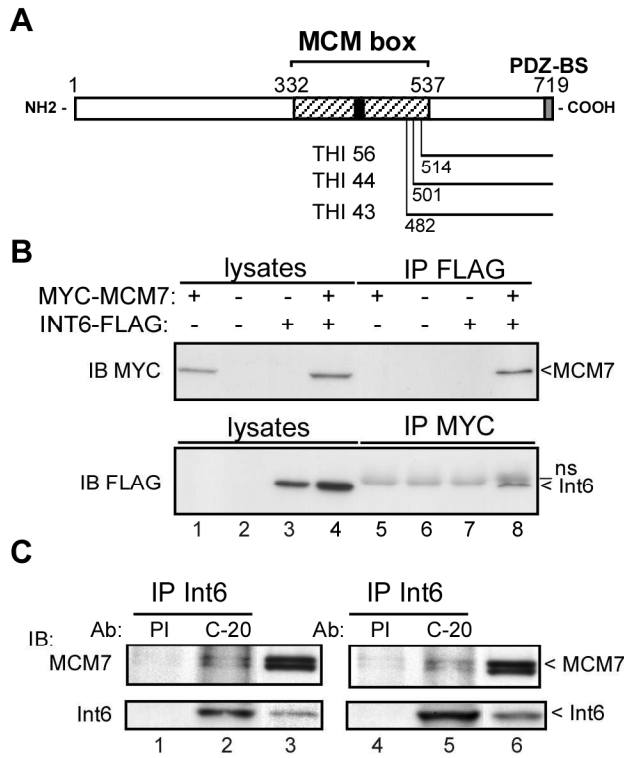
Int6 silencing triggers replication defects. **(A)** HeLa cells were transfected with control, I6.1 or *mcm7* siRNAs, synchronized at the G1/S transition by a double thymidine block and incubated for 2, 4, 6 or 8 h with ³H-Thymidine (see materials and methods). Lysates radioactivity was normalized by protein concentration and the mean of three different experiments was plotted against time (control: circles, *mcm7* siRNAs: open circles, *int6* siRNAs: open squares). **(B)** Synchronized cells transfected with control or *mcm7* siRNAs as indicated were collected at times 0, 4 h and 8 h after block release. Immunoblot analysis was carried out with antibodies to MCM7 and to β -actin. **(C)** Experiment was performed as described for (B) except that cells were transfected with control or I6.1 siRNAs.

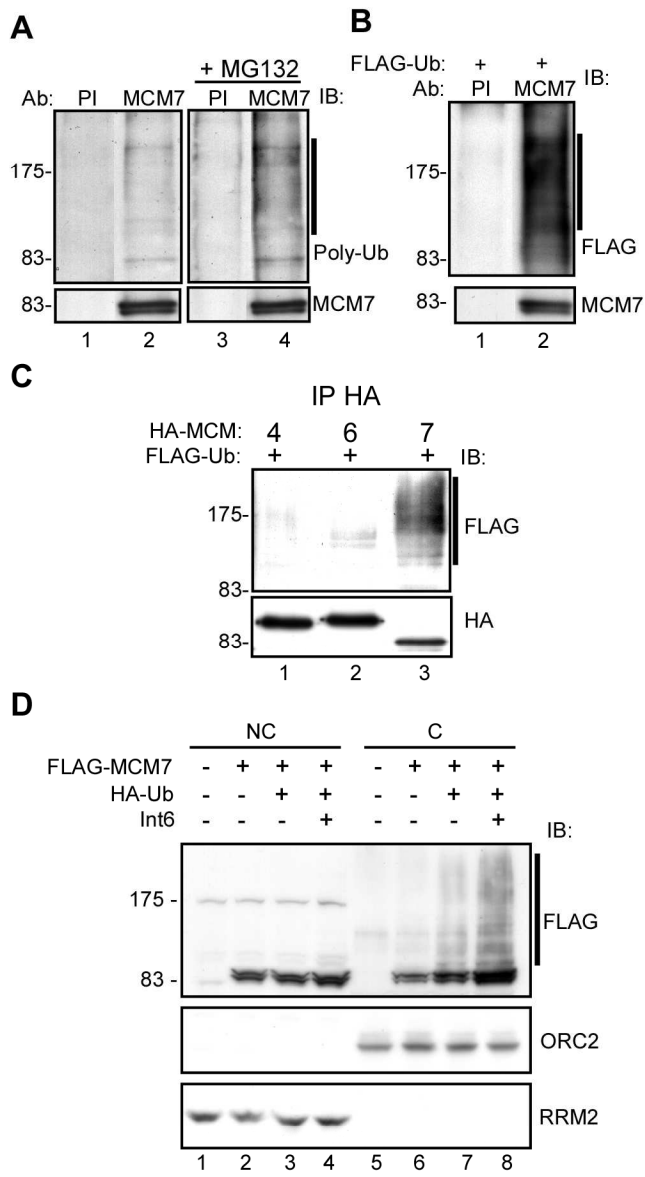
FIGURE 10

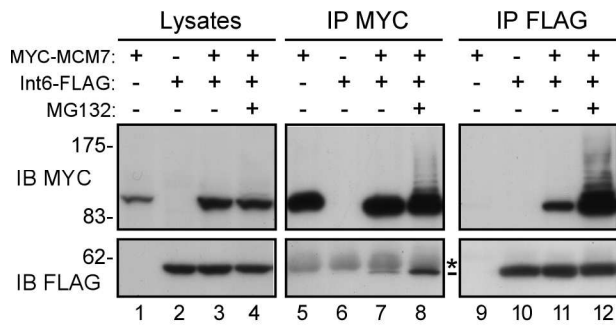
Int6 silencing correlates with replication stress marks **(A)** HeLa cells were either mock-transfected or transfected with control, I6.1 or *mcm7* siRNAs, and fractionated into non-

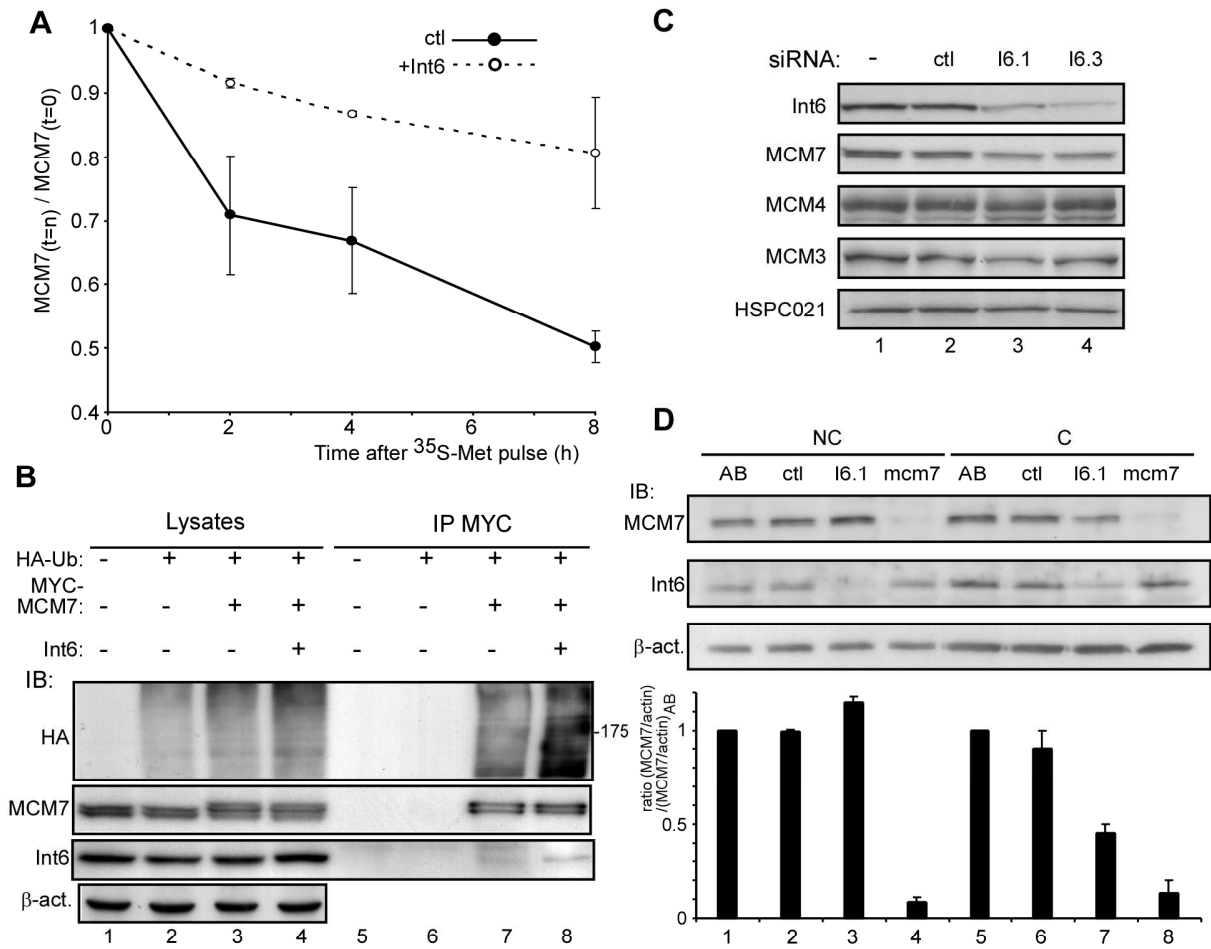
chromatin and chromatin fractions which were analyzed by immunoblot with antibodies to MCM7 and to RPA1. Corresponding signals were quantified and ratios of chromatin versus non chromatin signals for MCM7 (black bars) and RPA1 (grey bars) in Int6-silenced cells were divided by that corresponding to mock-transfected cells (A). **(B)** HeLa cells were transfected with control , I6.1 and mcm7 siRNAs, as indicated. Non-chromatin and chromatin fractions were analyzed by immunoblot with antibodies to claspin and to β -actin.

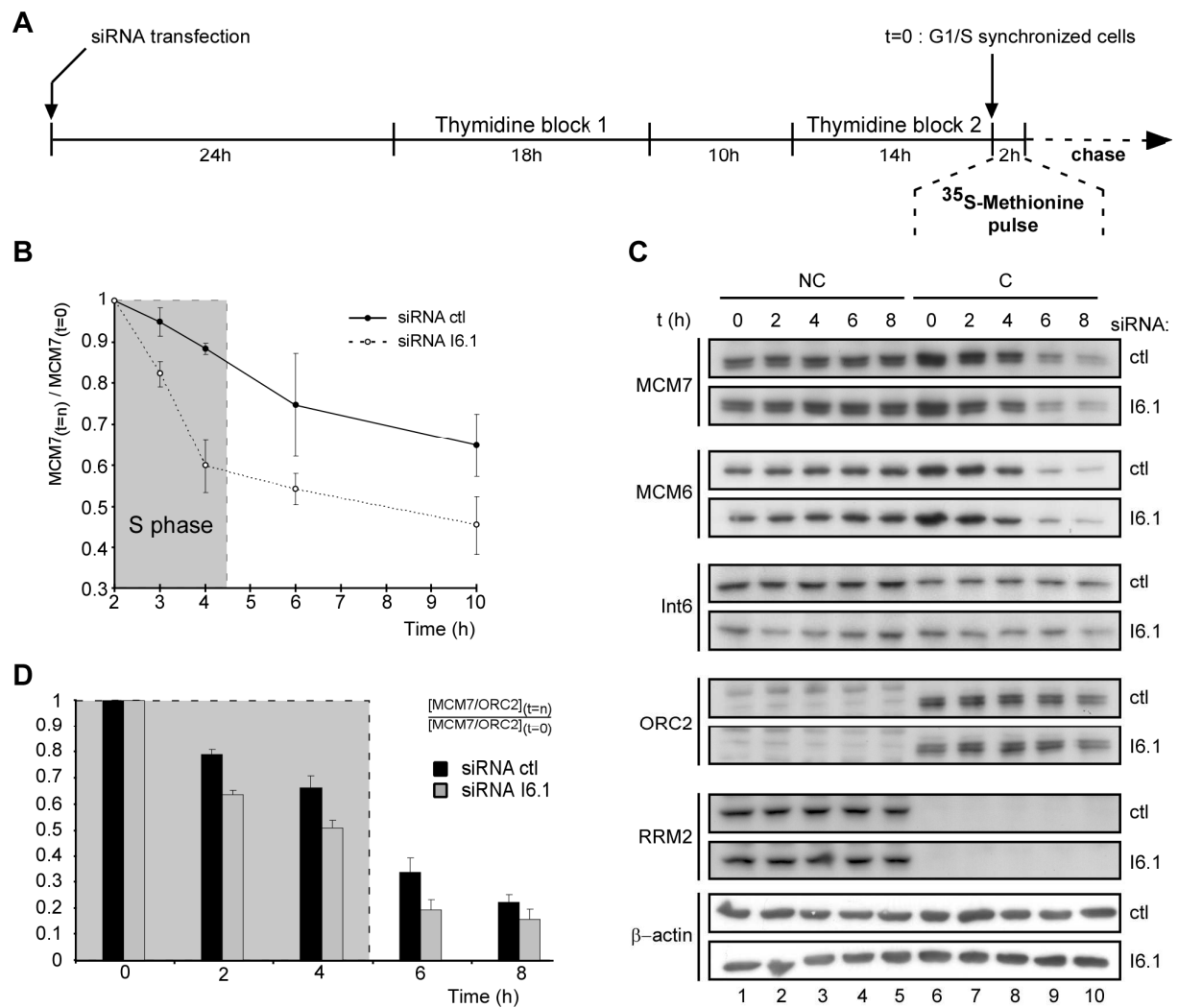
A**B****C**

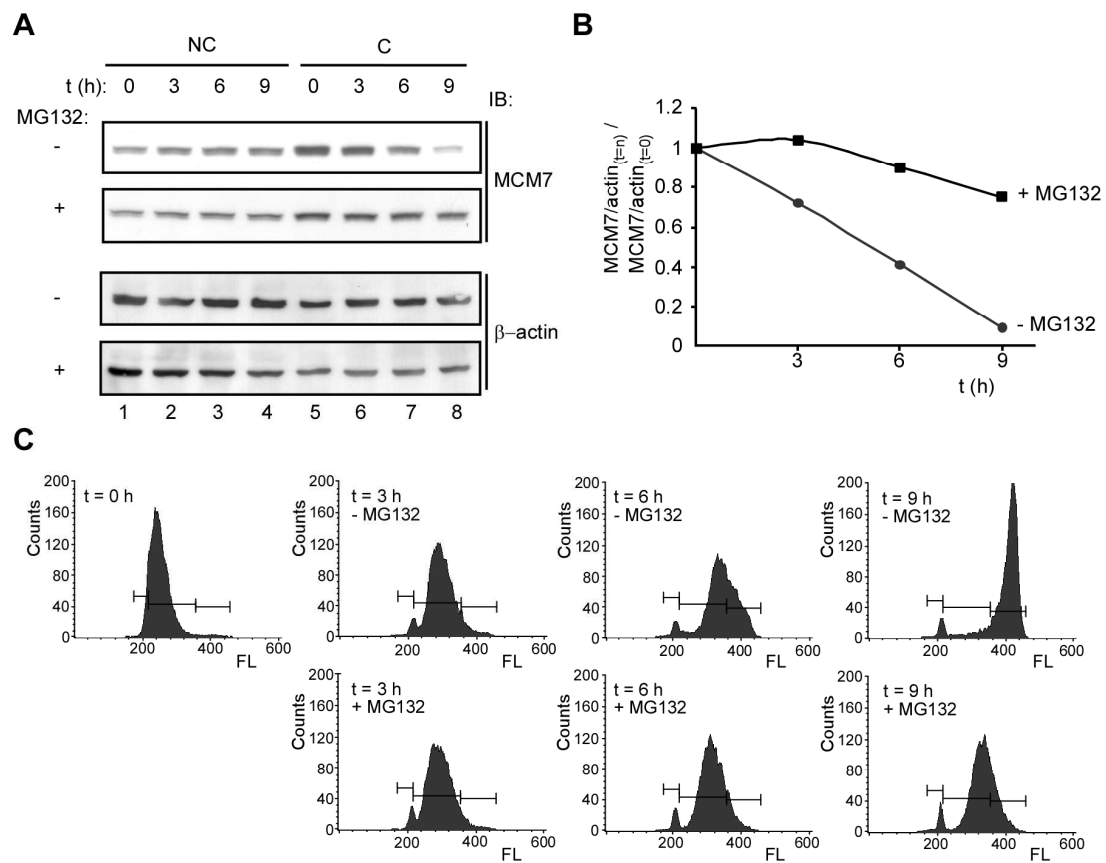


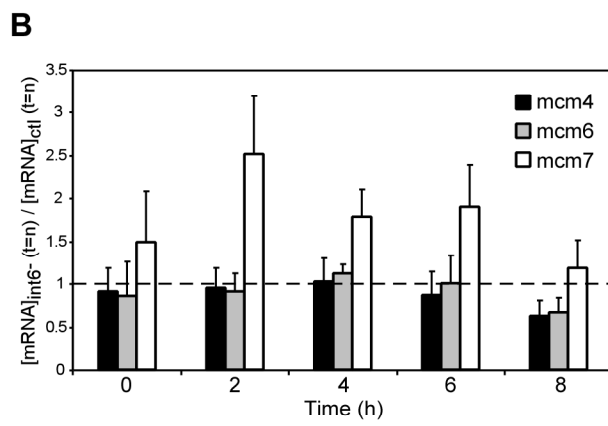
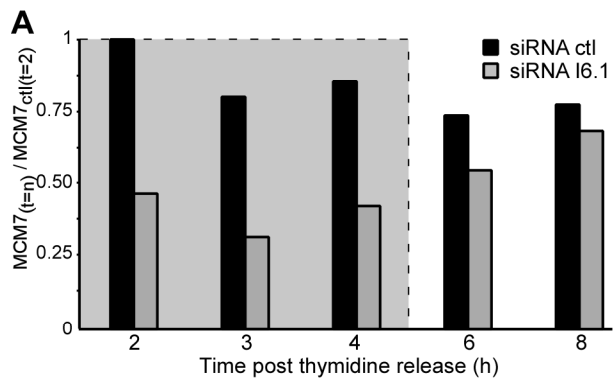


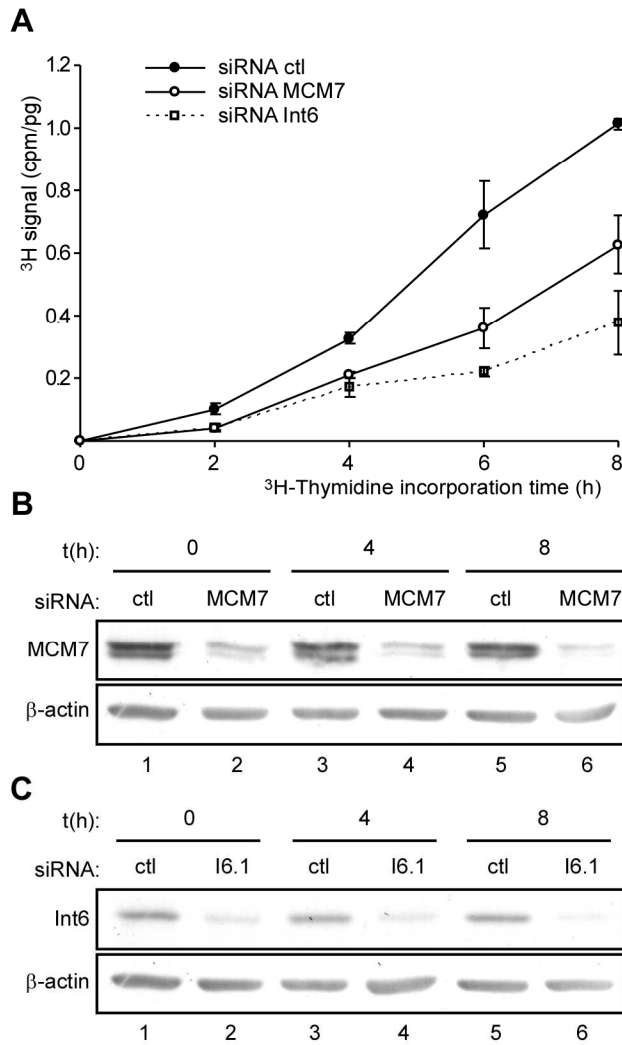




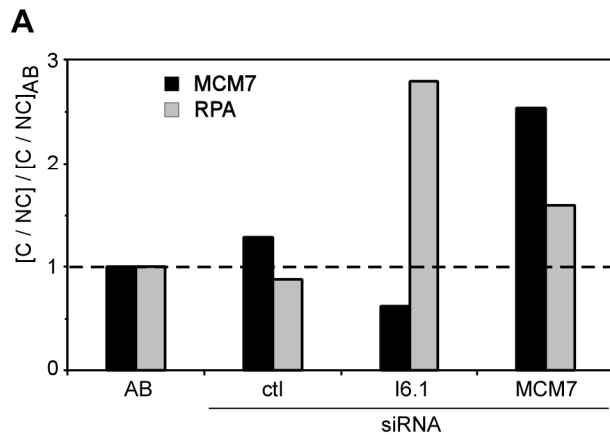




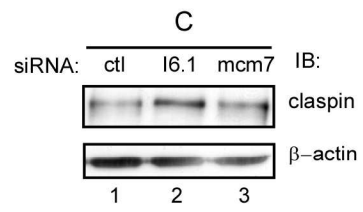




Buchsbaum et al. / Figure 9



B



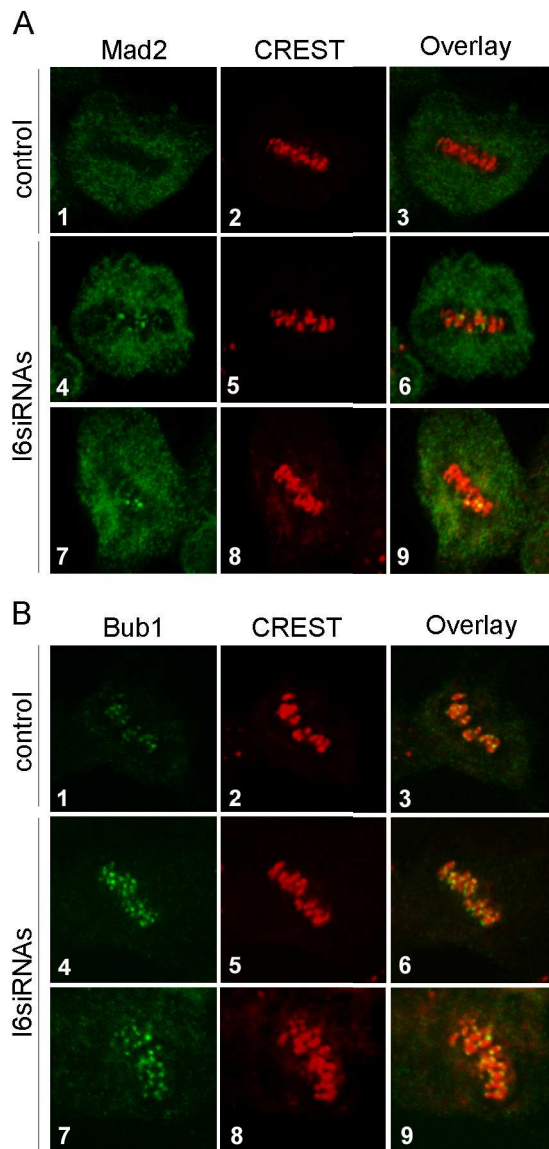


Figure S1: Silencing of *Int6* induces activation of the spindle checkpoint. Control and *Int6*-depleted cells were processed for immunofluorescence and confocal imaging as previously described (Morris and Jalinet, 2005). The CREST serum, kindly provided by G. Chyderiotis, was used at 1:1000 dilution; the antiserum to Mad2 (Babco) at 1:100, and the antibody to Bub1 (Chemicon) at 1:100. As compared to control cells where Mad2 is no more localized to kinetochores upon chromosome alignment (panel A, images 1 to 3), *Int6*-silenced cells arrested in metaphase showed persistence of Mad2 at some kinetochores (panel A, images 4 to 9). These arrested cells also showed a more intense Bub1 staining (panel B, images 4 and 7) than control metaphase cells (panel B, image 1).

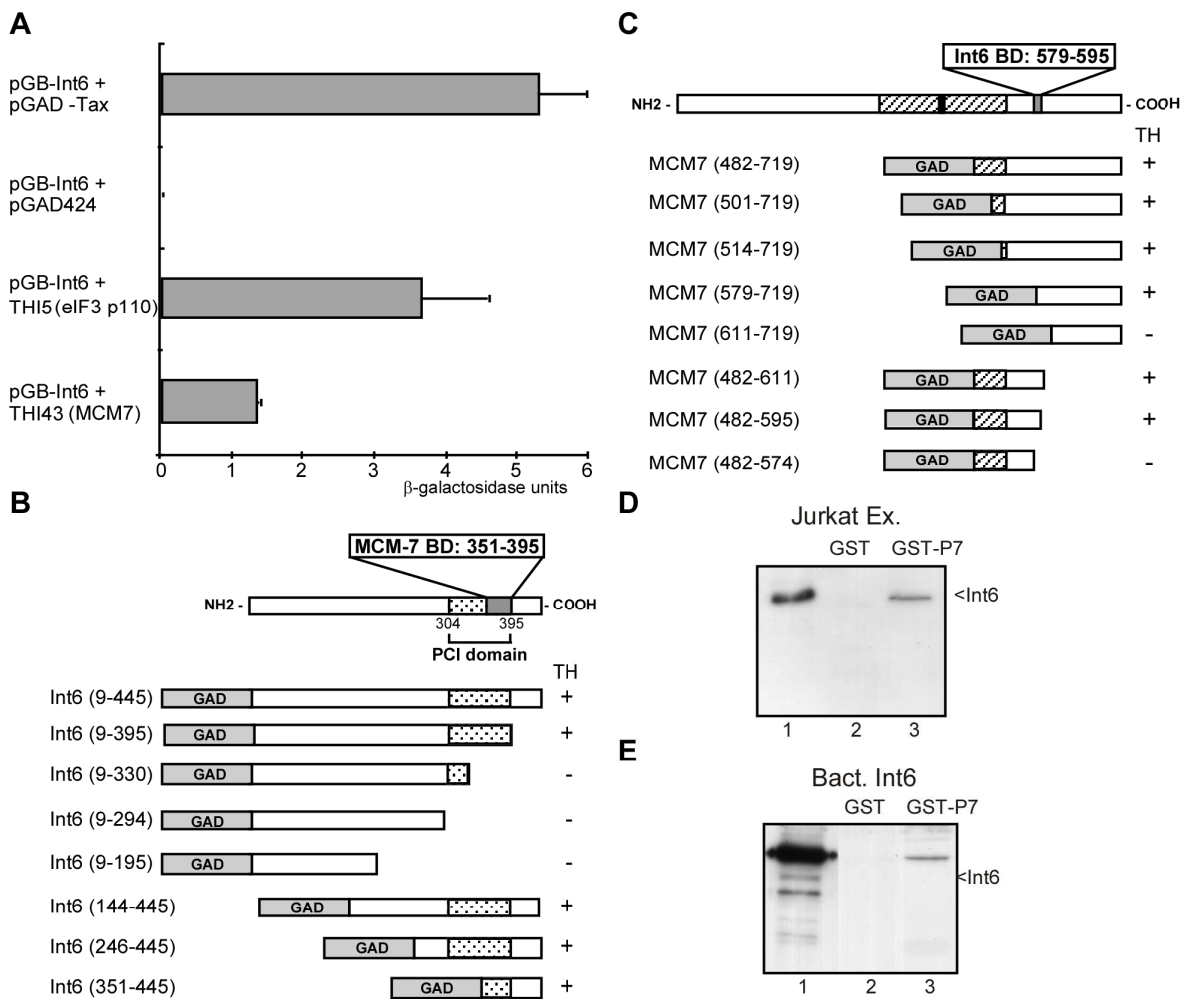


Figure S2: Characterization of the interaction between Int6 and MCM7: (A) Analysis of the interaction between Int6 and MCM7 using a liquid culture β -galactosidase assay. SFY526 yeast cells were co-transformed with the MCM7 THI 43 clone together with plasmids expressing the GAL4 DNA binding domain (GB) in fusion with Int6 (pGB-Int6). As a negative control, yeast cells were transformed with plasmids pGB-Int6 and pGAD424. As positive controls, yeast cells were transformed with plasmids pGB-Int6 together with either pGAD-Tax or the eIF3p110 clone THI5 (Morris-Desbois et al., 1999). The β -galactosidase assay was carried out on two independent colonies per transformation and the mean values are shown as expressed in Miller units. (B) Effect of N-terminal and C-terminal deletions of Int6 on the interaction with MCM7. Schematic representation of the Int6 deletion mutants: the PCI domain is shown as a dotted box, and the MCM7 binding domain (MCM7 BD, grey box) is delimited. All mutants were fused at their 5' end to the sequence coding for GAD. Results of the β -galactosidase filter assays are given on the right (TH), + indicates blue colonies, - indicates white colonies. (C) Effect of N-terminal and C-terminal deletions of MCM7 on the interaction with Int6. Schematic representation of the MCM7 deletion mutants: MCM box is shown as a hatched box, the ATPase motif as a black box, and the Int6 binding domain (Int6 BD, grey box) is delimited. All mutants were fused at their 5' end to the sequence coding for GAD. Results of the β -galactosidase filter assays are given as in (B). (D) Whole cell extract of Jurkat cells (lane 1) was loaded onto a column coupled either to GST (lane 2) or to GST fused to a peptide motif corresponding to amino acids 570 to 601 of MCM7 (GST-P7) (lane 3). Proteins eluted by glutathione were separated by SDS-PAGE and presence of Int6 was examined by immunoblot. Position of the signal corresponding to Int6 is indicated. (E) The experiment was performed as in (D) except that an (His)₆-Int6 protein produced in bacteria and purified to homogeneity was used instead of the Jurkat whole cell extract.

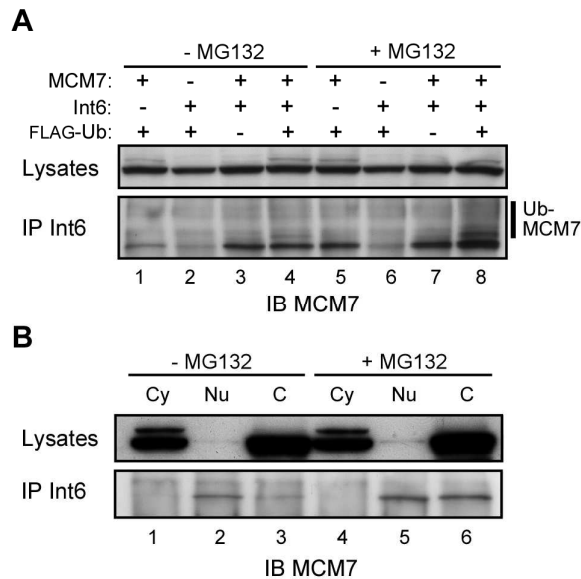


Figure S3:(A) HeLa cells were transfected with various combinations of pTL1-MCM7, pTL1-Int6 and pSGF-Ub (1 μ g each), as indicated, and either treated (lanes 5-8) or not (lanes 1-4) with 10 μ M MG132 for 3 h. Immunoprecipitation was done using an antibody to Int6 and immunoblot analysis of MCM7 in lysates (top panel) and in immunoprecipitates (bottom panel) is shown. Position of bands corresponding to polyubiquitinated MCM7 is indicated. (B) Mock-treated (lanes 1-3) or MG132-treated (20 μ M, 6 h, lanes 4 to 6) Jurkat cells were separated into cytoplasmic (lanes 1 and 4), nucleoplasmic (lanes 2 and 5) and chromatin (lanes 3 and 6) fractions. This fractionation was performed as follows: 6×10^7 Jurkat cells were incubated in 1 ml buffer A (340 mM sucrose; 10% glycerol; 10 mM Hepes pH 7.5 ;10 mM KCl; 1.5 mM MgCl₂; 0.1% Triton; 1 mM DTT) containing protease inhibitors (Complete, Roche) for 5 min on ice. The cytoplasmic fraction was separated by centrifugation for 4 min at 1,300 g. Nuclei were incubated for 30 min on ice in 300 μ l buffer B (3 mM EDTA; 0.2 mM EGTA; 1 mM DTT). The nucleoplasmic fraction was separated by centrifugation for 4 min at 1,800g. Chromatin was washed with 300 μ l buffer B and sonicated in 300 μ l RIPA buffer without SDS by 3 pulses of 15 s using a Vibra-Cell sonicator (Sonics and Materials Inc.). Cytoplasmic and nucleoplasmic fractions were diluted 1:4 with RIPA 4X without SDS. These fractions were used to perform immunoprecipitation with the antibody to Int6. Extracts (top panel) and immunoprecipitates (lower panel) were analyzed by immunoblot using an antibody to MCM7. The fractionation protocol used in this study gave a strong leakage of nucleoplasmic MCM7 into the cytoplasmic fraction. The propensity of MCM proteins to exit the nucleus during fractionation has already been documented (Fujita et al., 1996). Due to this leakage, MCM7 was essentially detected in the cytoplasmic and chromatin fractions, and weakly in the nucleoplasm (Figure 4C, upper panel).

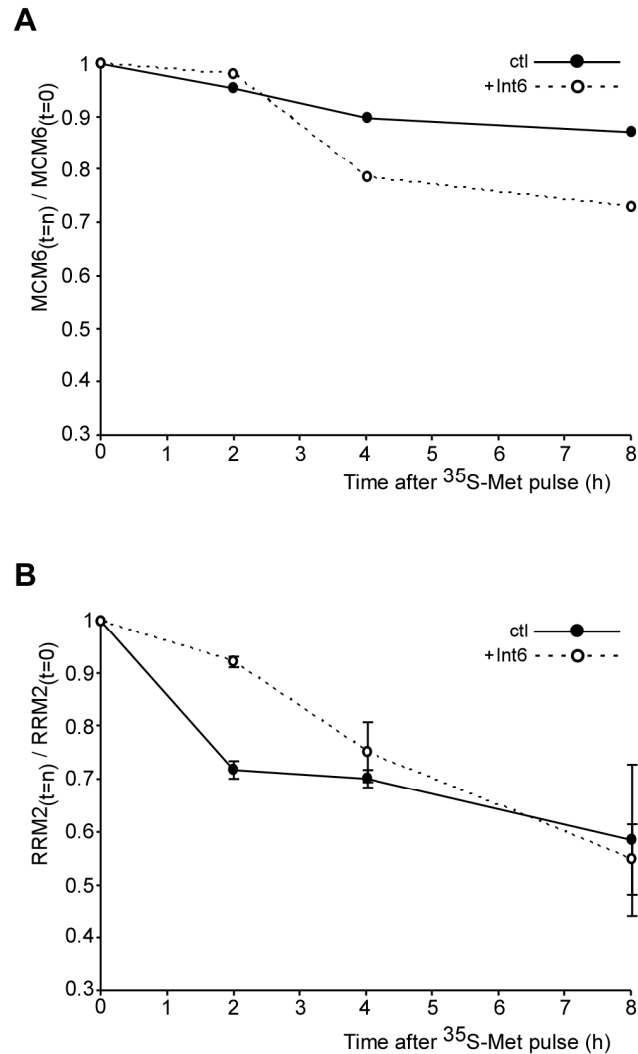


Figure S4: Effect of Int6 overexpression on stability of MCM6 and RRM2. (A) 293T cells transfected with 2 μ g of the empty pTL1 expression vector or of pTL1-Int6 were pulsed for 45 min with ³⁵S-Methionine (100 μ Ci/ml). Cells were harvested at times 0, 2, 4 and 8 h after pulse and corresponding lysates were used for immunoprecipitation with an antibody to MCM6. Labeled MCM6 was detected using a phosphorimager and total immunoprecipitated MCM6 was analyzed by immunoblot. Corresponding signals were quantified using the ImageQuant software. The amount of labeled MCM6 was normalized with respect to the amount of total MCM6 immunoprecipitated for each point. Corresponding values expressed as ratios with respect to the first time point were plotted against time. (B) Experimental procedure was as for (A) except that an antibody directed against RRM2 was used.

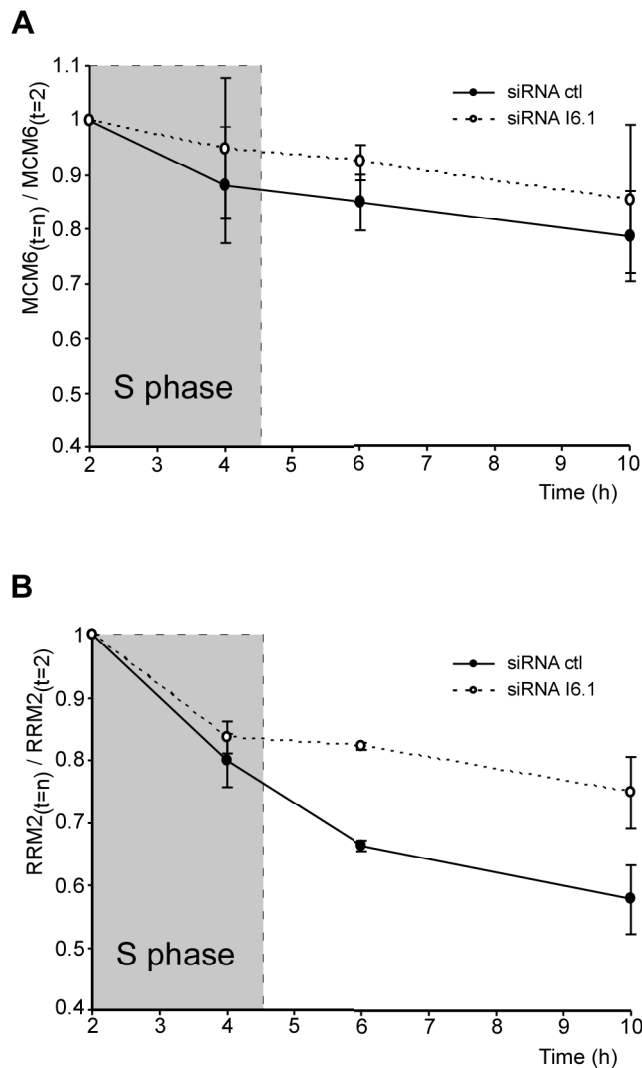


Figure S5: Analyses of MCM6 and RRM2 stability in synchronized cells silenced for Int6 (A) HeLa cells were synchronized by double thymidine block performed after control and int6 siRNA transfection. Following release from the second block, cells were pulsed for 2 h with ^{35}S -Methionine (150 $\mu\text{Ci/ml}$), washed, incubated with normal medium and harvested at 2, 4, 6 and 10 h after start of ^{35}S -Methionine labeling. Lysates were immunoprecipitated with antibodies to MCM6. Labeled MCM6 was detected using a phosphorimager and total immunoprecipitated MCM6 was analyzed by immunoblot. Corresponding signals were quantified using the ImageQuant software. The amount of labeled MCM6 was normalized with respect to the amount of total MCM6 immunoprecipitated for each point. Corresponding values expressed as ratios with respect to the first time point were plotted against time. (B) Experimental procedure was performed as for (A), except that an antibody to RRM2 was used.

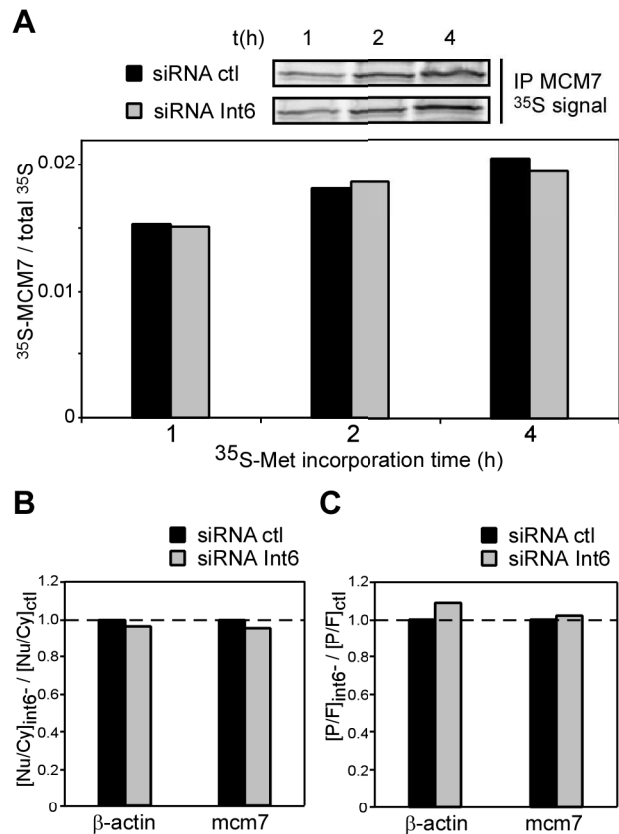


Figure S6: Int6 does not modulate translation of the *mcm7* mRNA. (A) HeLa cells either mock-transfected or transfected with the I6.1 siRNA duplex were incubated with ³⁵S-Methionine for 1, 2 or 4 h. Whole cell extracts were used for immunoprecipitation with an antibody to MCM7 and the ³⁵S-labeled MCM7 was detected using a phosphorimager and quantified with ImageQuant. The ratios of the signal corresponding to ³⁵S-labeled MCM7 with respect to the radioactivity incorporated into total proteins are represented at the different times. (B) Total RNAs were extracted from nuclei and cytoplasm of control and I6.1 siRNA-transfected cells. Nucleic and cytoplasmic β -actin and *mcm7* mRNAs were quantified by quantitative RT-PCR. The ratio of nucleic with respect to cytoplasmic amounts in Int6-silenced cells was divided by that corresponding to control siRNA-transfected cells and are represented for the β -actin and *mcm7* mRNAs. (C) Cells transfected with control or I6.1 siRNA duplexes were synchronized at the G1/S transition by a double thymidine block and harvested 6 h after thymidine release. After cell lysis, polysome-associated and free RNAs were separated on a sucrose gradient. β -actin and *mcm7* mRNAs amounts in both fractions were quantified by quantitative RT-PCR. The ratios of polysome-associated versus free RNAs amounts divided by that of control siRNA-transfected cells were calculated and are represented for β -actin and *mcm7* mRNAs.

Les résultats que nous venons d'énoncer montrent qu'en régulant la dégradation de MCM7, Int6 participe au bon déroulement de la réplication. En effet, la poly-ubiquitinylation de MCM7 semble constituer un signal pour son départ de la chromatine, dépendant de sa dégradation. En interagissant avec ses formes poly-ubiquitinylées, Int6 contrôlerait le moment précis de la dégradation de MCM7, empêchant ainsi son départ prématuré de la chromatine. Le point central du processus est donc l'ubiquitinylation de MCM7, à laquelle nous nous sommes intéressés plus en détail.

IV. Résultats complémentaires sur l'ubiquitinylation de MCM7

Un paramètre important de l'ubiquitinylation d'une protéine est la lysine de l'ubiquitine utilisée pour former la chaîne de poly-ubiquitine. En effet, l'ubiquitine contient sept lysines : K6, 11, 27, 29, 33, 48 et 63. Le premier type de chaîne mis en évidence (et le mieux étudié) utilise K48 et provoque la dégradation par le protéasome de la protéine ubiquitinylée. Une autre lysine de l'ubiquitine fréquemment utilisée est K63, formant des chaînes à vocation régulatrice et non dégradative. Plus récemment, des chaînes d'ubiquitines reliées par leur lysine 6 ou 29 ont été mises en évidence. Très peu de données existent concernant les lysines 11, 27 et 33, mais une étude spectrométrique dans la levure a montré qu'*in vivo*, tous les types de chaînes existent, avec des abondances diverses (Peng et al., 2003). Nous avons d'ailleurs montré au sein du laboratoire que la protéine Rev de HIV peut être poly-ubiquitinylée via la lysine 33 de l'ubiquitine (cf. publication n°2 en annexe I).

Concernant MCM7, nous nous attendions à montrer l'existence de chaînes d'ubiquitines reliées par K48, car nos résultats évoquent que la dégradation de MCM7 entraîne son départ de la chromatine. MCM7 a d'ailleurs déjà été montrée comme ubiquitinylée par ce type de chaînes (Kuhne and Banks, 1998). Nous avons donc construit des vecteurs d'expression de l'ubiquitine mutée pour différentes lysines, que nous avons co-transfectés avec un vecteur d'expression de MCM7 dans des cellules 293T. Nous avons été surpris de constater que la mutation simultanée des lysines 48 et 63 de l'ubiquitine n'empêche pas l'ubiquitinylation de MCM7, bien qu'elle la diminue (non représenté). Par contre, nous avons observé que l'ubiquitinylation de MCM7 reste possible avec une forme d'ubiquitine mutée pour toutes les lysines exceptée K48 (non représenté). Cela signifie que l'ubiquitinylation de MCM7 est bel et bien possible via la lysine 48 de l'ubiquitine, mais

qu'une ubiquitinylation via une autre lysine, différente de K48 ou K63, est susceptible de se produire.

Etant donné que de nombreuses protéines du réplisome participent et à l'activation des deux points de contrôle de la phase S (intra-S et de réplication), et à la réparation de l'ADN (cf. introduction bibliographique), nous nous sommes demandés si l'ubiquitinylation de MCM7 pouvait être affectée par un stress génotoxique. Différents traitements ont été effectués :

- cisplatine (pontages inter-brins),
- hydroxyurée (déplétion des dNTP),
- radiations ionisantes (cassures double brin de l'ADN).

Les deux premiers traitements, qui induisent un blocage des fourches de réplication, n'ont eu aucun effet visible. Cela signifie que l'ubiquitinylation de MCM7 est indépendante d'un quelconque blocage des fourches de réplication. Par contre, nous avons observé qu'une dose d'irradiation de 10Gy stimule l'ubiquitinylation de MCM7. Ceci a été montré dans des cellules 293T co-transfectées par des vecteurs permettant l'expression de MCM7 et de l'ubiquitine, respectivement fusionnées à leur extrémité N-terminale avec l'étiquette FLAG

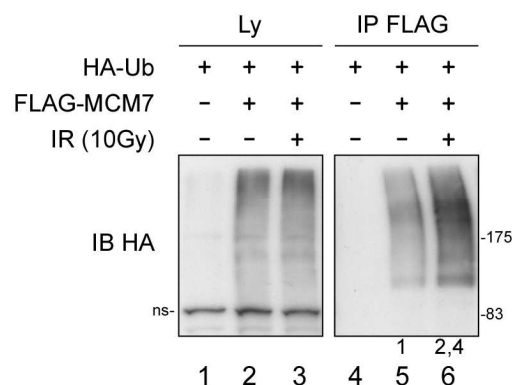


Figure 25. La présence de cassures double brin de l'ADN stimule l'ubiquitinylation de MCM7. Des cellules 293T ont été transfectées par 50ng de pSGHA-Ub en combinaison avec 1µg de pSGF-MCM7 (pistes 2, 3, 5, 6) ou de pcDNA3 (pistes 1 et 4), puis soumises (pistes 3 et 6) ou non (pistes 1,2,4,5) à une irradiation de 10Gy. Les cellules ont été lysées 3 heures après l'irradiation, et FLAG-MCM7 a été immunoprécipitée par un anticorps anti-FLAG. Les lysats et les protéines immunoprécipitées ont été analysés par immunomarquage avec un anticorps anti-HA. La position des marqueurs de poids moléculaire ayant migré en parallèle est indiquée à droite, ainsi que la position d'une bande non spécifique (ns) révélée par l'immunomarquage des lysats, servant de contrôle de charge. La quantification de l'intensité des signaux correspondant aux formes poly-ubiquitinylées de FLAG-MCM7, rapportée à celle trouvée en absence d'irradiation, est indiquée numériquement sous les pistes 5 et 6.

ou HA. Trois heures après l'irradiation, FLAG-MCM7 a été immunoprécipitée et le signal correspondant à ses formes poly-ubiquitinylées, détectées par immunomarquage avec un anticorps anti-HA, a été quantifié. Nos résultats indiquent que l'ubiquitinylation de MCM7 est multipliée par 2,4 après l'irradiation (Figure 25).

Ces observations supplémentaires confortent le rôle déjà évoqué pour MCM7 au cours de la réponse cellulaire à différents dommages de l'ADN (Cortez et al., 2004; Tsao et al., 2004). De plus, elles ouvrent une nouvelle piste dans l'étude de l'ubiquitinylation de MCM7. En effet, outre sa fonction au cours de la réplication, évoquée dans notre publication, l'ubiquitinylation de MCM7 semble intervenir en réponse à des dommages de l'ADN. Le fait que plusieurs lysines de l'ubiquitine semblent impliquées illustre la complexité d'un processus au sein duquel différents types d'ubiquitinylation de MCM7 réguleraient ses différentes fonctions.

C - IDENTIFICATION DE BRCA1 COMME UNE E3 LIGASE POTENTIELLE DE MCM7

I. Indices menant à BRCA1

Un point fondamental pour comprendre la fonction de l'ubiquitinylation d'un substrat est d'identifier l'enzyme E3 ligase qui en est responsable. Le problème principal est le nombre d'E3 ligases codées par le génome humain qui est estimé à plus de 500. Ainsi, identifier une E3 ligase pour un substrat donné peut s'avérer une tâche quasi-insurmontable si l'on ne dispose pas de quelques indications préalables.

Concernant MCM7, nous pensons que son ubiquitinylation en phase S entraîne sa dégradation, nécessaire pour son départ de la chromatine. Une étude avait déjà mis en évidence une ubiquitinylation pro-dégradative de MCM7, dépendant de la E3 ligase E6-AP (Kuhne and Banks, 1998). Les auteurs avaient attribué la fonction de cette ubiquitinylation de MCM7 à l'autorisation de la réplication, mais avaient aussi identifié une ubiquitinylation indépendante de E6-AP. L'ubiquitinylation de MCM7 que nous avons aussi observé *in vivo* pourrait être cette dernière, car elle n'intervient pas au moment de l'autorisation mais au cours de la réplication. De plus, plusieurs de nos observations laissent penser qu'une autre E3 ligase intervient :

- l'ubiquitinylation de MCM7 aurait lieu sur la chromatine,
- l'ubiquitinylation de MCM7 peut se faire avec des mutants de l'ubiquitine dépourvus des lysines 48 et 63,
- l'ubiquitinylation de MCM7 est stimulée par une irradiation, c'est-à-dire par des dommages à l'ADN.

Une E3 ligase connue regroupant ces trois particularités nous est venue à l'esprit : BRCA1. En effet, celle-ci est fortement exprimée en phase S, répond aux dommages de l'ADN où elle s'accumule, et catalyse la formation de chaînes d'ubiquitine non pas via la lysine 48 ou 63, mais via la lysine 6. De plus, aucun substrat de l'activité E3 ligase potentielle de BRCA1 n'a encore été identifié *in vivo*, les seuls connus l'ayant été *in vitro*. La piste de BRCA1 comme E3 ligase de MCM7 nous a donc paru encore plus intéressante à explorer.

II. BRCA1 interagit avec MCM7

1. Mise en évidence de l'interaction BRCA1 - MCM7

Dans le cas où BRCA1 serait capable de catalyser la poly-ubiquitinylation de MCM7, une interaction entre les deux protéines devrait être visible. Nous avons donc testé cette interaction dans deux lignées cellulaires différentes. L'immunoprécipitation de MCM7 endogène entraîne la co-immunoprécipitation de BRCA1 dans des cellules 293T (Figure 26A) et HeLa (non représenté). L'obtention du même résultat dans deux lignées différentes milite pour une interaction *in vivo* entre BRCA1 et MCM7. Il sera cependant important de confirmer cette interaction dans une lignée cellulaire mammaire, constituant un meilleur modèle pour l'étude de BRCA1.

Nous avons ensuite étudié l'interaction entre MCM7 et la moitié N-terminale de BRCA1 (BRCA1-NT), car cette partie de la protéine contient le domaine RING Finger et est nécessaire et suffisante pour assurer l'ubiquitinylation des substrats *in vitro* (Ruffner et al., 2001). La surexpression dans des cellules 293T de BRCA1-NT et de MCM7 respectivement fusionnées aux étiquettes MYC et FLAG, suivie d'une immunoprécipitation de BRCA1-NT par un anticorps anti-MYC, montre qu'il existe bien une interaction entre MCM7 et la moitié

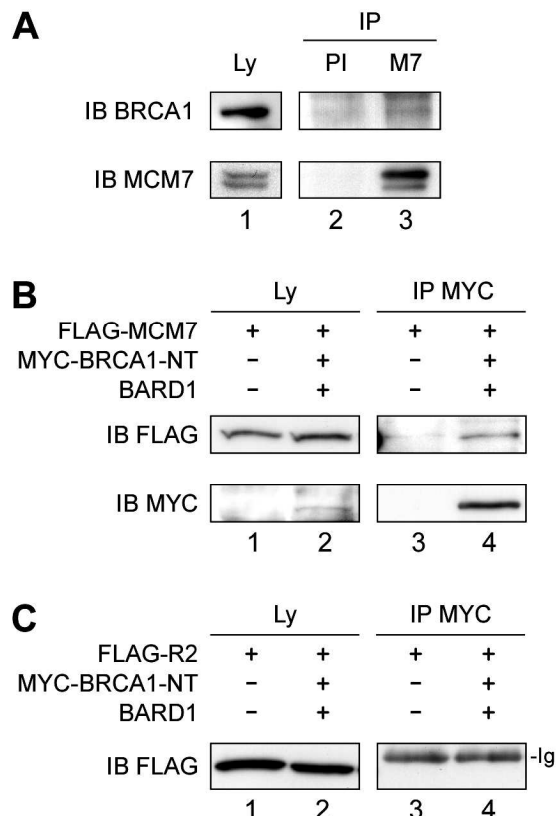


Figure 26. BRCA1 interagit avec MCM7. (A) Un lysat de cellules 293T a été immunoprécipité avec du sérum pré-immun (piste 2) ou un anticorps anti-MCM7 (piste 3). Les protéines immunoprécipitées et le lysat (piste 1) ont été analysés par un immunomarquage avec des anticorps anti-BRCA1 (panneau du haut) et anti-MCM7 (panneau du bas). (B) Des lysats de cellules 293T transfectées par 2µg de pSGF-MCM7 en combinaison avec 4 µg de pcDNA3 (pistes 1 et 3) ou 2µg de pcDNA3-mycBRCA1-NT et 2µg de pcDNA3-BARD1 (pistes 2 et 4) ont été immunoprécipités avec un anticorps anti-MYC. Les lysats (pistes 1 et 2) et les protéines immunoprécipitées (pistes 3 et 4) ont été analysées par immunomarquage avec des anticorps anti-FLAG (panneau du haut) et anti-MYC (panneau du bas). (C) Même expérience qu'en (B), à l'exception que pSGF-MCM7 a été remplacé par pSGF-R2.

N-terminale de BRCA1 (Figure 26B). Etant donné le fort niveau de surexpression dans les cellules 293T, nous avons voulu écarter l'éventualité d'une simple agrégation des protéines mimant leur interaction. Nous avons donc répété la même expérience en remplaçant FLAG-MCM7 par FLAG-R2, mais dans ce cas aucune co-immunoprécipitation de FLAG-R2 et MYC-BRCA1-NT n'a été mise en évidence (Figure 26C).

2. BARD1 renforce l'interaction BRCA1 - MCM7

Il est établi que la protéine BARD1 s'associe à BRCA1 via son domaine RING Finger. Cette interaction stabilise BRCA1 et est donc nécessaire à sa pleine activité E3 ligase. (cf. chapitre 1, D). Un changement de structure de BRCA1 associée à BARD1 est envisageable, qui pourrait modifier sa capacité à interagir avec MCM7. Nous avons donc testé l'effet de BARD1 sur cette interaction en surexprimant FLAG-MCM7 et MYC-BRCA1-NT, en présence ou en absence de BARD1 fusionnée à l'étiquette HA. La présence de cette dernière augmente de manière significative la précipitation de FLAG-MCM7 par un anticorps anti-MYC (Figure 27A, comparer les pistes 3 et 4). Cela signifie que BARD1 renforce l'interaction entre MCM7 et BRCA1. Par ailleurs, la co-expression de BARD1 stabilise MYC-BRCA1-NT, comme nous l'attendions (Figure 27B, C, comparer les pistes 2 et 3), mais

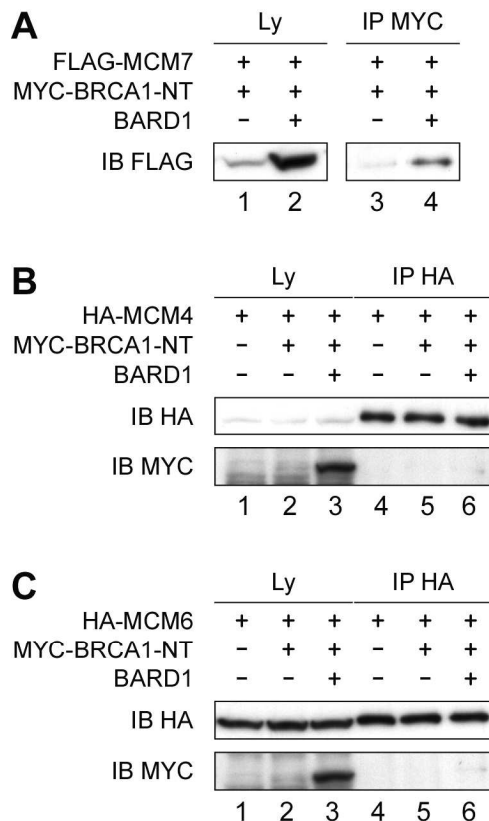


Figure 27. BARD1 renforce l'interaction BRCA1 - MCM7. (A) Des lysats de cellules 293T transfectées par 2 μ g de pSGF-MCM7 et 2 μ g de pcDNA3-mycBRCA1-NT en combinaison avec 2 μ g de pcDNA3 (pistes 1 et 3) ou 2 μ g de pcDNA3-BARD1 (pistes 2 et 4) ont été immunoprécipités avec un anticorps anti-MYC. Les lysats (pistes 1 et 2) et les protéines immunoprécipitées (pistes 3 et 4) ont été analysés par immunomarquage avec un anticorps anti-FLAG. (B, C) Des cellules 293T ont été transfectées par 2 μ g de pSGHA-MCM4 (B) ou 2 μ g de pSGHA-MCM6 (C) en combinaison avec 4 μ g de pCDNA3 (pistes 1 et 4) ou 2 μ g de pCDNA3 et 2 μ g de pcDNA3-mycBRCA1-NT (pistes 2 et 4) ou 2 μ g de pcDNA3-mycBRCA1-NT et 2 μ g de pcDNA3-BARD1 (pistes 3 et 6). Les lysats ont été immunoprécipités avec un anticorps anti-HA et analysés, comme les protéines immunoprécipitées, par immunomarquages avec des anticorps anti-HA (panneaux du haut) et anti-MYC (panneaux du bas).

aussi FLAG-MCM7 (Figure 27A, comparer les pistes 1 et 2). Ceci constitue une première indication de la fonction stabilisatrice de BRCA1-BARD1 sur MCM7.

Nous avons ensuite testé l'effet de la surexpression de BARD1 sur une éventuelle interaction entre BRCA1 et MCM4 et 6. Des cellules 293T ont été transfectées par des combinaisons de vecteurs codant pour différentes protéines: MYC-BRCA1-NT, BARD1 et HA-MCM4 ou HA-MCM6. Bien qu'efficace, l'immunoprécipitation de MCM4 et 6 par un anticorps anti-HA n'a entraîné aucune co-immunoprécipitation de MYC-BRCA1-NT (Figure 27B, C). De plus, la stabilisation de MCM7 observée en présence de BRCA1 n'est pas retrouvée pour MCM4 et 6 (Figure 27B, C, comparer les pistes 2 et 3).

3. L'inhibition du protéasome renforce l'interaction BRCA1 - MCM7

Pour finir, nous avons testé l'effet de l'ubiquitylation de MCM7 sur son interaction avec BRCA1. Des cellules 293T ont été transfectées par les vecteurs d'expression de FLAG-MCM7, MYC-BRCA1-NT et BARD1 et soumises ou non à un traitement au MG132 pour favoriser l'accumulation des formes poly-ubiquitylées de MCM7. Cette accumulation est visible suite à l'immunoprécipitation de MCM7 par un anticorps anti-FLAG (Figure 28). Ce qui est surprenant est l'association de MYC-BRCA1-NT avec FLAG-MCM7 en présence de MG132. En effet, cet inhibiteur du protéasome renforce l'interaction entre les deux protéines, et cet effet n'est pas du à une variation de leurs niveaux cellulaires (Figure 28, comparer les pistes 1 et 2). Ainsi, interférer avec la prise en charge des formes poly-ubiquitylées de MCM7 permettrait de renforcer l'interaction MCM7-BRCA1, ce qui sera discuté plus loin.

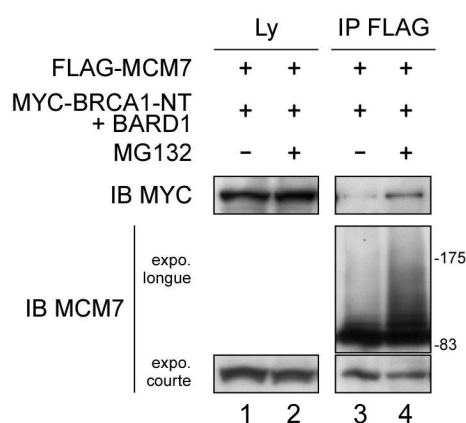


Figure 28. L'inhibition du protéasome renforce l'interaction BRCA1 - MCM7. Des cellules 293T ont été transfectées par 2 μ g de pSGF-MCM7, 2 μ g de pcDNA3-mycBRCA1-NT et 2 μ g de pcDNA3-BARD1, puis traitées (pistes 2 et 4) ou non (pistes 1 et 3) pendant 3 heures par 20 μ M de MG132. Les lysats ont été immunoprécipités et analysés, comme les protéines immunoprécipitées, par immunomarquages avec des anticorps anti-MYC (panneau du haut) et anti-MCM7 (panneau du bas). Pour l'analyse avec l'anti-MCM7, une exposition longue est montrée (panneau du milieu) et la position des marqueurs de poids moléculaire ayant migré en parallèle est indiquée.

III. BRCA1 module l'ubiquitinylation de MCM7

Au vu des résultats que nous venons d'évoquer, BRCA1 est devenue à nos yeux un candidat de plus en plus sérieux comme E3 ligase de MCM7. Il était donc logique de tester son effet éventuel sur l'ubiquitinylation de MCM7. Pour une première étude, nous avons opté pour des expériences de surexpression, étant donnée leur simplicité de mise en œuvre.

1. La présence de BRCA1 et BARD1 stimule l'ubiquitinylation de MCM7

L'ubiquitinylation de MCM7 a été étudiée dans des cellules 293T grâce à leur transfection par des vecteurs exprimant FLAG-MCM7 et HA-Ub associés ou non à des vecteurs exprimant MYC-BRCA1-NT et BARD1. Nous avons constaté que l'ubiquitinylation de FLAG-MCM7, détectée via son immunoprécipitation par un anticorps anti-FLAG suivie d'un immunomarquage par un anticorps anti-HA, est fortement stimulée par la co-expression de MYC-BRCA1-NT et BARD1 (Figure 29A, comparer les pistes 5 et 6). Ce résultat est toutefois à considérer avec prudence car la surexpression de ces deux protéines augmente

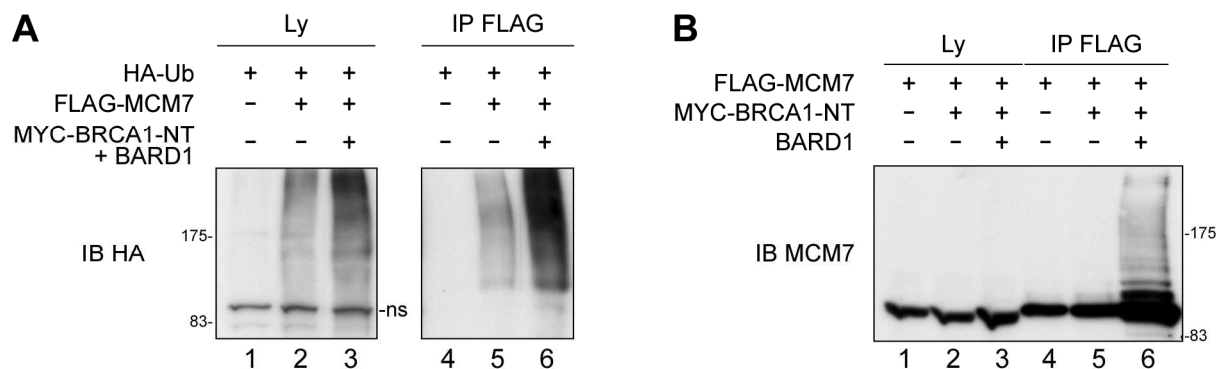


Figure 29. Le dimère BRCA1-BARD1 stimule l'ubiquitinylation de MCM7. (A) Des cellules 293T ont été transfectées par 50ng de pSGHA-Ub en combinaison avec 1,4µg de pcDNA3 (pistes 1 et 3) ou 1µg de pSGF-MCM7 et 0,4µg de pcDNA3 (pistes 2 et 5) ou 1µg de pSGF-MCM7, 0,2µg de pcDNA3-mycBRCA1-NT et 0,2µg de pcDNA3-BARD1 (pistes 3 et 6). Les lysats ont été immunoprécipités et analysés, comme les protéines immunoprécipitées, par immunomarquage avec un anticorps anti-HA. La position des marqueurs de poids moléculaire ayant migré en parallèle est indiquée à gauche, ainsi que la position d'une bande non spécifique (ns) révélée par l'immunomarquage des lysats, servant de contrôle de charge. (B) Des cellules 293T ont été transfectées par 2µg de pSGF-MCM7 en combinaison avec 4µg de pcDNA3 (pistes 1 et 4) ou 2µg de pcDNA3-mycBRCA1-NT et 2µg de pcDNA3-BARD1 (pistes 3 et 6). Les lysats ont été immunoprécipités avec un anticorps anti-FLAG et analysés, comme les protéines immunoprécipitées, par immunomarcages avec un anticorps anti-MCM7. La position des marqueurs de poids moléculaire ayant migré en parallèle est indiquée.

aussi le niveau total d'ubiquitylation dans la cellule (Figure 29A, comparer les pistes 2 et 3). Il faut donc comparer le rapport entre les signaux révélés par l'immunomarquage anti-HA dans les immunoprécipitations et les lysats, qui correspond à l'ubiquitylation spécifique à FLAG-MCM7 par rapport aux autres protéines. Une quantification densitométrique indique que ce rapport augmente avec la surexpression de BRCA1-NT et BARD1. La même expérience a été réalisée en remplaçant FLAG-MCM7 par FLAG-R2. Dans ce cas, la surexpression de MYC-BRCA1-NT et BARD1 n'a eu aucun effet (non représenté).

Afin de compléter ces observations, nous avons étudié l'ubiquitylation de MCM7 dans les mêmes conditions, mais sans surexprimer l'ubiquitine. Là encore, elle augmente en présence de BRCA1-NT et BARD1, mais pas en présence de BRCA1-NT seule (Figure 29B). Ainsi, c'est bien le dimère BRCA1-BARD1 qui stimule l'ubiquitylation de MCM7, et non BRCA1 seule.

2. BRCA1 stimule l'ubiquitylation de MCM7 sur la chromatine, mais ne modifie pas sa localisation subcellulaire

Nous avons vu précédemment que l'ubiquitylation de MCM7 pouvait constituer, en phase S, un signal pour son départ de la chromatine. Nous nous sommes donc demandés si l'ubiquitylation de MCM7, via le dimère BRCA1-BARD1, pouvait affecter son abondance sur la chromatine. Des cellules surexprimant FLAG-MCM7 en absence ou en présence de MYC-BRCA1-NT et BARD1 ont été séparées en fractions non chromatiniennes et chromatiniennes. Ces fractions ont ensuite été analysées par un immunomarquage avec un anticorps anti-FLAG (Figure 30A). FLAG-MCM7 est majoritaire dans les fractions non chromatiniennes. Le faible niveau d'expression donné par le vecteur pSGF-MCM7 quand il est transfecté seul (pour des raisons que nous ne parvenons pas à expliquer) nécessite d'analyser une grande quantité de matériel protéique pour détecter FLAG-MCM7 dans la fraction chromatinienne. Pour des raisons de clareté, l'expérience représentée ici a été réalisée à partir d'une quantité de matériel plus faible, ce qui explique que FLAG-MCM7 ne soit quasiment pas visible dans la piste 4. La stabilisation de FLAG-MCM7 par BRCA1 déjà évoquée plus haut est retrouvée ici, indépendamment de la fraction considérée ; le rapport entre les quantités de FLAG-MCM7 présente sur ou en dehors de la chromatine ne varie pas. Par contre, on constate que les formes ubiquitylées de MCM7 qui s'accumulent en présence de BRCA1-NT et BARD1 sont principalement détectées dans la fraction chromatinienne (Figure 30A, piste 6).

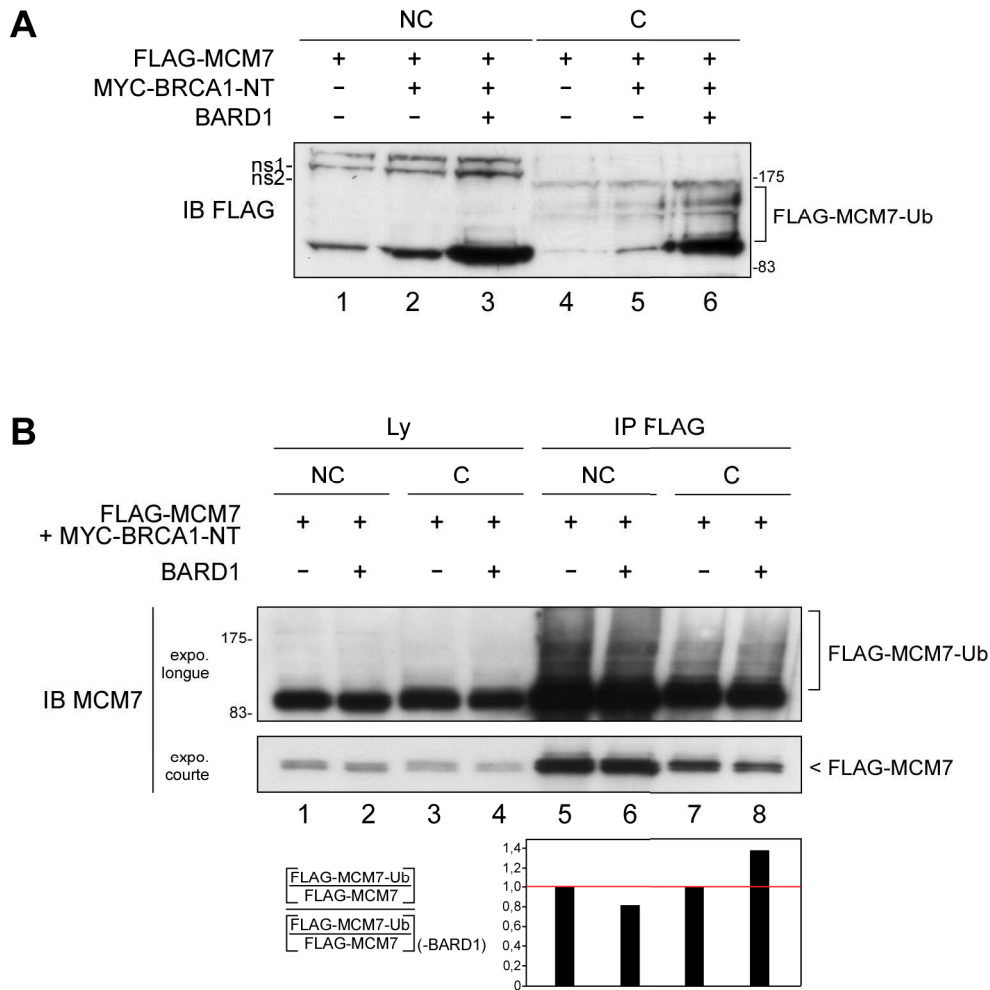


Figure 30. Le dimère BRCA1-BARD1 stimule l'ubiquitinylation de MCM7 sur la chromatine. (A) Des cellules 293T ont été transfectées par 2 μ g de pSGF-MCM7 en combinaison avec 4 μ g de pCDNA3 (pistes 1 et 4) ou 2 μ g de pcDNA3-mycBRCA1-NT et 2 μ g de pcDNA3 (pistes 2 et 4) ou 2 μ g de pcDNA3-mycBRCA1-NT et 2 μ g de pcDNA3-BARD1 (pistes 3 et 6). Les cellules ont été séparées en fractions chromatiniennes (C, pistes 4 à 6) et non chromatiniennes (NC, pistes 1 à 3), dont 20 μ g ont été analysés par immunomarquage avec un anticorps anti-FLAG. La position des marqueurs de poids moléculaire ayant migré en parallèle est indiquée, de même que celle de bandes non spécifiques apparaissant dans les fractions NC (ns1) et C (ns2). (B) Des cellules 293T ont été transfectées par 2 μ g de pSGF-MCM7 et 2 μ g de pcDNA3-mycBRCA1-NT en combinaison avec 2 μ g de pcDNA3 (pistes 1, 3, 5 et 7) ou 2 μ g de pcDNA3-BARD1 (pistes 2, 4, 6 et 8), puis séparées en fractions chromatiniennes (C, pistes 3, 4, 7 et 8) et non chromatiniennes (NC, pistes 1, 2, 5 et 6). Toutes les fractions ont été immunoprécipitées avec un anticorps anti-FLAG et analysées, comme les protéines immunoprécipitées, par immunomarcage avec un anticorps anti-MCM7. Deux expositions sont représentées et la position des marqueurs de poids moléculaire ayant migré en parallèle est indiquée à gauche de l'exposition longue. Dans les immunoprécipitations, l'intensité des signaux correspondant aux formes non modifiées et poly-ubiquitinylées de MCM7 a été quantifiée avec le logiciel ImageJ. Les rapports entre ces intensités, normalisés par les rapports en absence de BARD1, sont représentés sous forme d'histogramme.

La même expérience a été répétée et les fractions utilisées pour immunoprécipiter FLAG-MCM7 afin de rendre ses formes poly-ubiquitinylées plus visibles après un immunomarquage avec un anticorps anti-MCM7 (Figure 30B). On constate en présence de BRCA1-NT et BARD1 une légère augmentation du signal correspondant à ces formes poly-ubiquitinylées dans la fraction chromatinienne, bien que l'immunoprécipitation ait été moins efficace. La quantification des signaux montre que le niveau des formes poly-ubiquitinylées de MCM7 augmente de 30% dans la fraction chromatinienne, et diminue de 20% dans la fraction non chromatinienne (Figure 30B, histogramme). L'ubiquitinylation de MCM7 stimulée par BRCA1-BARD1 semble donc se produire sur la chromatine, mais ne modifie pas sa présence dans ce compartiment cellulaire.

3. BRCA1 semble stabiliser MCM7

Selon le consensus actuel, le dimère BRCA1-BARD1 catalyse la formation de chaînes d'ubiquitines en les reliant par leur lysine 6. Ce type de chaîne est pris en charge par le protéasome, mais ne provoque pas la dégradation des protéines marquées. Au contraire, la poly-ubiquitinylation d'un substrat via la lysine 6 de l'ubiquitine aurait tendance à le stabiliser (cf. chapitre 1, D). Comme nous pensons que MCM7 est un substrat potentiel de l'activité E3 ligase de BRCA1, nous avons recherché un effet de BRCA1 sur sa stabilité. Pour cela, nous avons observé l'effet d'une interférence ARN contre BRCA1 sur le niveau de MCM7 dans des cellules HeLa (Figure 31). Le résultat est net : la diminution du niveau cellulaire de BRCA1 entraîne une baisse simultanée de celui de MCM7. Cette observation est intéressante car elle indique que BRCA1 pourrait stabiliser MCM7 en catalysant sa poly-ubiquitinylation via la lysine 6 de l'ubiquitine.

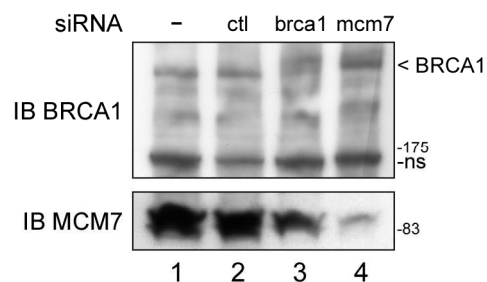


Figure 31. BRCA1 stabilise MCM7. Des cellules HeLa ont été transfectées par des siRNA contrôle (piste 2) ou dirigés contre BRCA1 (piste 3) ou MCM7 (piste 4), ou par le tampon d'hybridation seul (piste 1). Les cellules ont été lysées dans du tampon de Laemmli et 20µg des extraits ont été analysés par immunomarquage avec des anticorps anti-BRCA1 (panneau du haut) et anti-MCM7 (panneau du bas). Les positions des marqueurs de poids moléculaire ayant migré en parallèle et d'une bande non spécifique (ns) sont indiquées à droite.

4. BRCA1 stimule l'ubiquitinylation de MCM7 intervenant après une irradiation

Aucun substrat n'a encore été identifié formellement *in vivo* pour l'activité E3 ligase du dimère BRCA1-BARD1. Par contre, plusieurs études indiquent qu'il exerce cette activité au niveau des sites de réparation de l'ADN (Morris and Solomon, 2004; Polanowska et al., 2006). Or, nous avons vu que l'ubiquitinylation de MCM7 est précisément stimulée suite à une irradiation des cellules (Figure 25). De plus, BRCA1-BARD1 stimule l'ubiquitinylation de MCM7 sur la chromatine. Nous avons donc décidé d'étudier cette stimulation dans le cadre d'une irradiation des cellules. L'ubiquitinylation de FLAG-MCM7 en présence de MYC-BRCA1-NT et BARD1, mais sans surexpression de l'ubiquitine, a été quantifiée avec ou sans irradiation (10Gy) des cellules. Pour ce faire, FLAG-MCM7 a été immunoprécipitée à partir des lysats cellulaires, et ses formes poly-ubiquitinylées détectées par un immunomarquage avec un anticorps anti-MCM7 (Figure 32). Le calcul du rapport indique que l'ubiquitinylation augmente d'un facteur 3,8 avec l'irradiation des cellules. En absence de surexpression de BRCA1-BARD1, ce rapport était d'environ 2,4 (Figure 25). Ce résultat indique que l'ubiquitinylation de MCM7 intervenant après l'introduction de dommages dans l'ADN est stimulée par BRCA1.

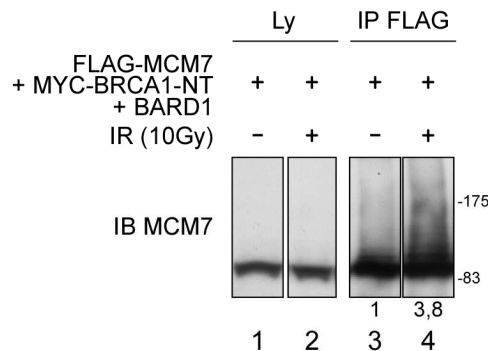


Figure 32. Le dimère BRCA1-BARD1 stimule l'ubiquitinylation de MCM7 intervenant après une irradiation. Des cellules 293T ont été transfectées par 2µg de pSGF-MCM7, 2µg de pcDNA3-mycBRCA1-NT et 2µg de pcDNA3-BARD1, puis soumises (pistes 2 et 4) ou non (pistes 1 et 3) à une irradiation de 10Gy. Les cellules ont été lysées 3 heures après l'irradiation et les extraits ont été immunoprécipités avec un anticorps anti-FLAG. Les protéines immunoprécipitées et les extraits ont été analysés par immunomarquage avec un anticorps anti-MCM7. La position des marqueurs de poids moléculaire ayant migré en parallèle est indiquée à droite. L'intensité des signaux correspondant au signal de poly-ubiquitinylation de FLAG-MCM7 (quantifiée avec le logiciel ImageJ), rapportée à l'intensité en absence d'irradiation, est indiquée numériquement sous les pistes 3 et 4.

MCM7 serait-elle le premier substrat de l'activité E3 ligase de BRCA1 identifié *in vivo* aux sites de réparation de l'ADN ? En d'autres termes, l'activité E3 ligase de BRCA1 est-elle directement responsable de l'ubiquitinylation de MCM7 ? Pour répondre à ces questions, un moyen possible est de tester *in vitro* l'ubiquitinylation de MCM7 par BRCA1.

IV. Ubiquitinylation *in vitro* de MCM7 par BRCA1

1. Difficultés à surmonter pour mettre en place le test

Tester l'ubiquitinylation d'un substrat *in vitro* est une opération coûteuse aussi bien en temps qu'en matériel, car il faut se procurer tous les composants protéiques, soit en les purifiant, soit en les achetant (s'ils sont disponibles). Cependant, l'investissement doit s'avérer rentable car ce type d'expérience permet d'identifier formellement l'enzyme E3 ligase d'un substrat donné, si l'on constate une ubiquitinylation de ce dernier à la fin de la réaction. Encore faut-il avoir une idée de l'enzyme E2 fonctionnant avec l'enzyme E3 que l'on souhaite étudier. Concernant BRCA1, il est admis que l'enzyme E2 est ubcH5c. C'est tout du moins celle qui a été utilisée lors des tests d'ubiquitinylation réalisés *in vitro* avec BRCA1 (Sato et al., 2004; Starita et al., 2005; Starita et al., 2004). Nous avons donc entrepris de rassembler tous les composants nécessaires pour mener à bien des tests d'ubiquitinylation *in vitro* de MCM7.

2. Purification des composants du test : échec partiel

Seules l'enzyme E1 et l'ubiquitine fusionnée à une étiquette 6xHis ont été achetées, les autres composants ayant été produits par nos soins. L'enzyme ubcH5c fusionnée à une étiquette 6xHis a été produite en bactérie et purifiée sur résine de nickel. Le gène MCM7 a été cloné en aval de l'étiquette FLAG dans un vecteur permettant son transfert dans le génome du baculovirus. FLAG-MCM7 a donc été produite dans des cellules d'insecte SF21 et purifiée en deux étapes : tout d'abord sur résine d'héparine pour tirer profit de son affinité pour la chromatine, puis sur résine anti-FLAG M2. Les baculovirus contenant FLAG-BRCA1 et BARD1 nous ont été donnés par J.D. Parvin (Starita et al., 2005; Starita et al., 2004) et les protéines ont été produites dans des cellules d'insecte SF21. La co-infection devait permettre de co-purifier les deux partenaires en complexe sur des résines héparine et anti-FLAG M2. Malheureusement, la deuxième purification n'a pour l'instant pas fonctionné entre nos mains.

Les détails expérimentaux des purifications sont donnés en annexe II, et la figure 33 présente les résultats obtenus jusqu'à présent.

Nous sommes donc pour l'instant pas parvenus à effectuer le test d'ubiquitylation *in vitro* de MCM7. Cependant, nous avons tout de même purifié en quantité les protéines FLAG-MCM7 et His-ubcH5c, et nous étudions actuellement la possibilité d'utiliser pour le test un complexe FLAG-BRCA1-BARD1 surexprimé en cellules 293T et immunoprécipité.

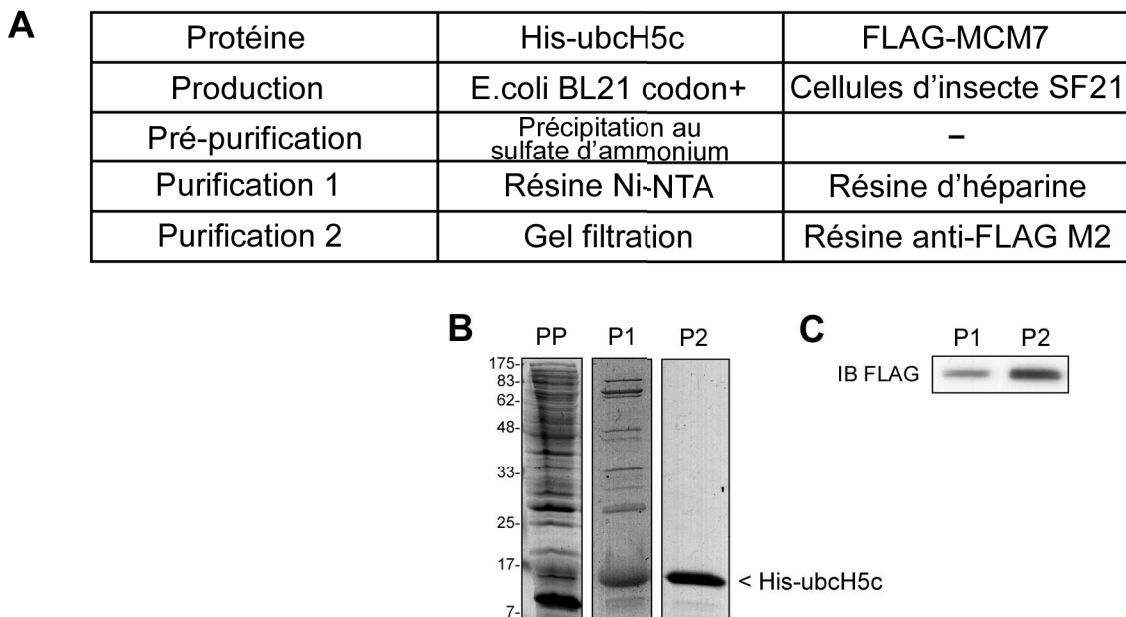


Figure 33. Purification des protéines nécessaires au test d'ubiquitylation *in vitro* de MCM7. (A) Résumé des méthodes de production et purification des protéines. (B) Le lysat bactérien après précipitation au sulfate d'ammonium (PP) et les résultats des purifications n°1 (P1) et n°2 (P2) ont été analysés par coloration au bleu de Coomassie. La position des marqueurs de poids moléculaires ayant migré en parallèle est indiquée. (C) Analyse par immunomarquage avec un anticorps anti-FLAG d'une fraction correspondant à 0,1% du volume total des purifications n°1 (P1) et n°2 (P2).

D - DEREGULATION DE MCM7 PAR L'ONCOPROTEINE VIRALE TAX

I. Pourquoi s'intéresser à la protéine Tax ?

La protéine Tax est codée par le génome du rétrovirus HTLV-1 (Human T-cell Leukemia Virus). HTLV-1 a été le premier rétrovirus pathogène isolé chez l'homme à partir de lymphocytes T (Poiesz et al., 1980). Parmi les trois types de virus HTLV connus aujourd'hui, HTLV-1 est le seul à être associé clairement à différentes pathologies, et notamment la leucémie aiguë à cellule T de l'adulte (ATL, Adult T-cell Leukemia). L'ATL intervient dans 3 à 5% des cas d'infection par HTLV-1 et est caractérisée par une prolifération maligne des lymphocytes T CD4+ (Yoshida et al., 1982; Yoshida et al., 1984) ayant conduit à l'apparition d'un clone de lymphocytes T CD4+ transformés.

Parmi les différentes protéines virales codées par le génome de HTLV-1, une semble particulièrement importante pour l'expansion clonale des cellules infectées par ce virus. Il s'agit de la protéine Tax, une protéine nucléo-cytoplasmique de 40 kDa. Elle possède à elle seule la capacité d'immortaliser des lymphocytes T CD4+ humains en culture, ou de transformer des lignées de fibroblastes de rongeurs (Grassmann et al., 1992; Tanaka et al., 1990). De plus, des souris transgéniques exprimant Tax spécifiquement dans les cellules T développent des lymphomes et des métastases osseuses (Gao et al., 2005; Grossman et al., 1995).

Le mode d'action de Tax lors de l'expansion clonale des lymphocytes repose principalement sur la dérégulation de la réparation de l'ADN et des points de contrôle du cycle cellulaire, ce qui conduit à l'instabilité chromosomique propice à la transformation cellulaire (pour revue, (Marriott and Semmes, 2005)). Cependant, des données obtenues dans notre laboratoire ont montré qu'un rôle potentiel de Tax dans la réplication de l'ADN n'est pas à exclure. En effet, des interactions de Tax avec MCM7 d'une part et Int6 d'autre part ont été mises en évidence par double hybride. C'est pourquoi un axe de mes recherches a consisté à évaluer l'effet de Tax sur MCM7 et plus généralement sur le complexe MCM.

II. Interaction entre Tax et MCM7

1. Confirmation des données de double hybride

Afin de mettre en évidence l'interaction *in vivo* entre Tax et MCM7, nous avons utilisé la lignée de cellules C8166, constituée de lymphocytes T CD4+ humains exprimant Tax de manière stable. L'immunoprécipitation de Tax à partir de ces cellules entraîne une co-précipitation de MCM7 (Figure 34A), confirmant ainsi les données obtenues auparavant par double hybride dans la levure.

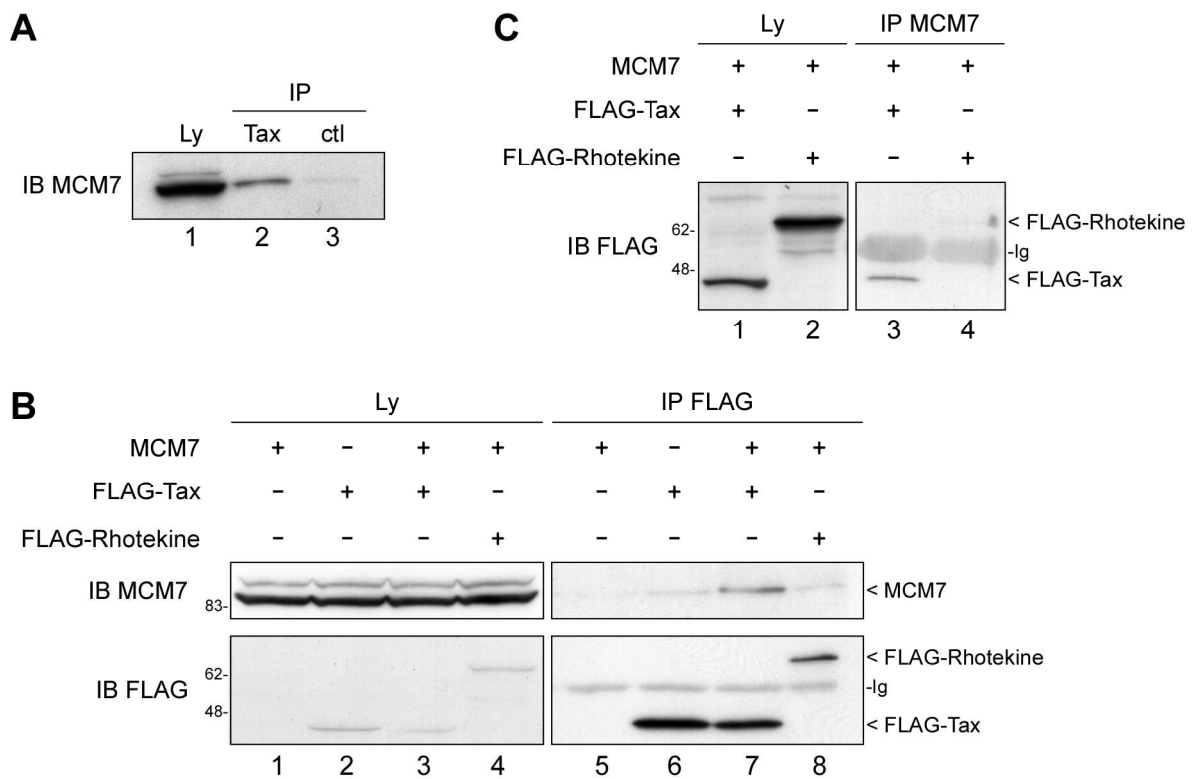


Figure 34. Tax interagit avec MCM7. (A) Un lysat de cellules C8166 a été immunoprécipité par des anticorps anti-Tax et anti-HA. Le lysat (piste 1) et les protéines immunoprécipitées (pistes 2 et 3) ont été analysés par immunomarquage avec un anticorps anti-MCM7. (B) Des lysats de cellules COS7 transfectées comme indiqué avec différentes combinaisons de pTL1-MCM7 (1 μ g), pSGF-Tax (1 μ g) et pFLAG-Rhotekine (1 μ g) ont été immunoprécipités avec un anticorps anti-FLAG. Les lysats (pistes 1 à 4) et les protéines immunoprécipitées (pistes 5 à 8) ont été analysés par immunomarquage avec des anticorps anti-MCM7 (panneau du haut) et anti-FLAG (panneau du bas). Les positions des protéines MCM7, FLAG-Tax et FLAG-Rhotekine, ainsi que celle des immunoglobulines (Ig), sont indiquées sur la droite, tandis que la position des marqueurs de poids moléculaire ayant migré en parallèle est indiquée sur la gauche. (C) Des lysats de cellules COS7 transfectées par 1 μ g de pTL1-MCM7 en combinaison avec 1 μ g de pSGF-Tax (pistes 1 et 3) ou 1 μ g de pFLAG-Rhotekine (pistes 2 et 4) ont été immunoprécipités avec un anticorps anti-MCM7. Les lysats (pistes 1 et 2) et les protéines immunoprécipitées (pistes 3 et 4) ont été analysés par immunomarquage avec un anticorps anti-FLAG.

Ces résultats ont été confirmés dans des cellules COS7 cotransfectées par des plasmides codant pour MCM7 et Tax fusionnée à une étiquette FLAG à son extrémité N-terminale. Comme attendu, l'immunoprécipitation de FLAG-Tax via un anticorps anti-FLAG entraîne la co-précipitation d'une quantité significative de MCM7 en comparaison avec l'immunoprécipitation d'une protéine contrôle, FLAG-Rhotekine (Figure 34B). Par ailleurs, dans les mêmes conditions de transfection, l'immunoprécipitation de MCM7 entraîne la co-précipitation de FLAG-Tax et pas de FLAG-Rhotekine (Figure 34C).

Des expériences supplémentaires, réalisées *in vitro* avec les protéines purifiées, permettront de déterminer si l'interaction est directe ou pas.

2. Interaction entre Tax et le sous complexe MCM4,6,7

Après avoir mis en évidence l'interaction *in vivo* entre Tax et MCM7, nous nous sommes demandé si Tax était capable d'interagir avec le complexe MCM. Des cellules COS7 ont donc été transfectées par des vecteurs permettant l'expression de FLAG-Tax, MCM7, ainsi que MCM4 et 6 fusionnées avec l'étiquette HA à leur extrémité N-terminale. Le complexe HA-MCM4,6-MCM7 a été purifié à partir de cellules transfectées de la même manière sur colonne de billes d'agarose couplées à un anticorps anti-HA (Figure 35). On visualise dans les éluions les protéines HA-MCM4, HA-MCM6 et MCM7, ce qui signifie que nous sommes parvenus à purifier une fraction du sous complexe surexprimé dans les cellules. Un immunomarquage contre l'étiquette FLAG de Tax montre que cette protéine est, elle aussi, retrouvée dans les fractions d'éluion de la purification (Figure 35, pistes 4 et 5). La

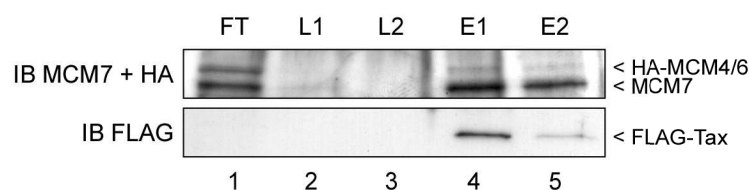


Figure 35. Tax interagit via MCM7 avec le sous complexe MCM4,6,7. Un lysat de cellules COS7 transfectées par pTL1-MCM7, pSGHA-MCM4, pSGHA-MCM6 et pSGF-Tax (2µg de chaque) a été déposé sur une colonne de billes d'agarose couplées à un anticorps anti-HA. La colonne a été lavée deux fois (L1,2, pistes 2 et 3) et les protéines ont ensuite été éluées par une solution de peptide HA (E1,2, pistes 4 et 5). Les protéines non retenues par la colonne (FT ("flow through"), piste 1), les lavages et les éluions ont été analysés par immunomarquage avec des anticorps anti-MCM7 et anti HA (panneau du haut) ou anti-FLAG (panneau du bas). Les positions des protéines HA-MCM4 et 6 (qui co-migrent), MCM7 et FLAG-Tax sont indiquées sur la droite.

quasi-totalité de FLAG-Tax est récupérée en sortie de colonne, et son profil d'éluion est identique à celui du complexe MCM4,6,7. Ces observations indiquent que, via une interaction directe avec MCM7, Tax est capable d'interagir avec le sous complexe MCM4,6,7.

3. Tax n'interfère pas avec l'interaction entre Int6 et MCM7

En considérant les interactions de Tax avec MCM7 d'une part et Int6 d'autre part, ainsi que les résultats présentés précédemment concernant l'effet stabilisateur d'Int6 sur MCM7, on pourrait légitimement penser que Tax est capable d'interférer avec la régulation de MCM7 par Int6. Nous avons donc étudié l'effet d'une surexpression de Tax sur l'interaction entre Int6 et MCM7. Après avoir surexprimé MCM7 et Int6-FLAG en présence ou en absence de FLAG-Tax dans des cellules COS7, nous avons effectué une immunoprécipitation de MCM7 (Figure 36). La révélation simultanée des protéines FLAG-Tax et Int6-FLAG dans les immunoprécipitations indique qu'elles sont toutes les deux capables d'interagir avec MCM7. Même si l'on constate une légère diminution de la quantité d'Int6-FLAG précipitée quand FLAG-Tax est présente, on ne peut pas conclure de cette expérience que Tax inhibe l'interaction entre MCM7 et Int6. Il semble au contraire que Tax et Int6 interagissent avec différentes fractions de l'ensemble des molécules MCM7, indiquant une intervention de Tax sur des molécules MCM7 fonctionnellement différentes de celles concernées par l'interaction avec Int6. La possibilité d'un complexe ternaire n'est toutefois pas à exclure.

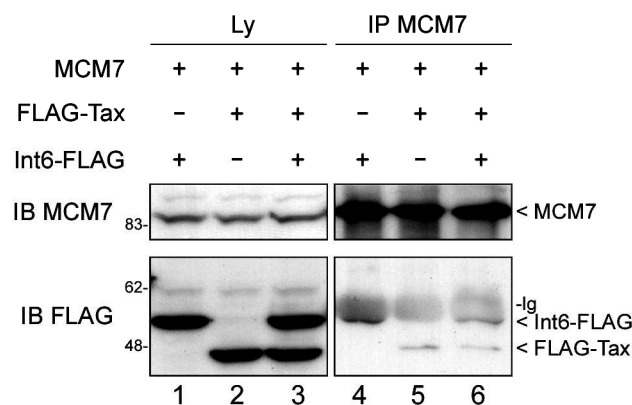


Figure 36. Tax n'interfère pas avec l'interaction Int6-MCM7. Des lysats de cellules COS7 transfectées comme indiqué avec différentes combinaisons de pTL1-MCM7 (1µg), pSGF-Tax (1µg) et pTL1-Int6-FLAG (1µg) ont été immunoprécipités avec un anticorps anti-MCM7. Les lysats (pistes 1 à 3) et les protéines immunoprécipitées (pistes 4 à 6) ont été analysés par immunomarquage avec des anticorps anti-MCM7 (panneau du haut) et anti-FLAG (panneau du bas). Les positions des protéines MCM7, FLAG-Tax et Int6-FLAG, ainsi que celle des immunoglobulines (Ig), sont indiquées sur la droite, tandis que la position des marqueurs de poids moléculaire ayant migré en parallèle est indiquée sur la gauche.

Nous avons vu précédemment qu'Int6 interagit préférentiellement avec les formes poly-ubiquitylées de MCM7. Or, aucune des expériences effectuées jusqu'ici n'ont montré de co-précipitation de Tax avec ces formes. Selon notre modèle, la poly-ubiquitylation de MCM7 est nécessaire pour son départ de la chromatine. Ainsi, Tax interagirait avec des molécules MCM7 dont le départ de la chromatine n'a pas encore été programmé. Connaissant l'activité ADN hélicase des protéines MCM, nous avons pensé à un rôle de Tax dans la réplication de l'ADN.

III. Tax favorise la réplication de l'ADN

1. Construction d'une lignée FLAG-Tax

Afin de se rapprocher des conditions d'expression *in vivo* de Tax et d'éviter les biais liés aux transfections, nous avons décidé d'établir des lignées cellulaires exprimant FLAG-Tax ou FLAG-GFP de manière stable, la lignée FLAG-GFP servant de lignée contrôle. Ceci a été effectué via le système fourni par le vecteur pCEP4 (Invitrogene) contenant l'origine de réplication du virus d'Epstein-Barr et un gène de résistance à l'hygromycine, permettant sa réplication extra-chromosomique sous forme épisomale et la sélection des cellules. Les ADNc codant pour FLAG-Tax et FLAG-GFP ont donc été clonés dans pCEP4. Les constructions ont été transfectées dans des cellules HeLa et 293T. L'établissement de la lignée HeLa-FLAG-Tax a échoué, car les cellules ont perdu l'expression de la protéine au bout de 3 semaines environ, tout en conservant la résistance à l'hygromycine. Par contre, nous avons pu obtenir des lignées 293T-FLAG-Tax et 293T-FLAG-GFP. Le système utilisé pour l'établissement de ces lignées ne relevant pas de l'intégration de matériel génétique dans le génome des cellules sélectionnées, nous avons décidé de travailler avec des lignées poly-clonales.

2. Vérification de l'interaction Tax-MCM7 dans la lignée établie

Afin d'étudier plus en détail l'effet de Tax sur MCM7 et la réplication de l'ADN dans notre lignée, nous devons dans un premier temps confirmer l'interaction entre ces deux protéines. L'immunoprécipitation de MCM7 dans les lignées Tax et GFP suivie d'un immunomarquage par un anticorps anti-FLAG montre que l'interaction FLAG-Tax-MCM7 est retrouvée, alors qu'aucune interaction n'est visible entre MCM7 et FLAG-GFP, bien que l'expression de cette dernière soit nettement supérieure à celle de FLAG-Tax (Figure 37A).

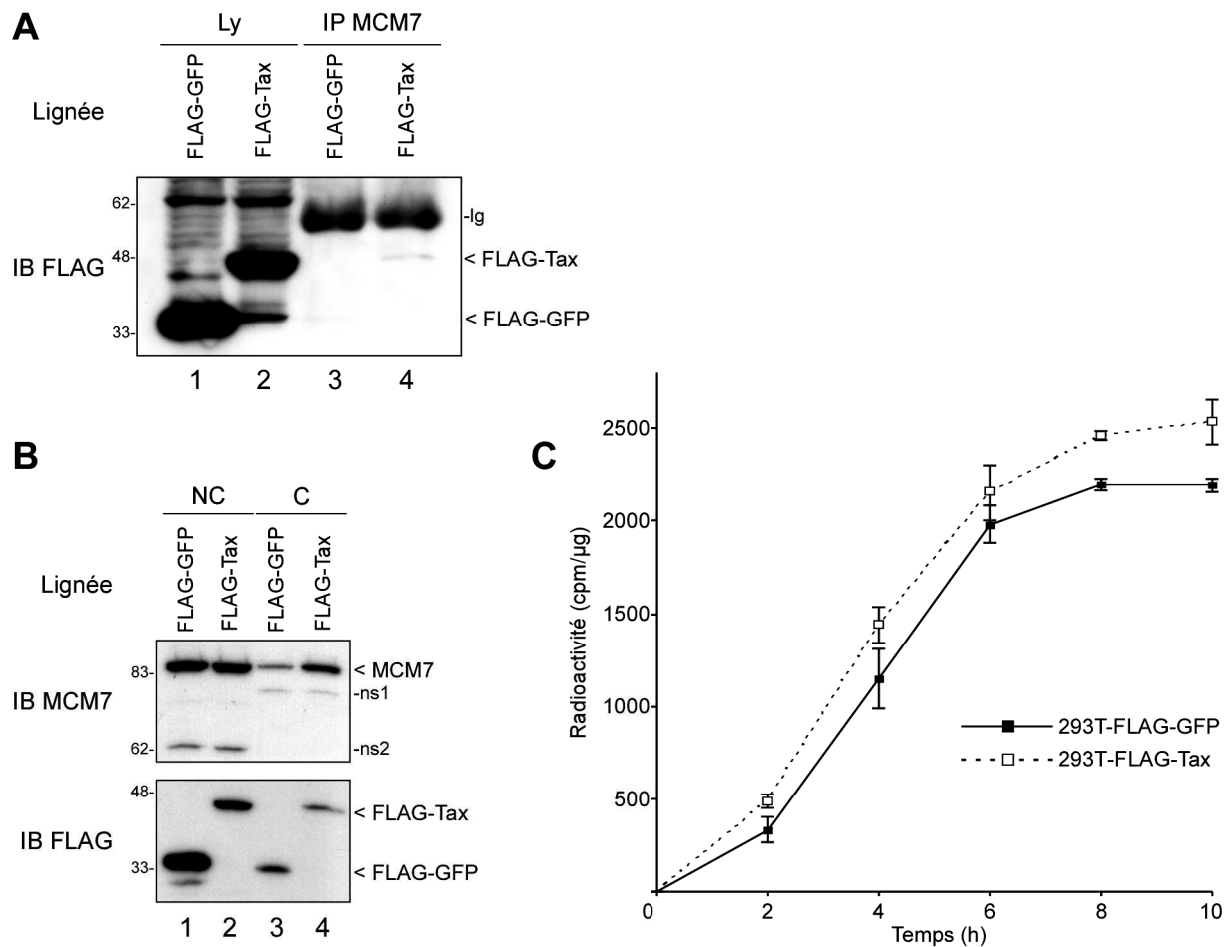


Figure 37. Etude d'une lignée 293T-FLAG-Tax. (A) Des lysats de cellules 293T-FLAG-Tax et -FLAG-GFP ont été immunoprécipités avec un anticorps anti-MCM7. Les lysats (pistes 1 et 2) et les protéines immunoprécipitées (pistes 3 et 4) ont été analysés par immunomarquage avec un anticorps anti-FLAG. Les positions des protéines FLAG-Tax et FLAG-GFP, ainsi que celle des immunoglobulines (Ig), sont indiquées sur la droite, tandis que la position des marqueurs de poids moléculaire ayant migré en parallèle est indiquée sur la gauche. (B) Des cellules 293T-FLAG-Tax et -FLAG-GFP ont été séparées en fractions chromatiniennes (C, pistes 3 et 4) et non chromatiniennes (NC, pistes 1 et 2) qui ont été analysées par immunomarquage avec des anticorps anti-MCM7 (panneau du haut) et anti-FLAG (panneau du bas). (C) Des cellules 293T-FLAG-Tax et -FLAG-GFP ont été synchronisées à la transition G1/S, relâchées en phase S en présence de thymidine tritiée, et récupérées après 0, 2, 4, 6, 8 ou 10 heures d'incorporation. La radioactivité des lysats a été mesurée et rapportée à leur concentration en protéines. Les valeurs sont représentées en radioactivité incorporée au cours du temps et correspondent aux moyennes de deux expériences indépendantes.

3. Tax interagit avec MCM7 sur la chromatine

Nous avons par la suite étudié l'effet de Tax sur la répartition de MCM7 entre le nucléoplasme et la chromatine. Des cellules de nos lignées FLAG-Tax et FLAG-GFP ont donc été séparées en fractions chromatiniennes et non chromatiniennes (Figure 37B). On constate que la présence de FLAG-Tax provoque une augmentation du signal correspondant à MCM7 dans la fraction chromatinienne, tout en laissant inchangé celui d'une bande non spécifique (ns1) révélée par l'anticorps anti-MCM7 (Figure 37B, comparer les pistes 3 et 4). Ainsi, d'une façon restant à expliquer, Tax favoriserait le chargement de MCM7 sur la chromatine, ou la stabiliserait dans ce compartiment cellulaire. Tax y est d'ailleurs présente de manière significative (Figure 37B). L'étude de l'interaction entre Tax et MCM7 sur la chromatine est donc un paramètre important, qui a été analysé. Nous avons utilisé les fractions chromatiniennes issues des deux lignées cellulaires pour immunoprécipiter MCM7. Une faible quantité de FLAG-Tax a été co-précipitée (non représenté), indiquant qu'elle est capable d'interagir avec MCM7 sur la chromatine.

4. Tax stimule l'incorporation de thymidine tritiée dans la lignée établie

Afin d'évaluer un effet potentiel de Tax sur la réplication de l'ADN, nos lignées FLAG-Tax et FLAG-GFP ont été synchronisées à la transition G1/S par un double blocage à la thymidine, puis relâchées en phase S en présence de thymidine tritiée. Des cellules ont été récupérées 0, 2, 4, 6, 8 et 10 heures après la transition G1/S et la quantité de radioactivité incorporée a été quantifiée (Figure 37C). L'effet de Tax sur l'incorporation de thymidine n'est pas spectaculaire, mais on constate toutefois une légère stimulation.

En considérant l'interaction de Tax avec MCM7 et le sous complexe MCM4,6,7, qui contiendrait l'activité catalytique du complexe MCM, nous avons pensé à un effet de Tax sur l'activité hélicase du complexe MCM. En la stimulant via son interaction avec MCM7, Tax pourrait favoriser la réplication de l'ADN et ainsi participer à l'expansion clonale des cellules infectées par HTLV-1. Nous avons donc décidé d'étudier l'effet de Tax sur l'activité hélicase *in vitro* du sous complexe MCM4,6,7.

IV. Mise en place d'un test *in vitro* de l'activité hélicase du sous complexe MCM4,6,7

1. Purification du sous complexe MCM4,6,7

L'activité hélicase du complexe MCM a déjà été reproduite *in vitro* grâce à la production du sous complexe MCM4,6,7 recombinant à partir de cellules d'insectes co-infectées par des baculovirus contenant l'ADNc de chacune des trois sous unités. Ceci a été réalisé pour les sous complexes de levure (Lee and Hurwitz, 2001) et de souris (Ishimi, 1997), mais jamais pour le complexe humain.

En plus du baculovirus contenant l'ADNc codant pour FLAG-MCM7 que nous avons utilisé pour les tests d'ubiquitinylation de MCM7 (cf. partie B), nous avons produit des baculovirus contenant les séquences codantes de HA-MCM4 et His-MCM6. Ainsi, la présence des trois étiquettes, FLAG, HA et His, devait permettre une purification en trois étapes du sous complexe via des colonnes de résine Ni-NTA, puis de billes d'agarose couplées à un anticorps anti-HA et enfin anti-FLAG. Cependant, les résines Ni-NTA et anti-HA n'ont pas donné de résultats intéressants : la première ne permettant pas de bien séparer le complexe des contaminants du lysat cellulaire, et la deuxième n'offrant pas des rendements importants par rapport à son coût de mise en œuvre (au niveau de la résine en elle-même comme au niveau du peptide HA permettant l'élution des protéines). Nous avons donc opté pour une autre stratégie de purification (Figure 38A).

Les protéines contenues dans le lysat de cellules d'insecte SF21 co-infectées par les baculovirus permettant l'expression des trois MCM d'intérêt ont été purifiées sur résine anti-FLAG-M2 (Figure 38B), puis concentrées par une précipitation au sulfate d'ammonium pour être soumises à une séparation par gel filtration. Cette dernière étape s'est notamment avérée nécessaire pour éliminer un dernier contaminant doté d'une activité nucléase responsable de la dégradation du substrat utilisé pour le test hélicase. L'analyse du complexe purifié après gel filtration permet de bien distinguer, sur gel d'acrylamide, les quatre bandes correspondant à MCM4, MCM6 et au doublet caractéristique de MCM7 (Figure 38C). Ceci illustre encore l'intérêt d'utiliser les cellules d'insecte pour produire des protéines recombinantes comportant les différentes modifications post-traductionnelles retrouvées *in vivo*.

2. Purification de la protéine Tax

Au sein du laboratoire, la purification de la protéine Tax avait déjà été tentée à partir d'une production en bactéries, mais sans succès. En effet cette protéine est très insoluble et

A

Protéine	MCM4,6,7 { HA-MCM4 His-MCM6 FLAG-MCM7	FLAG-Tax
Production	Cellules d'insecte SF21	Cellules d'insecte SF21
Purification 1	Résine anti-FLAG M2	Résine d'héparine
Purification 2	Gel filtration	Résine anti-FLAG M2

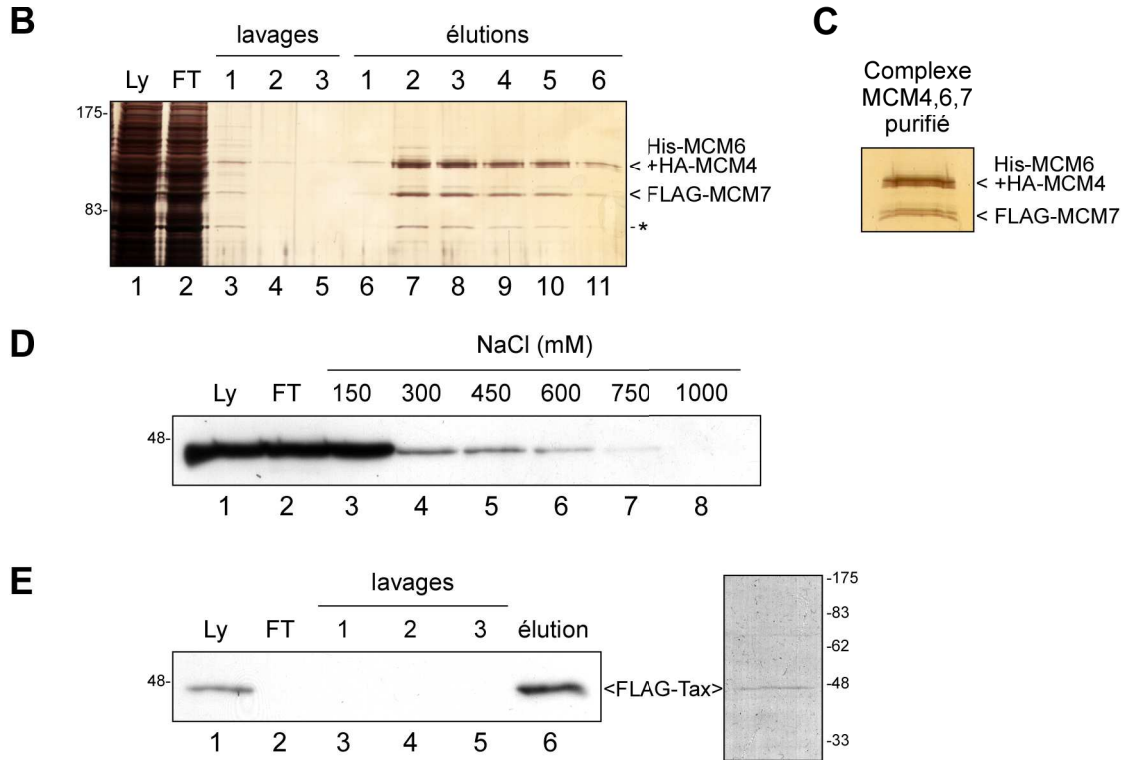


Figure 38. Purification des protéines nécessaires au test de l'effet de Tax sur l'activité hélicase du complexe MCM4,6,7. (A) Résumé des purifications. (B,C) Purification du sous complexe MCM4,6,7. Coloration à l'argent des gels et position des marqueurs de poids moléculaire ayant migré en parallèle indiquée sur la gauche. (B) Les protéines précipitées du lysat (Ly) ont été déposées sur une colonne de résine anti-FLAG-M2. La résine a été lavée trois fois et les protéines ont été éluées par une solution contenant du peptide FLAG. Des fractions équivalentes des protéines non accrochées (FT, "Flow Through", piste 2), des lavages (pistes 3 à 5) et des éluions (pistes 6 à 11) ont été séparées sur gel d'acrylamide 8%. (C) Analyse du sous complexe MCM4,6,7 purifié après résine anti-FLAG-M2 et gel filtration. (D,E) Purification de FLAG-Tax. (D) Les protéines du lysat cellulaire (Ly, piste 1) ont été déposées sur une colonne de résine d'héparine puis éluées par des concentrations croissantes de NaCl. Des fractions équivalentes des protéines non accrochées (FT, piste 2) et des éluions (pistes 3 à 8) ont été séparées sur gel d'acrylamide 8% et analysées par immunomarquage avec un anticorps anti-FLAG. (E) Les protéines éluées de la résine d'héparine entre 150 et 450 mM de NaCl (Ly, piste 1) ont été déposées sur une colonne de résine anti-FLAG-M2. La résine a été lavée trois fois et les protéines ont été éluées en une seule fois par une solution contenant du peptide FLAG. Des fractions équivalentes des protéines non accrochées (FT, piste 2), des lavages (pistes 3 à 5) et de l'éluion (piste 6) ont été analysées par immunomarquage avec un anticorps anti-FLAG. L'éluion a aussi été analysée par coloration du gel au bleu de Coomassie (panneau de droite).

même les techniques permettant de la purifier à partir des corps d'inclusion bactériens n'ont pas donné de résultats satisfaisants. Nous avons donc pensé que la production de Tax dans des cellules d'insecte permettrait de régler ce problème. Un baculovirus permettant l'expression de FLAG-Tax a donc été produit. L'expression de la protéine dans les cellules SF21 s'est avérée correcte, et elle a été purifiée de la même manière que FLAG-MCM7 seule (Figure 33), c'est-à-dire sur résines d'héparine et anti-FLAG-M2 (Figure 38A, D et E).

3. Test de l'activité hélicase du sous complexe MCM4,6,7 humain purifié

Le substrat utilisé pour le test d'activité hélicase est semblable à ceux utilisés par les différents groupes ayant effectué ce type de test. Il s'agit de l'ADN circulaire simple brin du phage M13 hybridé à un oligonucléotide marqué radioactivement à son extrémité 5'. L'hybridation n'est que partielle et laisse libre l'extrémité 3' de l'oligonucléotide (Figure 39). La séparation de cet oligonucléotide de l'ADN circulaire par une activité ADN hélicase est visible après migration sur gel de polyacrylamide du mélange réactionnel. L'avantage de ce test est de pouvoir tester l'effet de variations de température, de concentrations en sels, et bien entendu – c'est ce qui nous intéresse ici – de protéines supplémentaires. Malheureusement, après avoir testé de nombreuses conditions expérimentales, nous n'avons pu obtenir d'activité hélicase significative pour le complexe purifié. Cette activité est certes visible (Figure 39), mais trop faible pour qu'un quelconque effet de Tax puisse être détecté (non représenté).

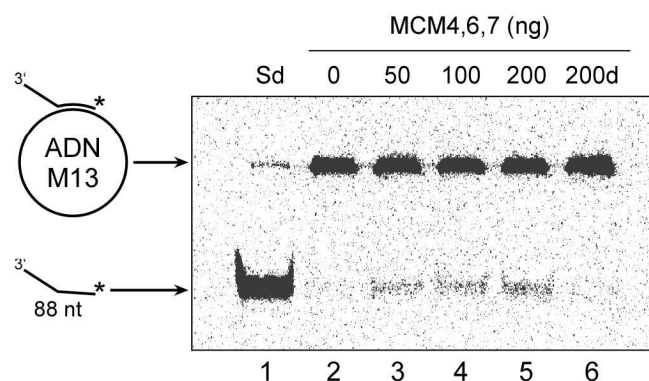


Figure 39. Test de l'activité ADN hélicase du complexe MCM4,6,7 purifié. Le substrat utilisé pour le test est composé de l'ADN circulaire du phage M13 hybridé sur une longueur de 37 nucléotides à un oligonucléotide radioactif. 5 fmol de substrat ont été dénaturées par chauffage à 95°C (Sd, piste 1) ou incubées 1 heure à 37°C avec 0, 50, 100 ou 200 ng de complexe MCM4,6,7 purifié (pistes 2 à 5). Un contrôle a été effectué en incubant 5 fmol de substrat avec 200 ng de complexe MCM4,6,7 préalablement dénaturé par chauffage pendant 10 minutes à 95°C (piste 6). Après la fin de la réaction, les mélanges ont été déposés sur un gel d'acrylamide à 12%, et la radioactivité a été révélée avec un Phosphorimager.

Chapitre 3

Discussion

A - REGULATION DE MCM7 LORS DE LA REPLICATION DE L'ADN

I. MCM7 est soumise à une protéolyse pendant la phase S

Nous avons montré que MCM7 est ubiquitinylée, ce qui provoque sa dégradation car l'ubiquitylation apparaît plus fortement après un traitement des cellules au MG132, un inhibiteur du protéasome. L'ubiquitylation pro-dégradative de MCM7 a déjà été montrée, mais aucune fonction précise ne lui avait été attribuée (Kuhne and Banks, 1998). Ici, nous montrons que l'ubiquitylation de MCM7 entraîne son départ de la chromatine en cours de réplication. Cependant, le niveau total de MCM7 varie peu pendant la phase S. Cela indique que la protéolyse ne touche que certaines molécules de MCM7, les autres étant dissociées de la chromatine d'une autre manière. Nous y reviendrons plus tard.

C'est la première fois qu'une ubiquitylation pro-dégradative d'une des protéines MCM est observée lors de la réplication. Hormis MCM7, seule MCM3 est connue pour être poly-ubiquitinylée et dégradée par le protéasome, chez *S. cerevisiae*, mais cela intervient en mitose pour réguler son abondance par rapport aux autres protéines MCM et assurer un assemblage correct des complexes MCM (Yan et al., 1991). Toujours chez *S. cerevisiae*, MCM10 est di-ubiquitinylée pendant la phase S ; cela n'entraîne pas sa dégradation, mais lui permet d'interagir avec PCNA sur la chromatine (Das-Bradoo et al., 2006). Cette interaction est nécessaire pour la réplication car MCM10 constitue chez la levure un intermédiaire entre les activités hélicase et polymérase de la fourche de réplication, en stabilisant la polymérase α sur la chromatine (Ricke and Bielinsky, 2004).

En phase S, l'ubiquitylation pro-dégradative de protéines impliquées dans le métabolisme de l'ADN ne se restreint pas aux protéines MCM, bien au contraire. Par exemple, elle est fondamentale pour éviter des phénomènes de ré-initiation des origines de réplication. En effet, certaines protéines participant à l'autorisation de la réplication sont dégradées au cours de la phase S, consécutivement à leur ubiquitylation sur la chromatine, c'est-à-dire là où elles sont fonctionnelles. Leur niveau cellulaire est donc diminué, ce qui prévient la ré-initiation de la réplication.

La protéine ORC1 est ubiquitinylée par la E3 ligase SCF^{Skp2}, ce qui provoque son départ de la chromatine et sa dégradation (Mendez et al., 2002; Tatsumi et al., 2003). Ainsi, dans les cellules humaines, le complexe ORC n'est pas fonctionnel en phase S. Chez *S. cerevisiae*, Cdc6 est de la même manière soumise à une protéolyse intervenant juste avant l'initiation des origines de réplication suite à sa poly-ubiquitylation par SCF^{cdc4} (Drury et al., 1997; Drury et al., 2000). Chez *S. pombe*, l'homologue de Cdc6, Cdc18, est également dégradé au moment de la transition G1/S (Jallepalli et al., 1997; Kominami and Toda, 1997). Chez l'homme, la régulation de CDC6 est moins claire. Bien qu'elle puisse être ubiquitinylée et dégradée (Mendez and Stillman, 2000), son niveau varie peu au cours du cycle cellulaire (Nishitani et al., 2001), et une fraction de CDC6 est présente sur la chromatine tout au long de la phase S. De plus, une autre étude a montré que l'export nucléaire de CDC6 constitue la principale inhibition de sa fonction d'autorisation de la réplication (Petersen et al., 1999).

Il est bien établi que CDT1, qui coopère avec CDC6 pour autoriser la réplication en recrutant le complexe MCM aux origines, est soumise à une protéolyse en phase S, cela chez tous les eucaryotes étudiés. La dégradation de CDT1 dépend de son ubiquitylation par deux complexes différents : SCF^{Skp2} d'une part et CUL4-DDB1-ROC1 d'autre part (Li et al., 2003; Nishitani et al., 2006). Ce dernier est assemblé par la culline 4 (CUL4), la protéine de type RING Finger étant ROC1 et la protéine adaptatrice étant DDB1 (« DNA Damage Binding »). Le complexe ne comporte pas de protéine F-Box, mais la reconnaissance de CDT1 pourrait s'effectuer via CDT2, qui fait partie du complexe et est nécessaire à la dégradation de CDT1 (Jin et al., 2006). De plus, le complexe comporte une autre sous unité, DDB2, qui est chargée de reconnaître des lésions de l'ADN, entraînant ainsi la dégradation de CDT1 suite à un stress génotoxique (Higa et al., 2003; Hu et al., 2004).

Les deux voies d'ubiquitylation de CDT1 nécessitent sa phosphorylation préalable par les kinases CDK (Nishitani et al., 2006). Il est frappant de constater la conservation de ce mécanisme. Par exemple, une étude de la réplication dans des extraits d'œufs de Xénope a montré que la dégradation de CDT1 intervient suite à l'initiation de la réplication et après la phosphorylation de CDT1 par la kinase CDK2 associée à la cycline E (Arias and Walter, 2005). Chez la drosophile, la dégradation de l'homologue de CDT1, Double-Parked (Dup), intervient aussi après la transition G1/S et après sa phosphorylation par CDK2 (Thomer et al., 2004). Arias et al. (2005) ont aussi montré que la dégradation de CDT1 dépend de son interaction avec PCNA, via un motif PIP (« PCNA-Interacting Protein ») : si la protéine CDT1 endogène est déplétée des extraits et remplacée par une protéine recombinante

dépourvue du motif PIP, la dégradation n'a pas lieu (Arias and Walter, 2006). PCNA servirait ainsi de plate-forme pour permettre la dégradation de CDT1, aussi bien chez le xénope que chez l'homme (Senga et al., 2006).

La dégradation de CDT1 est impérative pour empêcher la ré-initiation de la réplication en phase S. Chez *C. elegans*, l'inactivation de CUL4 stabilise CDT1, ce qui provoque une re-réplication massive de l'ADN (Zhong et al., 2003). On peut aussi observer une re-réplication de l'ADN de noyaux en G2 mis en présence d'extraits d'œufs de xénope supplémentés par une protéine CDT1 recombinante (Maiorano et al., 2005). Chez l'homme, la surexpression de CDT1 entraîne aussi une re-réplication de l'ADN, mais uniquement dans des cellules déficientes pour p53, et avec une co-expression de CDC6 (Vaziri et al., 2003). CDT1 est donc le facteur limitant pour la ré-initiation des origines, ce qui explique que son niveau cellulaire varie fortement, pour être élevé en phase G1 et faible en phase S (Nishitani et al., 2001). Sa dégradation est donc primordiale pour assurer la stabilité du génome, comme l'est celle de ORC1 ou de Cdc6 (chez la levure). Qu'en est-il de MCM7 ?

La dégradation de MCM7 est impliquée dans son départ de la chromatine lors de la phase S, comme CDT1. En effet, le départ de MCM7 est bloqué par une inhibition du protéasome qui, de plus, conduit à une accumulation des formes poly-ubiquitinylées de MCM7 sur la chromatine. Le départ de MCM7 et des autres protéines MCM de la chromatine, au fur et à mesure que la réplication progresse, a déjà été documenté (Fujita et al., 1996). Il traduit sans doute la fin de l'utilité de ces protéines sur la chromatine. Cependant, contrairement à ce que l'on peut observer pour CDT1, le niveau total de MCM7 varie peu au cours du cycle cellulaire, suggérant que la dégradation que nous avons observée ne touche qu'une partie des molécules de MCM7. Pourtant, nos résultats montrent bien qu'une inhibition du protéasome inhibe complètement le départ de MCM7 de la chromatine. Cela pourrait s'expliquer par un blocage pur et simple de la réplication, mais cela ne semble pas être le cas au vu de nos données concernant la progression en phase S des cellules en présence de MG132 (Figure p.7). En fait, le MG132 pourrait inhiber la dégradation d'une protéine qui stabilise MCM7 sur la chromatine, tout comme le fait Int6. En effet, quand Int6 est absente, le départ de MCM7 de la chromatine est accéléré mais reste progressif. Ainsi, l'hypothèse d'une autre protéine stabilisant MCM7 sur la chromatine est tout à fait envisageable. Si Int6 était la seule protéine responsable de cette stabilisation, alors sa déplétion provoquerait un départ de MCM7 de la chromatine beaucoup plus rapide que celui que nous avons observé avec la déplétion d'Int6 (Figure p.6).

Revenons à l'ubiquitinylation de MCM7. Le problème est de savoir quelles sont les molécules dégradées sur la chromatine. En effet, pendant la phase G1, les protéines MCM sont chargées sur la chromatine en fort excès par rapport à la quantité qui sera requise pour la seule réplication. On peut imaginer que l'ubiquitinylation concerne les molécules de MCM7 engagées dans les fourches de réplication actives, permettant la dissociation des complexes MCM quand deux fourches de réplication convergent. Une autre possibilité est l'ubiquitinylation de MCM7 au niveau des origines de réplication dormantes. Ces origines servent de réserve à la cellule en cas de stress réplicatif, pour initier des nouvelles fourches de réplication et terminer la synthèse d'ADN dans de bonnes conditions (Woodward et al., 2006). Ainsi, quand la réplication s'effectuerait en absence de stress, ces molécules MCM supplémentaires deviendraient inutiles et seraient dissociées de la chromatine via leur dégradation.

Nous n'avons pas identifié l'enzyme E3 ligase responsable de l'ubiquitinylation pro-dégradative de MCM7 au cours de la réplication. Kuhne et Banks ont montré que chez l'homme, l'ubiquitinylation de MCM7 dépend en partie de E6-AP (« E6 Associated Protein »), une E3 ubiquitine ligase de type HECT qui interagit avec l'oncoprotéine E6 du virus HPV (« Human Papilloma Virus »). L'interaction entre MCM7 et E6-AP s'effectue grâce à un motif présent dans les deux protéines, la L2G Box (S/TxxxLLG). Ce motif est présent dans d'autres acteurs du métabolisme de l'ADN, comme les ADN polymérase α et ϵ , ou l'hélicase BLM. La mutation de la L2G Box de MCM7 empêche sa poly-ubiquitinylation par E6-AP et sa dégradation. Il sera donc intéressant de tester, pendant la phase S, l'association avec la chromatine d'une forme de MCM7 mutée pour la L2G Box.

Les autres candidats potentiels sont les complexes SCF^{Skp2} et CUL4-DDB1-ROC1 qui sont actifs sur la chromatine pendant la phase S. En effet, Kuhne et Banks ont aussi observé une ubiquitinylation de MCM7 indépendante de E6-AP. Par ailleurs, l'intervention ou non de PCNA dans la dégradation de MCM7 pourra être analysée. En effet MCM7 comporte une séquence, située entre les acides aminés 326 et 333, qui ressemble fortement au motif PIP de CDT1 (Figure 40). La stabilité de MCM7 dépourvue de ce motif pourrait être analysée au cours de la phase S. Enfin, il faudra identifier la lysine de MCM7 utilisée pour sa poly-ubiquitinylation et tester l'association avec la chromatine d'une forme de MCM7 mutée pour cette lysine.

Quels qu'en soient les acteurs, l'ubiquitinylation de MCM7 a lieu sur la chromatine, et elle provoque son départ de ce compartiment. Ce processus semble une constante de beaucoup de protéines impliquées dans la réplication, mais dont la présence sur la chromatine, à un moment donné, n'est plus requise. Concernant MCM7, le processus semble régulé par la proto-oncoprotéine Int6.

	p21	Q	T	S	M	T	D	F	
h	Fen1	Q	G	R	L	D	D	F	
	Cdt1	Q	R	R	V	T	D	F	
	MCM7	Q	I	A	E	E	D	F	(326-332)
MmMCM7	Q	I	A	E	E	D	F	(326-332)	
XIMCM7	Q	I	T	E	E	D	F	(325-331)	
DmMCM7	E	L	A	Q	D	D	F	(324-330)	
SpMCM7	Q	-	P	K	M	D	F	(568-573)	

Figure 40. Séquence du motif PIP (« PCNA Interacting Protein ») dans différentes protéines, et du motif PIP potentiel dans MCM7 chez différentes espèces. La mutation de la glutamine ou de la phénylalanine de Cdt1 empêche sa dégradation en réponse à des dommages à l'ADN (Senga et al., 2006). h : homme ; Mm : *Mus musculus* ; XI : *Xenopus laevis* ; Dm : *Drosophila melanogaster* ; Sp : *S. pombe*.

II. Int6 régule la protéolyse de MCM7 pendant la phase S

Nous avons montré qu'une interaction existe entre MCM7 et Int6, qui est renforcée par une inhibition du protéasome. Cela signifie qu'inhiber la dégradation d'un des deux partenaires, ou des deux, favorise l'interaction. Autrement dit, une des deux protéines interagit avec l'autre quand elle est vouée à la dégradation. Nous avons vu précédemment que des molécules de MCM7 sont dégradées pendant la phase S, suite à leur ubiquitinylation. Or, Int6 est capable d'interagir avec les formes poly-ubiquitinylées de MCM7. Sachant qu'Int6 interagit avec le protéasome (Hoareau Alves et al., 2002), nous avons pensé au départ à une fonction d'Int6 favorisant la dégradation de MCM7 en guidant ses formes poly-ubiquitinylées vers le protéasome. Cependant, l'effet d'Int6 s'est avéré être l'inverse de ce que nous attendions. En effet, sa surexpression stabilise MCM7 et augmente le niveau de ses formes poly-ubiquitinylées, tandis que sa déplétion par interférence ARN déstabilise MCM7. Cela signifie qu'Int6 inhibe la dégradation de MCM7.

Plusieurs mécanismes pourraient expliquer la protection qu'exerce Int6 sur MCM7 : inhibition de l'ubiquitinylation de MCM7, ou dés-ubiquitinylation, de MCM7, ou inhibition de la prise en charge de ses formes poly-ubiquitinylées par le protéasome. Sachant que la surexpression d'Int6 augmente le niveau des formes poly-ubiquitinylées de MCM7, le scénario à privilégier est une interférence avec la prise en charge par le protéasome des formes poly-ubiquitinylées de MCM7. Ce type de mécanisme a déjà été décrit pour d'autres protéines.

Chez *S. cerevisiae*, la protéine Rad4 est ubiquitinylée suite à l'apparition de dommages à l'ADN, ce qui lui permet de reconnaître la lésion et d'y assembler le complexe de réparation de la voie NER. La dégradation de Rad4 empêche ce processus, traduisant un rôle négatif du protéasome sur la voie NER. C'est pourquoi des levures mutées pour différentes sous unités du protéasome, ou surexprimant Rad4, possèdent une plus forte activité de réparation par cette voie (Lommel et al., 2000). On comprend bien que si Rad4 est dégradée immédiatement après son ubiquitinylation, elle ne peut jouer son rôle normalement. Pour éviter cela, le rôle d'une autre protéine, Rad23, est d'inhiber la dégradation de Rad4, tout comme semble le faire Int6 avec MCM7. En effet, la surexpression de Rad23 dans les levures stabilise Rad4 et favorise l'assemblage du complexe de réparation de l'ADN au niveau de la lésion (Lommel et al., 2002). De plus, cette surexpression entraîne une augmentation du niveau des protéines poly-ubiquitinylées dans la cellule, qui dépend de deux domaines d'interaction avec l'ubiquitine, UBA1 et 2 (« Ubiquitin Associated »), présents dans Rad23 (Hwang et al., 2005). L'accumulation des protéines poly-ubiquitinylées est moins forte si on surexprime Rad23 mutée pour un de ces domaines, et inexistante avec la double mutation. Il apparaît aussi que Rad23 s'auto-stabilise grâce à son domaine UBA2, car sa demi-vie diminue fortement s'il est muté (Heessen et al., 2005). En réponse à des dommages induits par les UV chez l'homme, la protéine XPC (homologue fonctionnel de Rad4) est aussi ubiquitinylée, ce qui augmente sa présence au niveau des lésions de l'ADN (Sugasawa et al., 2005). En fait, il semble que c'est la E3 ligase CUL4-DDB1/2-ROC1 (encore elle) qui reconnaît directement la lésion via DDB2 et y recrute XPC (Fitch et al., 2003). S'ensuit l'ubiquitinylation de XPC mais aussi de la sous unité DDB2. La forme poly-ubiquitinylée de XPC ayant plus d'affinité pour la lésion que celle de DDB2, cette dernière quitte la chromatine et est dégradée par le protéasome (Sugasawa et al., 2005). Bien que XPC et DDB2 soient toutes les deux ubiquitinylées par la même E3 ligase, leur destin n'est pas le même. En effet, XPC est protégée de la dégradation car elle est associée à un des homologues humains de Rad23, HR23B ou HR23A (Masutani et al., 1994). Cette stabilisation de XPC intervient uniquement en présence de dommages à

l'ADN, et nécessite, comme pour Rad4, le domaine UBA2 de HR23B (Heessen et al., 2005; Ng et al., 2003). Ainsi, elle repose sur une reconnaissance directe des chaînes d'ubiquitines à vocation dégradative. En effet, il a été montré que HR23A, *in vitro*, les reconnaît préférentiellement par rapport aux chaînes faisant intervenir les lysines 29 ou 63 (Raasi and Pickart, 2003).

Une autre protéine connue pour protéger de la dégradation les protéines poly-ubiquitinylées est HDAC6 (« Histone Deacetylase 6 »). Malgré son nom, HDAC6 est majoritairement cytoplasmique et exerce son activité déacétylase sur l' α -tubuline, un constituant des microtubules. Le point important est qu'elle interagit avec les chaînes d'ubiquitine via un domaine UBD, le domaine PAZ (« Polyubiquitin Associated Zinc-finger ») (Hook et al., 2002). Lors d'un stress protéique, les protéines mal conformées sont ubiquitinylées et transportées via les microtubules dans un organite spécifique où elles sont dégradées, l'aggresome. HDAC6 étant capable d'interagir à la fois avec la dynéine (moteur moléculaire des microtubules) et avec les chaînes d'ubiquitine, elle participe à ce transport (Kawaguchi et al., 2003). De plus, comme HR23A/B, HDAC6 masquerait via son domaine PAZ les chaînes d'ubiquitine impliquant la lysine 48. En effet, la surexpression de HDAC6 dans des cellules murines déficientes pour la forme endogène augmente le niveau de protéines poly-ubiquitinylées, mais seulement si le domaine PAZ est fonctionnel (Boyault et al., 2006). Cette protection contre la dégradation peut être levée par une interaction entre HDAC6 et p97/VCP, une protéine chaperone qui dissocie les complexes HDAC6-protéines ubiquitinylées. Ainsi, une balance existe entre HDAC6 et p97/VCP pour réguler le devenir des protéines mal conformées.

Nos résultats montrent que la surexpression d'Int6 augmente le niveau des protéines poly-ubiquitinylées dans la cellule. De plus, Int6 interagit avec ces protéines poly-ubiquitinylées. On peut ainsi imaginer un rôle d'Int6 analogue à celui de HR23A/B ou HDAC6, protégeant de la dégradation les formes poly-ubiquitinylées des protéines. Nous avons vu que cette fonction nécessite, pour HR23A/B et HDAC6, les domaines UBA ou PAZ. Aucun domaine de type UBD n'a encore été identifié dans la séquence d'Int6, mais des recherches pourront être effectuées dans ce sens. Par exemple on pourra tester, via une résine d'agarose couplée à l'ubiquitine, la partie d'Int6 lui conférant de l'affinité pour les protéines poly-ubiquitinylées.

III. Modèle possible et problèmes à résoudre

Le rôle protecteur d'Int6 contre la dégradation des protéines, comme pour HDAC6, est tout à fait nouveau. Notre travail a permis d'en identifier au moins une des cibles : MCM7. Celle-ci est ubiquitinylée en phase S, afin d'être dégradée et décrochée de la chromatine. Int6 semble empêcher cette dégradation, jusqu'au moment adéquat auquel MCM7 doit effectivement être dégradée. En l'absence d'Int6, cette dégradation interviendrait prématurément, provoquant des défauts de réplication et des dommages à l'ADN. Dommages qui, finalement, entraînent la mort des cellules par catastrophe mitotique.

Certains problèmes majeurs devront toutefois être résolus :

- pourquoi les cellules appauvries en Int6, présentant des dommages à l'ADN, parviennent tout de même jusqu'en mitose en évitant les différents points de contrôle en phases S et G2 ?
- quelles sont les molécules de MCM7 spécifiquement ubiquitinylées ?
- existe-t-il un signal dissociant Int6 des formes poly-ubiquitinylées de MCM7 pour permettre leur dégradation, et si oui, quel est-il ?

Nous possédons déjà quelques éléments de réponse au premier point. En effet, des données préliminaires indiquent que les cellules appauvries en Int6 sont déficientes pour l'activation de la voie ATR-CHEK1 : en réponse à un traitement à l'hydroxyurée, ces cellules ne parviennent pas à assurer la phosphorylation activatrice de CHEK1. Par ailleurs, les foyers d'ATM qui se forment consécutivement à une irradiation ne sont pas visibles quand Int6 est déplétée. Ces foyers correspondent à l'étape d'activation des points de contrôle en réponse aux lésions de l'ADN. Ces observations suggèrent qu'Int6 est impliquée dans l'activation des points de contrôle du cycle cellulaire (C. Morris). Ainsi, l'absence d'Int6 dérégulerait non seulement la réplication, induisant des dommages à l'ADN, mais aussi l'activation des points de contrôle suite à ces dommages. Ces effets cumulés d'Int6 ne sont sans doute pas tous dus à son rôle protecteur sur MCM7. Nous avons observé qu'Int6 interagit avec d'autres protéines poly-ubiquitinylées, dont l'identification permettra sans doute de mieux cerner la fonction d'Int6 dans le maintien de l'intégrité génomique.

Nous avons vu que les dommages à l'ADN observés en absence d'Int6 sont dus, au moins en partie, à des défauts de réplication émanant d'une déstabilisation de MCM7. L'ubiquitylation de MCM7 a lieu sur la chromatine, et peut donc affecter les molécules engagées dans les fourches de réplication, ou les autres. Au niveau de la fourche, la

dégradation prématurée de MCM7 aurait une conséquence évidente : l'impossibilité de terminer la synthèse d'un réplikon. Un moyen de préciser nos résultats serait de tester le rôle éventuel de PCNA dans la dégradation de MCM7, sachant que cette dernière contient une séquence proche du motif PIP retrouvé dans MCM10 ou CDT1. Un rôle positif, comme pour CDT1, plaiderait en faveur d'une ubiquitinylation de MCM7 au niveau des fourches de réplication, où se trouve PCNA.

Enfin, il faudra aussi mettre en évidence le signal induisant la dégradation de MCM7. Est-ce la rencontre entre deux fourches convergentes ? Est-ce qu'une autre protéine intervient pour dissocier Int6 des formes poly-ubiquitinylées de MCM7, à la manière de p97/VCP pour HDAC6, ou est-ce qu'Int6 ne fait que diminuer l'affinité du protéasome pour les formes ubiquitinylées de MCM7, constituant ainsi un frein à sa dégradation ? Enfin, est-ce que cette dissociation est promue par une modification post-traductionnelle d'Int6 ? Sachant qu'elle ne semble pas ubiquitinylée, et qu'elle contient des sites putatifs de phosphorylation, l'effet de mutations d'Int6 (mimant par exemple sa phosphorylation constitutive) pourra être évalué quant à son affinité pour l'ubiquitine.

B - REGULATION DE MCM7 PAR BRCA1

I. BRCA1 interagit avec MCM7 et stimule son ubiquitinylation

Nous avons montré qu'il existe une interaction *in vivo* entre MCM7 et BRCA1, qui n'intervient pas via les motifs BRCT de BRCA1, car elle est visible en immunoprécipitation avec la moitié N-terminale de BRCA1 (Figure 26). De plus, cette interaction est renforcée par la présence de BARD1 (Figure 27). Sachant que BARD1 est requise pour l'activité E3 ligase de BRCA1, nous avons étudié l'effet du dimère BRCA1-BARD1 sur l'ubiquitinylation de MCM7. Le résultat est net : l'ubiquitinylation de MCM7 est stimulée par la surexpression du dimère BRCA1-BARD1 (Figure 29).

In vivo, l'activité E3 ligase de BRCA1 n'est pas encore bien caractérisée. Deux substrats identifiés sont la γ -tubuline et la protéine CtIP, qui interagit avec la forme phosphorylée de BRCA1. L'ubiquitinylation de la γ -tubuline par BRCA1 contribue à réguler la dynamique des centrosomes (Starita et al., 2004), tandis que la forme ubiquitinylée de CtIP est relocalisée sur la chromatine pour participer à l'activation du point de contrôle G2/M suite à une irradiation (Yu et al., 2006). Cependant, la majorité des données concernant l'activité E3 ligase de BRCA1 sont issues d'observations *in vitro*. On sait par exemple que BRCA1 catalyse la formation de chaînes d'ubiquitine via la lysine 6 (cf. chapitre 1, D). Ce type de chaînes est pris en charge par le protéasome, mais n'a pas de vocation dégradative. Au contraire, les protéines marquées par ce type de chaînes sont plutôt stabilisées. Nous avons observé que l'ubiquitinylation de MCM7, *in vivo*, reste possible même si les lysines 48 et 63 de l'ubiquitine sont mutées. On peut donc envisager que BRCA1 favorise l'ubiquitinylation de MCM7 via la lysine 6 de l'ubiquitine, ce qui stabiliserait MCM7. La mise au point du test d'ubiquitinylation de MCM7 *in vitro* sera déterminante pour valider cette hypothèse, en utilisant différents mutants de l'ubiquitine. Nous pourrions valider les observations *in vitro* en mettant à profit le test d'ubiquitinylation *in vivo* mis au point pour la protéine Rev1 du virus HIV (annexe I). Une observation que nous avons faite semble néanmoins aller dans le sens d'une stabilisation de MCM7 par BRCA1 : lorsque BRCA1 est supprimée par interférence ARN, le niveau de MCM7 baisse (Figure 31).

Une étude récente chez *C. elegans* a montré que l'activité E3 ligase de l'homologue de BRCA1 est stimulée par des dommages à l'ADN induits par une irradiation et localisée aux sites de réparation de l'ADN (Polanowska et al., 2006). Les auteurs ont montré que cette stimulation requiert les homologues d'ATM et Mre11. Par ailleurs, une autre étude a démontré que BARD1 augmente l'affinité de BRCA1 pour la chromatine (Simons et al., 2006). Il semble donc que l'activité de BRCA1-BARD1 s'exerce préférentiellement au niveau de la chromatine. Concernant MCM7, son ubiquitinylation sur la chromatine est effectivement stimulée par BRCA1 (Figure 30). Comme nous avons aussi montré qu'une irradiation favorise l'ubiquitinylation de MCM7 (Figure 25), nous avons décidé d'étudier l'effet de BRCA1 sur l'ubiquitinylation de MCM7 en présence de dommages à l'ADN.

II. BRCA1 stimule l'ubiquitinylation de MCM7 intervenant en réponse à des dommages de l'ADN

Nous évoquions précédemment la possibilité d'une ubiquitinylation non dégradative de MCM7 stimulée par BRCA1. Une expérience a conforté cette hypothèse : si l'on effectue une irradiation des cellules en présence ou en absence de MG132, le niveau des formes poly-ubiquitinylées de MCM7 augmente de la même façon (non représenté). Cela signifie que MCM7 n'est pas dégradée suite à l'irradiation. Elle est donc ubiquitinylée, mais pas dégradée ; d'où l'idée d'une ubiquitinylation non dégradative. Cette observation est différente de ce qui est connu par exemple pour CDT1, qui est dégradée en réponse à des dommages de l'ADN, suite à son ubiquitinylation par le complexe CUL4-DDB1-ROC1 (Senga et al., 2006). Par contre, la stabilisation de protéines impliquées dans les réponses aux dommages de l'ADN a déjà été observée. La claspine, par exemple, est soumise à une protéolyse pendant tout le cycle cellulaire, exceptée la phase S (Bennett and Clarke, 2006). Sa dégradation dépend de sa phosphorylation par la kinase Plk1 puis de son ubiquitinylation par le complexe SCF ^{β -TrCp}, mais est inhibée lorsque les fourches de réplication subissent un blocage (Mailand et al., 2006; Mamely et al., 2006; Peschiaroli et al., 2006). Après la réparation des dommages, le redémarrage des fourches est rendu possible par la reprise de la dégradation de la claspine. Cette protéine est aussi stabilisée lorsque des cassures double brin sont introduites dans l'ADN par une irradiation : tout comme 53BP1, un autre médiateur de l'activation des points de contrôle, c'est sa désubiquitinylation par l'enzyme USP28 qui assure la stabilisation observée (Zhang et al., 2006). On voit donc que l'ubiquitinylation est centrale dans la réponse

aux dommages de l'ADN. Elle est stimulée dans le cas de CDT1, comme MCM7, mais inhibée dans le cas de la claspine.

La cas de MCM7 semble cependant différent des autres : son ubiquitinylation dépendant de BRCA1 semble la stabiliser, et non provoquer sa dégradation. Elle intervient en présence ou en absence de dommages, quand MCM7 est présente sur la chromatine, donc lors des phases G1 et/ou S. A partir de ces observations, nous allons essayer de comprendre la fonction de l'ubiquitinylation de MCM7 dépendant de BRCA1.

III. Quelle est la fonction de l'ubiquitinylation de MCM7 dépendant de BRCA1 ?

1. Localisation de l'ubiquitinylation de MCM7

Dans une cellule qui n'est pas soumise à un stress génotoxique d'origine exogène, la principale source de cassures double brin est l'effondrement des fourches de réplication, à la réparation desquelles participerait BRCA1 (cf. chapitre 1, D). En supposant que MCM7 est ubiquitinylée par BRCA1 au niveau de ces fourches, on pourrait penser que l'irradiation, qui induit des cassures de partout dans le génome, active des réponses qui interviennent de manière beaucoup plus discrète au niveau des fourches pendant une phase S normale. Dans ce cas, quelle serait l'utilité pour la cellule de stabiliser MCM7 aux fourches, via son ubiquitinylation par BRCA1 ?

Quand la fourche de réplication s'effondre, les ADN polymérase peuvent se dissocier de l'ADN, mais pas les protéines MCM, car leur re-chargement sur la chromatine est impossible pendant la phase S (cf. chapitre 1, A). Le maintien des MCM est donc primordial pour pouvoir relancer les fourches de réplication (Trenz et al., 2006). Or, nous avons vu que MCM7 est ubiquitinylée pendant la phase S, afin d'être dissociée de la chromatine. On pourrait ainsi imaginer une compétition entre les ubiquitinylation dégradative et non dégradative de MCM7. Quand les fourches seraient effondrées, l'ubiquitinylation de MCM7 via BRCA1 pourrait bloquer les lysines acceptrices de MCM7 pour l'ubiquitinylation pro-dégradative, et ainsi empêcher sa dégradation et son départ de la chromatine. Ainsi, en absence de BRCA1 les protéines MCM ne pourraient pas être stabilisées au niveau des fourches, provoquant l'accumulation de cassures double brin observée dans les cellules mutées pour BRCA1. Rappelons ici que la plupart des mutations identifiées de BRCA1 identifiées chez l'homme altèrent son activité E3 ligase.

L'identification du (des) site(s) d'ubiquitinylation de MCM7, parmi les 32 lysines que comporte cette protéine, sera donc primordiale.

D'autre part, l'ubiquitinylation de MCM7 au niveau des origines de réplication est envisageable. Tout d'abord, les origines dormantes. Elles servent de réserve à la cellule pour initier de nouveaux réplicons et terminer la réplication après la réparation des dommages (Woodward et al., 2006). La stabilisation de MCM7 au niveau des origines dormantes pourrait indiquer à la cellule lesquelles devront être initiées. Le mécanisme pourrait être le suivant : BRCA1 est recrutée aux foyers de réparation via la forme phosphorylée de H2AX, dont la présence s'étend bien au-delà de la simple lésion, et lorsque BRCA1 entre en contact avec une origine dormante, elle favorise l'ubiquitinylation de MCM7 sur cette origine. Cela pourrait d'ailleurs être une des fonctions de l'étendue du marquage des cassures double brin par H2AX, par rapport à la localisation de la lésion à proprement parler. Une autre hypothèse, en considérant que l'ubiquitinylation pro-dégradative de MCM7 participe à l'inactivation de ces origines dormantes, est encore une fois une compétition afin de maintenir ces origines fonctionnelles quand l'ADN est endommagé.

Une autre fonction de l'ubiquitinylation non dégradative de MCM7 pourrait être de bloquer l'initiation des origines de réplication en présence de dommages à l'ADN : toutes les origines pendant le point de contrôle G1/S, ou les origines tardives pendant le point de contrôle intra-S. Une des caractéristiques de l'initiation des origines est le recrutement de cdc45 et son interaction avec le complexe MCM. Une étude a montré que l'interaction entre MCM7 et cdc45 est bloquée par la kinase CHK1 activée par des dommages à l'ADN, sans que l'association de MCM7 avec la chromatine soit affectée (Liu et al., 2006). Bien qu'ils aient montré que la baisse de l'activité de CDK2 n'est pas impliquée, les auteurs n'ont pas identifié le mécanisme exact de cette inhibition. Pourquoi ne pas évoquer l'ubiquitinylation de MCM7 ? Celle-ci masquerait le site d'interaction avec cdc45, ou empêcherait l'interaction par encombrement stérique, tout en stabilisant MCM7 sur la chromatine en attendant l'inactivation de CHK1 et l'initiation des origines.

2. Activations des points de contrôle, réparation de l'ADN ?

MCM7 est impliquée dans l'activation des points de contrôle de phase S en réponse à différents stress génotoxiques. En effet elle interagit avec RAD17 d'une part (Tsao et al., 2004) et avec ATRIP, le partenaire d'ATR, d'autre part (Cortez et al., 2004). Comme ATR est recrutée à la chromatine par ATRIP, MCM7 participe au point de contrôle de réplication en

favorisant l'accumulation d'ATR au niveau des fourches bloquées. C'est sans doute pourquoi une déplétion de MCM7 par interférence ARN entraîne des défauts d'activation du point de contrôle de réplication, mais aussi du point de contrôle intra-S suite à une irradiation (Cortez et al., 2004). En effet, bien qu'ATR soit surtout connue pour contrôler la progression correcte des fourches de réplication (cf. chapitre 1, B), sa fonction dans la réponse aux cassures double brin en dehors des fourches est en train d'émerger. En effet, ATR est activée après une irradiation via ATM et Mre11 (Myers and Cortez, 2006). En réponse à des cassures double brin en dehors des fourches, elle participe non seulement à la réparation de l'ADN par recombinaison homologue (Wang et al., 2004), mais aussi à l'activation des points de contrôle (Garcia-Muse and Boulton, 2005). Ainsi, la stabilisation de MCM7 par son ubiquitinylation dépendant de BRCA1 pourrait favoriser le recrutement des facteurs participant à la réparation et à la signalisation des cassures double brin de l'ADN, au niveau des fourches ou ailleurs.

Une autre caractéristique intéressante de MCM7 est son interaction avec SMC1 (« Structural Maintenance of Chromosome 1 »), une des sous unités du complexe cohésine (Ryu et al., 2006). Ce complexe a pour fonction de maintenir entre elles les chromatides sœurs pendant la réplication et la réparation de l'ADN, mais il est aussi impliqué dans l'activation des points de contrôle de phase S en réponse à une irradiation ou à un blocage des fourches (pour revue : (Lehmann, 2005)). Là encore, l'effet de l'ubiquitinylation stabilisatrice de MCM7 sur son interaction avec SMC1 pourra être analysé.

IV. Conclusion et perspectives immédiates

Il est intéressant d'établir un parallèle entre MCM7 et une autre protéine, elle aussi ubiquitinylée, la RNA polymérase II. Pourquoi ? Tout d'abord car cette enzyme est poly-ubiquitinylée, sur la chromatine, via les lysines 6, 48 ou 63 de l'ubiquitine (Jung and Lippard, 2006). De plus, son ubiquitinylation non dégradative touche une fraction de l'ensemble des molécules engagées dans la transcription, alors que son ubiquitinylation dégradative intervient suite à des dommages de l'ADN interférant avec sa progression, entraînant sa dissociation de l'ADN. Bien que la dégradation de MCM7 intervienne, elle, en absence de dommages, on constate que dans les deux cas, deux ubiquitinylations différentes entraînent deux devenir différents. De plus, la RNA polymérase II est un substrat, *in vitro*, de l'activité E3 ligase de BRCA1 (Krum et al., 2003; Starita et al., 2005). Certaines de nos observations suggèrent que MCM7 est un substrat de BRCA1, comme la stimulation de son ubiquitinylation par la

surexpression du dimère BRCA1-BARD1, notamment après une irradiation. Cependant, cela ne nous permet pas d'affirmer formellement que BRCA1 est une des E3 ligases de MCM7. En effet, elle pourrait simplement favoriser l'ubiquitylation de MCM7 sans en être directement responsable, comme elle le fait lors de la mono-ubiquitylation de FANCD2 par exemple (cf. chapitre 1, E). Le test d'ubiquitylation de MCM7 *in vitro*, dont la plupart des composants ont déjà été purifiés, sera donc déterminant car il nous permettra de confirmer le rôle exact de BRCA1. Ce test pourra être assorti de l'étude de l'ubiquitylation de MCM7 après irradiation de cellules déficientes pour BRCA1, qui pourront être complétées par l'expression ectopique de différentes formes mutées de BRCA1.

C - TAX DEREGLUE-T-ELLE LA REPLICATION ?

L'oncoprotéine Tax est capable de transformer les cellules en dérégulant différents mécanismes qui maintiennent l'intégrité génomique, tels que les points de contrôle du cycle cellulaire ou la réparation de l'ADN (pour revue : (Marriott and Semmes, 2005)). Peu d'études traitent de son activité sur la réplication de l'ADN, mais à ce sujet deux exemples sont à noter. Tout d'abord, Tax provoque l'activation prématurée du complexe APC (normalement actif en mitose), entraînant l'ubiquitinylation et la dégradation de la protéine F-Box Skp2, et ainsi l'inactivation du complexe SCF^{Skp2} pendant la phase S (Kuo and Giam, 2006). Ceci est susceptible d'entraîner des défauts de réplication, car la dégradation de CDT1 dépend en partie de ce complexe. Par ailleurs, Tax favorise la dégradation de la protéine Rb en la guidant vers le protéasome, sans qu'aucune ubiquitinylation ne soit requise (Kehn et al., 2005). Sachant que Rb est un inhibiteur de MCM7 (Sterner et al., 1998), sa déstabilisation pourrait être un autre moyen employé par Tax pour déréguler la réplication.

Nos observations apportent une autre indication de l'effet de Tax sur la réplication. Celle-ci est en effet stimulée dans des cellules 293T qui expriment Tax de manière stable (Figure 37). Cette stimulation reste toutefois modeste, sans doute car la réplication de ces cellules déjà très transformées est sur-activée. L'effet de Tax serait donc en quelque sorte « noyé ». Il sera donc intéressant de tester l'effet de Tax sur la réplication de cellules primaires. La stimulation de la réplication par Tax pourrait s'expliquer par ses effets sur Skp2 et Rb, mais aussi MCM7. En effet, nous avons montré que Tax interagit avec MCM7 en complexe avec MCM4 et 6 (Figures 34 et 35) et entraîne une augmentation de son niveau sur la chromatine (Figure 37). L'interaction entre Tax et MCM7 est également visible sur la chromatine.

Nous avons pensé que ces observations traduisaient un effet de Tax sur la fonction de MCM7 la mieux connue à l'époque, à savoir l'activité hélicase. Pour vérifier cela, il fallait mettre au point un test de l'activité hélicase *in vitro* du complexe MCM4,6,7, ce qui a déjà été réalisé pour le même complexe murin ou de levure (Ishimi, 1997; Lee and Hurwitz, 2001). Les protéines MCM4, 6 et 7 et Tax ont été purifiées après avoir été exprimées dans des cellules d'insecte infectées par des baculovirus (Figure 38). Malheureusement, nous ne sommes pas parvenus à obtenir une forte activité hélicase pour le complexe purifié. Cela peut être dû à une particularité du complexe humain par rapport au complexe murin (ou de levure),

mais le problème principal est sans doute le manque de co-facteurs importants pour l'activité hélicase du complexe. Outre la présence des six protéines MCM, dont l'activité hélicase a effectivement été démontrée *in vitro* (Ying and Gautier, 2005), la présence de cdc45 et des protéines GINS semble requise. En effet, il apparaît que l'hélicase répliquative est constituée et du complexe MCM, et de ces protéines, d'où la notion d'un ensemble protéique complexe, l'hélicosome (« unwindosome ») (Pacek et al., 2006). Enfin, la protéine MCM8, qui participe chez le xénope à l'activité hélicase de la fourche de réplication (Maiorano et al., 2005), pourrait être aussi requise pour un test d'activité hélicase *in vitro* se rapprochant le plus possible des conditions *in vivo*.

Une autre hypothèse à envisager est l'inhibition de la dissociation de MCM7 de la chromatine pendant la phase S, qui expliquerait l'augmentation du niveau chromatinien de MCM7. Nous avons vu que cette dissociation de MCM7 dépend en partie de son ubiquitinylation. Il serait donc intéressant d'étudier l'ubiquitinylation de MCM7 au cours de la phase S dans des cellules infectées par Tax ou exprimant Tax de manière stable (comme nos lignées par exemple). En effet, la dégradation prématurée de Skp2, provoquée par Tax en phase S, pourrait très bien concerner d'autres E3 ligases, dont celle qui catalyse l'ubiquitinylation dégradative de MCM7 pendant la phase S (il faudra toutefois déterminer quelle est cette E3 ligase...). En tout cas, freiner la dissociation de MCM7 de la chromatine pourrait favoriser des événements de ré-initiation de la réplication et causer des lésions à l'ADN.

Pour conclure, le point qui sera certainement le plus important à vérifier ne concerne pas directement la réplication de l'ADN, mais plutôt l'activation des points de contrôle de phase S. En effet, MCM7 est maintenant reconnue comme un élément important de l'activation de ces points de contrôle, comme nous l'avons vu précédemment. Par ailleurs, Tax est capable d'interagir avec les kinases CHK1 et CHK2 pour les déréguler, entraînant une atténuation de l'arrêt en G2/M et de l'apoptose de cellules irradiées (Haoudi et al., 2003; Park et al., 2004; Park et al., 2006). De la même manière, il se pourrait que Tax interfère avec la fonction de MCM7 lors de l'activation des points de contrôle de phase S, permettant à la cellule de continuer à répliquer son ADN même si celui-ci est endommagé. Dans ce modèle, la légère stimulation de la réplication que nous observons correspondrait seulement à la synthèse continue de l'ADN dans les cellules présentant des dommages à l'ADN parmi la population cellulaire totale. Ainsi, petit à petit, Tax permettrait aux cellules infectées par HTLV-1 de proliférer en dépit des dommages à leur génome, induisant leur transformation progressive.

Conclusion

L'ubiquitinylation apparaît aujourd'hui comme une régulation majeure des protéines impliquées dans le métabolisme de l'ADN. A ce propos, des exemples de substrats (CDT1, claspine, XPC) et d'enzymes E3 ligases (CUL4-DDB1-ROC1, SCF^{Skp2}, BRCA1-BARD1) commencent à être bien documentés. De l'ensemble de ces études émergent deux points importants. Tout d'abord, l'ubiquitinylation d'une protéine, que ce soit par différentes E3 ligases, ou par différents types de chaîne d'ubiquitines, peut avoir des conséquences totalement opposées. Ensuite, il apparaît que la chromatine constitue un compartiment subcellulaire dans lequel l'ubiquitinylation est active. Ces deux points se vérifient pour nombre de protéines du métabolisme de l'ADN, dont l'abondance ainsi que la localisation et l'activité doivent être régulées différemment en fonction de la phase du cycle cellulaire ou de l'état de l'ADN. Ces régulations sont nécessairement complexes car l'intégrité du génome en dépend. L'ubiquitinylation répond parfaitement à cette nécessité de complexité ; il semble d'ailleurs que parmi toutes les modifications post-traductionnelles connues actuellement, ce soit la seule capable d'apporter une telle finesse de régulation.

Nos travaux concernant MCM7 apportent un exemple supplémentaire du rôle de l'ubiquitinylation dans le métabolisme de l'ADN. Pendant la réplication, la dissociation de MCM7 de la chromatine dépend, en partie, de son ubiquitinylation dégradative. La proto-oncoprotéine Int6 intervient alors en aval de l'ubiquitinylation de MCM7 pour réguler sa dégradation : c'est la voie MCM7-Int6. MCM7 est également ubiquitinylée en réponse à des dommages à l'ADN, à l'issue d'une voie qui fait intervenir le suppresseur de tumeur BRCA1, mais dont la finalité n'est pas la protéolyse de MCM7. Cette voie BRCA1-MCM7 pourrait participer au signalement et/ou à la réparation des lésions de l'ADN.

Le phénotype des cellules déficientes pour Int6 indique que cette protéine est nécessaire au maintien de l'intégrité génomique. Ceci confirme sa capacité à induire des tumeurs mammaires lorsqu'elle est tronquée. La régulation de la dégradation de protéines telles que MCM7 est sans doute une des fonctions d'Int6 qui est défaillante dans l'oncogenèse des cellules mammaires. Par ailleurs, la mutation de la protéine BRCA1 est une autre cause de transformation des cellules mammaires, puisqu'elle confère une forte prédisposition au cancer du sein. Là encore, la défaillance de la fonction de BRCA1 dans l'ubiquitinylation de MCM7 en réponse aux lésions de l'ADN pourrait être une des caractéristiques de l'oncogenèse.

Mes travaux de thèse mettent donc en relation Int6 et BRCA1, deux protéines qui à priori n'avaient aucun rapport si ce n'est d'être l'une et l'autre requises pour éviter la transformation des cellules mammaires. L'ubiquitinylation de MCM7 pourrait constituer le point de convergence entre les voies de maintien de l'intégrité génomique qui font intervenir Int6 et BRCA1. On peut donc légitimement s'interroger sur l'existence d'une voie commune BRCA1-MCM7-Int6, dans laquelle l'ubiquitinylation de MCM7 serait centrale. Cette voie impliquerait Int6 dans la propagation du message initié, lorsque l'ADN est endommagé, par l'ubiquitinylation de MCM7 via BRCA1. Dans cette optique, le phénotype des cellules déficientes pour Int6 serait dû non seulement à des lésions de l'ADN causées par des défauts de réplication (voie MCM7-Int6), mais surtout à une incapacité à répondre à ces lésions (voie BRCA1-MCM7-Int6). De la même manière, l'absence d'Int6 comme de BRCA1 conduirait *in vivo* à la même instabilité génomique des cellules mammaires, puis à la formation de tumeurs.

Contrairement à BRCA1, les fonctions d'Int6 dans le maintien de l'intégrité du génome ne sont pas encore bien documentées. Les mettre en évidence, notamment dans le cadre de l'ubiquitinylation des protéines, permettra certainement de mieux comprendre l'oncogenèse des cellules mammaires.

Annexes

A - PUBLICATION N°2

Modulation of HIV-1 Rev protein abundance and activity by poly-ubiquitination with unconventional Lys-33branching

Anne-Laure Vitte, Samuel Buchsbaum, Pierre Jalinot

(accepté le 9 octobre 2006 par FEBS Letters)

The HIV-1 Rev protein plays a key role in virus replication by allowing export to the cytoplasm of unspliced or singly-spliced RNAs. In this report, we investigated whether Rev is modified by ubiquitination or sumoylation. Whereas no evidence of sumoylation was obtained, transient expression experiments showed that ubiquitin conjugates to Rev as high molecular weight poly-ubiquitin chains. Mutation of the three lysine residues of Rev showed that the site of ubiquitin conjugation is Lys-115. Experiments with ubiquitin mutants including a single lysine at every seven possible position indicated that branching of the poly-ubiquitin chains mainly involves Lys-33. Mutation of Rev Lys-115 to arginine reduces markedly the steady state amount of the protein, but does not impair its ability to export RNA via the Rev response element. These observations support the notion that poly-ubiquitination of Rev stabilizes the viral protein but hinders its activity.

B - MATÉRIELS ET MÉTHODES SUPPLÉMENTAIRES

I. Protéines recombinantes

1. Tampons utilisés et cultures cellulaires

Tampon NL : 50 mM NaH₂PO₄ ; 500 mM NaCl ; 10 mM imidazole.

Tampon NE : 50 mM NaH₂PO₄ ; 500 mM NaCl ; 300 mM imidazole.

Tampon NW : 50 mM NaH₂PO₄ ; 500 mM NaCl ; 20 mM imidazole.

Tampon U : 10 mM Hepes pH 7,9 ; 60 mM KCl ; 5 mM MgCl₂ ; 5% glycerol.

Tampons F₁₅₀/F₃₀₀/F₄₅₀/F₆₀₀/F₁₀₀₀ : Hepes 50 mM pH 7,6 ; 150/300/450/600/1000 mM acétate de sodium ; 10 mM acétate de magnésium ; 0,05% NP40 ; 10% glycerol ; 0,5 mM TCEP (Sigma) ; 0,5 mM AEBSF (pefabloc, Roche).

Les bactéries sont cultivées dans du milieu LB contenant 100 mg/mL d'ampicilline (Sigma), à 37°C sous une agitation de 220 tours par minute.

Cellules d'insecte SF21 : culture à 28°C en adhérence (flasques de 162 cm²) ou en suspension (en erlenmeyers, sous agitation de 130 tpm, le volume de culture ne dépassant pas 30% du volume de l'erlenmeyer) dans du milieu SFII900-SFM (Invitrogene). Pour les cultures en suspension, le milieu de culture contient 0,1% de Pluronic F100 (Sigma) et les cellules ayant atteint une concentration de 2-3.10⁶/mL sont diluées à 0,5.10⁶/mL.

2. Production de His-ubcH5c

a) Expression en bactéries

Des bactéries BL21 codon+ RP sont transformées par le vecteur pET3E-His-ubcH5c. Une pré-culture de 10 mL est faite pendant 18h. 800 mL sont ensuite inoculés par 8 mL de pré-culture et la culture est prolongée à 37°C jusqu'à obtenir une DO_{600nm} de 0,6 environ. L'induction de l'expression est effectuée par 0,2 mM d'IPTG pendant 3 heures à 28°C. Les bactéries sont alors centrifugées pendant 25 minutes à 4000 tpm.

Le culot bactérien est repris dans 12 mL de tampon NL puis le mélange est amené, par ajout, à 0,1 mg/mL de lysozyme, 1% de Triton X100, ainsi que 0,5 mM TCEP (Sigma) et 0,5 mM

AEBSF (pefabloc, Roche). La lyse est prolongée 30 minutes sur glace puis finalisée par 10 sonications de 15 secondes sur glace. Les débris sont centrifugés pendant 30 minutes à 9500 tpm, puis le surnageant est filtré à travers un filtre millipore 0,45 µm.

Les protéines correspondant à 3mL de surnageant sont précipitées par une incubation de 1h30 sur glace avec 60% de sulfate d'ammonium (ajout aux protéines de 4,5 mL de sulfate d'ammonium à 3,8 M), puis une centrifugation de 30 minutes à 9500 tpm. Elles sont ensuite reprises dans 8 mL de tampon NL supplémenté par 5 mM de β-mercaptoéthanol et dialysées contre 1 L du même tampon pendant 20 heures à 4°C.

b) Purifications

Les protéines, qui sont dans 8 mL de tampon NL supplémenté par 5 mM de β-mercaptoéthanol, sont incubées avec 1,5 mL de résine Ni-NTA (Qiagen) pendant 2 heures à 4°C avec agitation. La résine est ensuite lavée quatre fois par 4 mL de tampon NW, puis les protéines sont décrochées par 6 éluions de 3 mL de tampon NE. Les 3 éluions contenant le plus de protéines sont rassemblées et les protéines reconcentrées par une centrifugation de 1 heure dans un Amicon 10K (Millipore), reprises dans 4 mL de tampon U, puis reconcentrées à nouveau de la même manière. On estime à 400 le facteur de dilution des composants du tampon NE.

Les protéines sont ensuite séparées par une gel filtration sur colonne SuperdexTM 200 (« prep grade », Amersham), effectuée à 4°C dans le tampon U. Les 7 fractions d'éluion les plus riches en protéine His-ubcH5C sont rassemblées, et la protéine est reconcentrée par centrifugation dans un Amicon 10K. La concentration de la protéine est déterminée par un dosage densitométrique sur gel d'acrylamide 12% dénaturant coloré au bleu de Coomassie. Nous avons estimé la concentration de His-ubcH5c finale à environ 2 µg/µL.

3. Production de FLAG-MCM7 et FLAG-Tax

a) Expression en cellules d'insecte (lignée SF21)

FLAG-MCM7 : $2 \cdot 10^8$ cellules SF21 (en suspension à $1 \cdot 10^6$ /mL dans du milieu SFII900-SFM (Invitrogene)) sont infectées par le baculovirus FLAG-MCM7 à une multiplicité d'infection d'environ 5 pendant 48 heures.

FLAG-Tax : $2 \cdot 10^8$ cellules SF21 (réparties dans 5 flasques de 162cm² contenant 20 mL de milieu SFII900-SFM (Invitrogene)) sont infectées par le baculovirus FLAG-Tax à une multiplicité d'infection d'environ 5 pendant 72 heures.

Les cellules sont récupérées et centrifugées à 1000 tpm pendant 15 minutes, puis lavées deux fois dans du PBS1X. Elles sont finalement reprises dans du PBS1X à une concentration de 5.10^7 /mL et la suspension est congelée goutte à goutte directement dans de l'azote liquide. Les billes obtenues sont transférées dans un tube à -80°C .

b) Purifications

i. Lyse des cellules

2.10^8 cellules SF21 congelées sous forme de billes sont lysées dans 10 mL de tampon F_{150} pendant 45 minutes sur glace, puis soniquées 5 fois 10 secondes. Le lysat est centrifugé à 9500 tpm pendant 30 minutes (4°C) puis filtré à travers une membrane Millipore $0,45\ \mu\text{m}$. Les purifications successives sont ensuite effectuées à 4°C .

ii. Colonne héparine

Le lysat obtenu est passé deux fois de suite sur 3 mL de résine d'héparine (« Hyper D », BioSeptra) équilibrée au préalable avec le tampon F_{150} . Les protéines sont décrochées de la résine par 5 éluions de 5 mL de tampon F_{150} , F_{300} , F_{450} , F_{600} et F_{1000} . FLAG-MCM7 : les éluions F_{300} , F_{450} et F_{600} sont rassemblées. FLAG-Tax : les éluions F_{150} , F_{300} et F_{450} sont rassemblées.

iii. Colonne anti-FLAG M2

2 mL de résine anti-FLAG M2 (Sigma) sont équilibrés avec du tampon F_{450} (FLAG-MCM7) ou F_{300} (FLAG-Tax) puis incubés avec les éluions de la résine d'héparine pendant 1h30 avec agitation. La résine anti-FLAG M2 est ensuite lavée deux fois avec 10 mL de tampon F_{450} (FLAG-MCM7) ou F_{300} (FLAG-Tax) puis une fois avec 10 mL de tampon F_{150} . Les protéines sont ensuite décrochées par 5 éluions de 2 mL de tampon F_{150} contenant $0,1\ \text{mg/mL}$ de peptide FLAG (Sigma), puis reconcentrées par centrifugation dans un Amicon 10K (Millipore). Les protéines sont ensuite aliquotées, congelées dans de l'azote liquide et conservées à -80°C .

4. Production du complexe MCM4,6,7

a) Expression en cellules d'insecte (lignée SF21)

$2,5.10^8$ cellules SF21 (en suspension à 1.10^6 /mL dans du milieu SFII900-SFM (Invitrogene)) sont infectées par les baculovirus HA-MCM4, His-MCM6 et FLAG-MCM7 à une multiplicité d'infection d'environ 5 pendant 72 heures. Les cellules sont récupérées par une centrifugation à 1000 tpm pendant 15 minutes, puis lavées deux fois dans du PBS1X. Le culot est congelé entier dans de l'azote liquide et conservé à -80°C .

b) Purifications

Le culot de cellules est lysé dans 20 mL de tampon F₁₅₀ pendant 30 minutes sur glace. Le lysat obtenu est centrifugé à 9500 tpm pendant 30 minutes à 4°C, filtré à travers une membrane Millipore 0,45 µm, et incubé pendant 2h30 à 4°C avec 2 mL de résine anti-FLAG M2 préalablement équilibrés avec du tampon F₁₅₀. La résine est ensuite lavée à trois reprises par 10 mL de tampon F150 et les protéines sont décrochées par 6 éluions de 2 mL de tampon F150 contenant 0,1 mg/mL de peptide FLAG (Sigma). Les éluions 2 à 6 sont rassemblées et les protéines qu'elles contiennent sont précipitées par une saturation de 40% en sulfate d'ammonium. Les protéines sont ensuite reprises dans 500 µL de tampon F₁₅₀ et dialysées contre le même tampon pendant 1h30.

Les protéines reconcentrées sont séparées en fractions de 1 mL par une gel filtration sur colonne SuperdexTM 200 (« prep grade », Amersham) dans du tampon F₁₅₀ et à 4°C. Les 10 éluions contenant le plus de complexes MCM sont rassemblées, et les protéines sont à nouveau reconcentrées par une précipitation au sulfate d'ammonium, reprises dans 200 µL de tampon F₁₅₀, aliquotées et congelées à -80°C.

NB : on peut remplacer les deux étapes de reconcentration au sulfate d'ammonium par des centrifugations dans des Amicons 10 K (Millipore).

II. Test d'activité hélicase *in vitro*

1. Préparation du substrat

a) Marquage radioactif de l'oligonucléotide

10 pmol d'oligonucléotide (5'-TTTTCCCAGTCACGACGTTGTAAAACGACGGCCAGT-(TTA)₁₇-3') sont marquées en 5' avec 7 µL de [γ -³³P]ATP (10 mCi/mL) et 0,5 U de T4 polynucleotide Kinase (Biolabs) dans un volume total de 40 µL contenant 4 µL de tampon PNK 10X (Biolabs). L'incubation est de 30 minutes à 37°C. L'oligonucléotide marqué est purifié sur colonne de sepharose G25 (Pharmacia).

b) Hybridation avec l'ADN de phage M13

105 fmol d'ADN de phage M13 simple brin (Biolabs) sont incubées avec 100 fmol d'oligonucléotide marqué radioactivement dans un volume de 50 µL (20 mM Tris pH 7,4 ; 10 mM MgCl₂ ; 25 mM NaCl) pendant 10 minutes à 98°C. L'hybridation est ensuite effectuée en

diminuant progressivement la température jusqu'à la température ambiante. La concentration du substrat obtenu est alors de 20 fmol/ μ L.

2. Activité hélicase

5 fmol de substrat radioactif sont incubées avec différentes quantités de complexe MCM4,6,7 dans 16 μ L de mélange réactionnel (25 mM Hepes-NaOH pH 7,5 ; 25 mM acétate de sodium ; 12.5 mM acétate de magnésium ; 4 mM ATP ; 1 mM DTT ; 0.1 mg/ml BSA) pendant 1 heure à 37°C. La réaction est arrêtée par 4 μ L de tampon de charge (100 mM EDTA ; 0,5% SDS ; 0,1% xylene cyanol ; 0,1% bleu bromophénol ; 25% glycérol) pendant 5 minutes sur glace, puis l'ensemble est déposé sur gel de polyacrylamide 12%, TBE 0,5X, SDS 0,1%. La migration est de 45 minutes à 150 V dans du tampon TBE 0,5X.

Références bibliographiques

- Agarwal, M.L., Agarwal, A., Taylor, W.R., Chernova, O., Sharma, Y. and Stark, G.R. (1998) A p53-dependent S-phase checkpoint helps to protect cells from DNA damage in response to starvation for pyrimidine nucleotides. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 14775-14780.
- Alter, B.P. (2003) Cancer in Fanconi anemia, 1927-2001. *Cancer*, **97**, 425-440.
- Andreassen, P.R., D'Andrea, A.D. and Taniguchi, T. (2004) ATR couples FANCD2 monoubiquitination to the DNA-damage response. *Genes Dev*, **18**, 1958-1963.
- Aparicio, O.M., Weinstein, D.M. and Bell, S.P. (1997) Components and dynamics of DNA replication complexes in *S. cerevisiae*: redistribution of MCM proteins and Cdc45p during S phase. *Cell*, **91**, 59-69.
- Arias, E.E. and Walter, J.C. (2005) Replication-dependent destruction of Cdt1 limits DNA replication to a single round per cell cycle in *Xenopus* egg extracts. *Genes Dev*, **19**, 114-126.
- Arias, E.E. and Walter, J.C. (2006) PCNA functions as a molecular platform to trigger Cdt1 destruction and prevent re-replication. *Nat Cell Biol*, **8**, 84-90.
- Avkin, S., Sevilya, Z., Toubé, L., Geacintov, N., Chaney, S.G., Oren, M. and Livneh, Z. (2006) p53 and p21 regulate error-prone DNA repair to yield a lower mutation load. *Mol Cell*, **22**, 407-413.
- Bailly, V., Lauder, S., Prakash, S. and Prakash, L. (1997) Yeast DNA repair proteins Rad6 and Rad18 form a heterodimer that has ubiquitin conjugating, DNA binding, and ATP hydrolytic activities. *J Biol Chem*, **272**, 23360-23365.
- Ballabeni, A., Melixetian, M., Zamponi, R., Masiero, L., Marinoni, F. and Helin, K. (2004) Human geminin promotes pre-RC formation and DNA replication by stabilizing CDT1 in mitosis. *Embo J*, **23**, 3122-3132.
- Bao, S., Lu, T., Wang, X., Zheng, H., Wang, L.E., Wei, Q., Hittelman, W.N. and Li, L. (2004) Disruption of the Rad9/Rad1/Hus1 (9-1-1) complex leads to checkpoint signaling and replication defects. *Oncogene*, **23**, 5586-5593.
- Bartek, J. and Lukas, J. (2001) Mammalian G1- and S-phase checkpoints in response to DNA damage. *Curr Opin Cell Biol*, **13**, 738-747.
- Baumann, P., Benson, F.E. and West, S.C. (1996) Human Rad51 protein promotes ATP-dependent homologous pairing and strand transfer reactions in vitro. *Cell*, **87**, 757-766.
- Bendjennat, M., Boulaire, J., Jascur, T., Brickner, H., Barbier, V., Sarasin, A., Fotedar, A. and Fotedar, R. (2003) UV irradiation triggers ubiquitin-dependent degradation of p21(WAF1) to promote DNA repair. *Cell*, **114**, 599-610.
- Bennett, L.N. and Clarke, P.R. (2006) Regulation of Claspin degradation by the ubiquitin-proteasome pathway during the cell cycle and in response to ATR-dependent checkpoint activation. *FEBS Lett*, **580**, 4176-4181.
- Bhattacharyya, A., Ear, U.S., Koller, B.H., Weichselbaum, R.R. and Bishop, D.K. (2000) The breast cancer susceptibility gene BRCA1 is required for subnuclear assembly of Rad51 and survival following treatment with the DNA cross-linking agent cisplatin. *J Biol Chem*, **275**, 23899-23903.

- Bhaumik, D. and Wang, T.S. (1998) Mutational effect of fission yeast polalpha on cell cycle events. *Mol Biol Cell*, **9**, 2107-2123.
- Bi, X., Barkley, L.R., Slater, D.M., Tateishi, S., Yamaizumi, M., Ohmori, H. and Vaziri, C. (2006) Rad18 regulates DNA polymerase kappa and is required for recovery from S-phase checkpoint-mediated arrest. *Mol Cell Biol*, **26**, 3527-3540.
- Bienko, M., Green, C.M., Crosetto, N., Rudolf, F., Zapart, G., Coull, B., Kannouche, P., Wider, G., Peter, M., Lehmann, A.R., Hofmann, K. and Dikic, I. (2005) Ubiquitin-binding domains in Y-family polymerases regulate translesion synthesis. *Science*, **310**, 1821-1824.
- Bischof, O., Kim, S.H., Irving, J., Beresten, S., Ellis, N.A. and Campisi, J. (2001) Regulation and localization of the Bloom syndrome protein in response to DNA damage. *J Cell Biol*, **153**, 367-380.
- Bishop, D.K. (1994) RecA homologs Dmc1 and Rad51 interact to form multiple nuclear complexes prior to meiotic chromosome synapsis. *Cell*, **79**, 1081-1092.
- Blow, J.J. and Dutta, A. (2005) Preventing re-replication of chromosomal DNA. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **6**, 476-486.
- Boulton, S.J., Martin, J.S., Polanowska, J., Hill, D.E., Gartner, A. and Vidal, M. (2004) BRCA1/BARD1 orthologs required for DNA repair in *Caenorhabditis elegans*. *Curr Biol*, **14**, 33-39.
- Bousset, K. and Diffley, J.F. (1998) The Cdc7 protein kinase is required for origin firing during S phase. *Genes Dev*, **12**, 480-490.
- Boyault, C., Gilquin, B., Zhang, Y., Rybin, V., Garman, E., Meyer-Klaucke, W., Matthias, P., Muller, C.W. and Khochbin, S. (2006) HDAC6-p97/VCP controlled polyubiquitin chain turnover. *Embo J*, **25**, 3357-3366.
- Bressan, D.A., Baxter, B.K. and Petrini, J.H. (1999) The Mre11-Rad50-Xrs2 protein complex facilitates homologous recombination-based double-strand break repair in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*, **19**, 7681-7687.
- Bridge, W.L., Vandenberg, C.J., Franklin, R.J. and Hiom, K. (2005) The BRIP1 helicase functions independently of BRCA1 in the Fanconi anemia pathway for DNA crosslink repair. *Nat Genet*, **37**, 953-957.
- Broomfield, S., Chow, B.L. and Xiao, W. (1998) MMS2, encoding a ubiquitin-conjugating-enzyme-like protein, is a member of the yeast error-free postreplication repair pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 5678-5683.
- Brown, M., Zhu, Y., Hemmingsen, S.M. and Xiao, W. (2002) Structural and functional conservation of error-free DNA postreplication repair in *Schizosaccharomyces pombe*. *DNA Repair (Amst)*, **1**, 869-880.
- Brusky, J., Zhu, Y. and Xiao, W. (2000) UBC13, a DNA-damage-inducible gene, is a member of the error-free postreplication repair pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet*, **37**, 168-174.
- Brzovic, P.S., Keeffe, J.R., Nishikawa, H., Miyamoto, K., Fox, D., 3rd, Fukuda, M., Ohta, T. and Klevit, R. (2003) Binding and recognition in the assembly of an active BRCA1/BARD1 ubiquitin-ligase complex. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 5646-5651.

- Brzovic, P.S., Meza, J.E., King, M.C. and Klevit, R.E. (2001) BRCA1 RING domain cancer-predisposing mutations. Structural consequences and effects on protein-protein interactions. *J Biol Chem*, **276**, 41399-41406.
- Busino, L., Donzelli, M., Chiesa, M., Guardavaccaro, D., Ganoth, D., Dorrello, N.V., Hershko, A., Pagano, M. and Draetta, G.F. (2003) Degradation of Cdc25A by beta-TrCP during S phase and in response to DNA damage. *Nature*, **426**, 87-91.
- Buttitta, F., Martella, C., Barassi, F., Felicioni, L., Salvatore, S., Rosini, S., D'Antuono, T., Chella, A., Mucilli, F., Sacco, R., Mezzetti, A., Cuccurullo, F., Callahan, R. and Marchetti, A. (2005) Int6 expression can predict survival in early-stage non-small cell lung cancer patients. *Clin Cancer Res*, **11**, 3198-3204.
- Byun, T.S., Pacek, M., Yee, M.C., Walter, J.C. and Cimprich, K.A. (2005) Functional uncoupling of MCM helicase and DNA polymerase activities activates the ATR-dependent checkpoint. *Genes Dev*, **19**, 1040-1052.
- Cantor, S., Drapkin, R., Zhang, F., Lin, Y., Han, J., Pamidi, S. and Livingston, D.M. (2004) The BRCA1-associated protein BACH1 is a DNA helicase targeted by clinically relevant inactivating mutations. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 2357-2362.
- Cantor, S.B., Bell, D.W., Ganesan, S., Kass, E.M., Drapkin, R., Grossman, S., Wahrer, D.C., Sgroi, D.C., Lane, W.S., Haber, D.A. and Livingston, D.M. (2001) BACH1, a novel helicase-like protein, interacts directly with BRCA1 and contributes to its DNA repair function. *Cell*, **105**, 149-160.
- Carney, J.P., Maser, R.S., Olivares, H., Davis, E.M., Le Beau, M., Yates, J.R., 3rd, Hays, L., Morgan, W.F. and Petrini, J.H. (1998) The hMre11/hRad50 protein complex and Nijmegen breakage syndrome: linkage of double-strand break repair to the cellular DNA damage response. *Cell*, **93**, 477-486.
- Cazzalini, O., Perucca, P., Riva, F., Stivala, L.A., Bianchi, L., Vannini, V., Ducommun, B. and Prosperi, E. (2003) p21CDKN1A does not interfere with loading of PCNA at DNA replication sites, but inhibits subsequent binding of DNA polymerase delta at the G1/S phase transition. *Cell Cycle*, **2**, 596-603.
- Celeste, A., Petersen, S., Romanienko, P.J., Fernandez-Capetillo, O., Chen, H.T., Sedelnikova, O.A., Reina-San-Martin, B., Coppola, V., Meffre, E., Difilippantonio, M.J., Redon, C., Pilch, D.R., Oлару, A., Eckhaus, M., Camerini-Otero, R.D., Tessarollo, L., Livak, F., Manova, K., Bonner, W.M., Nussenzweig, M.C. and Nussenzweig, A. (2002) Genomic instability in mice lacking histone H2AX. *Science*, **296**, 922-927.
- Centurion, S.A., Kuo, H.R. and Lambert, W.C. (2000) Damage-resistant DNA synthesis in Fanconi anemia cells treated with a DNA cross-linking agent. *Exp Cell Res*, **260**, 216-221.
- Cha, R.S. and Kleckner, N. (2002) ATR homolog Mec1 promotes fork progression, thus averting breaks in replication slow zones. *Science*, **297**, 602-606.
- Chen, A., Kleiman, F.E., Manley, J.L., Ouchi, T. and Pan, Z.Q. (2002) Autoubiquitination of the BRCA1*BARD1 RING ubiquitin ligase. *J Biol Chem*, **277**, 22085-22092.
- Chen, J., Silver, D.P., Walpita, D., Cantor, S.B., Gazdar, A.F., Tomlinson, G., Couch, F.J., Weber, B.L., Ashley, T., Livingston, D.M. and Scully, R. (1998) Stable interaction

- between the products of the BRCA1 and BRCA2 tumor suppressor genes in mitotic and meiotic cells. *Mol Cell*, **2**, 317-328.
- Ciccia, A., Constantinou, A. and West, S.C. (2003) Identification and characterization of the human mus81-eme1 endonuclease. *J Biol Chem*, **278**, 25172-25178.
- Clay-Farrace, L., Pelizon, C., Santamaria, D., Pines, J. and Laskey, R.A. (2003) Human replication protein Cdc6 prevents mitosis through a checkpoint mechanism that implicates Chk1. *Embo J*, **22**, 704-712.
- Cobb, J.A., Bjergbaek, L., Shimada, K., Frei, C. and Gasser, S.M. (2003) DNA polymerase stabilization at stalled replication forks requires Mec1 and the RecQ helicase Sgs1. *Embo J*, **22**, 4325-4336.
- Constantinou, A., Davies, A.A. and West, S.C. (2001) Branch migration and Holliday junction resolution catalyzed by activities from mammalian cells. *Cell*, **104**, 259-268.
- Constantinou, A., Tarsounas, M., Karow, J.K., Brosh, R.M., Bohr, V.A., Hickson, I.D. and West, S.C. (2000) Werner's syndrome protein (WRN) migrates Holliday junctions and co-localizes with RPA upon replication arrest. *EMBO Rep*, **1**, 80-84.
- Cook, J.G., Chasse, D.A. and Nevins, J.R. (2004) The regulated association of Cdt1 with minichromosome maintenance proteins and Cdc6 in mammalian cells. *J Biol Chem*, **279**, 9625-9633.
- Cortez, D., Glick, G. and Elledge, S.J. (2004) Minichromosome maintenance proteins are direct targets of the ATM and ATR checkpoint kinases. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 10078-10083.
- Costanzo, V., Robertson, K., Bibikova, M., Kim, E., Grieco, D., Gottesman, M., Carroll, D. and Gautier, J. (2001) Mre11 protein complex prevents double-strand break accumulation during chromosomal DNA replication. *Mol Cell*, **8**, 137-147.
- Costanzo, V., Shechter, D., Lupardus, P.J., Cimprich, K.A., Gottesman, M. and Gautier, J. (2003) An ATR- and Cdc7-dependent DNA damage checkpoint that inhibits initiation of DNA replication. *Mol Cell*, **11**, 203-213.
- Cox, M.M., Goodman, M.F., Kreuzer, K.N., Sherratt, D.J., Sandler, S.J. and Marians, K.J. (2000) The importance of repairing stalled replication forks. *Nature*, **404**, 37-41.
- Cummings, M., Siitonen, T., Higginbottom, K., Newland, A.C. and Allen, P.D. (2002) p53-mediated downregulation of Chk1 abrogates the DNA damage-induced G2M checkpoint in K562 cells, resulting in increased apoptosis. *Br J Haematol*, **116**, 421-428.
- D'Andrea, A.D. (2003) The Fanconi road to cancer. *Genes Dev*, **17**, 1933-1936.
- D'Andrea, A.D. and Grompe, M. (2003) The Fanconi anaemia/BRCA pathway. *Nat Rev Cancer*, **3**, 23-34.
- Das-Bradoo, S., Ricke, R.M. and Bielinsky, A.K. (2006) Interaction between PCNA and diubiquitinated Mcm10 is essential for cell growth in budding yeast. *Mol Cell Biol*, **26**, 4806-4817.
- Davies, A.A., Masson, J.Y., McIlwraith, M.J., Stasiak, A.Z., Stasiak, A., Venkitaraman, A.R. and West, S.C. (2001) Role of BRCA2 in control of the RAD51 recombination and DNA repair protein. *Mol Cell*, **7**, 273-282.

- Davies, S.L., North, P.S., Dart, A., Lakin, N.D. and Hickson, I.D. (2004) Phosphorylation of the Bloom's syndrome helicase and its role in recovery from S-phase arrest. *Mol Cell Biol*, **24**, 1279-1291.
- de Winter, J.P., van der Weel, L., de Groot, J., Stone, S., Waisfisz, Q., Arwert, F., Scheper, R.J., Kruyt, F.A., Hoatlin, M.E. and Joenje, H. (2000) The Fanconi anemia protein FANCF forms a nuclear complex with FANCA, FANCC and FANCG. *Hum Mol Genet*, **9**, 2665-2674.
- Deshpande, A.M. and Newlon, C.S. (1996) DNA replication fork pause sites dependent on transcription. *Science*, **272**, 1030-1033.
- Dimitrova, D.S. and Gilbert, D.M. (2000) Temporally coordinated assembly and disassembly of replication factories in the absence of DNA synthesis. *Nat Cell Biol*, **2**, 686-694.
- Dohrmann, P.R., Oshiro, G., Tecklenburg, M. and Sclafani, R.A. (1999) RAD53 regulates DBF4 independently of checkpoint function in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, **151**, 965-977.
- Donahue, S.L., Lundberg, R., Saplis, R. and Campbell, C. (2003) Deficient regulation of DNA double-strand break repair in Fanconi anemia fibroblasts. *J Biol Chem*, **278**, 29487-29495.
- Donovan, S., Harwood, J., Drury, L.S. and Diffley, J.F. (1997) Cdc6p-dependent loading of Mcm proteins onto pre-replicative chromatin in budding yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 5611-5616.
- Donzelli, M. and Draetta, G.F. (2003) Regulating mammalian checkpoints through Cdc25 inactivation. *EMBO Rep*, **4**, 671-677.
- Donzelli, M., Squatrito, M., Ganoth, D., Hershko, A., Pagano, M. and Draetta, G.F. (2002) Dual mode of degradation of Cdc25 A phosphatase. *Embo J*, **21**, 4875-4884.
- Dronkert, M.L. and Kanaar, R. (2001) Repair of DNA interstrand cross-links. *Mutat Res*, **486**, 217-247.
- Drury, L.S., Perkins, G. and Diffley, J.F. (1997) The Cdc4/34/53 pathway targets Cdc6p for proteolysis in budding yeast. *Embo J*, **16**, 5966-5976.
- Drury, L.S., Perkins, G. and Diffley, J.F. (2000) The cyclin-dependent kinase Cdc28p regulates distinct modes of Cdc6p proteolysis during the budding yeast cell cycle. *Curr Biol*, **10**, 231-240.
- Duncker, B.P., Shimada, K., Tsai-Pflugfelder, M., Pasero, P. and Gasser, S.M. (2002) An N-terminal domain of Dbf4p mediates interaction with both origin recognition complex (ORC) and Rad53p and can deregulate late origin firing. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 16087-16092.
- Essers, J., Houtsmuller, A.B., van Veelen, L., Paulusma, C., Nigg, A.L., Pastink, A., Vermeulen, W., Hoeijmakers, J.H. and Kanaar, R. (2002) Nuclear dynamics of RAD52 group homologous recombination proteins in response to DNA damage. *Embo J*, **21**, 2030-2037.
- Essers, J., Theil, A.F., Baldeyron, C., van Cappellen, W.A., Houtsmuller, A.B., Kanaar, R. and Vermeulen, W. (2005) Nuclear dynamics of PCNA in DNA replication and repair. *Mol Cell Biol*, **25**, 9350-9359.

- Falck, J., Mailand, N., Syljuasen, R.G., Bartek, J. and Lukas, J. (2001) The ATM-Chk2-Cdc25A checkpoint pathway guards against radioresistant DNA synthesis. *Nature*, **410**, 842-847.
- Feng, W. and D'Urso, G. (2001) *Schizosaccharomyces pombe* cells lacking the amino-terminal catalytic domains of DNA polymerase epsilon are viable but require the DNA damage checkpoint control. *Mol Cell Biol*, **21**, 4495-4504.
- Fitch, M.E., Nakajima, S., Yasui, A. and Ford, J.M. (2003) In vivo recruitment of XPC to UV-induced cyclobutane pyrimidine dimers by the DDB2 gene product. *J Biol Chem*, **278**, 46906-46910.
- Franchitto, A. and Pichierri, P. (2002) Bloom's syndrome protein is required for correct relocalization of RAD50/MRE11/NBS1 complex after replication fork arrest. *J Cell Biol*, **157**, 19-30.
- Frei, C. and Gasser, S.M. (2000) The yeast Sgs1p helicase acts upstream of Rad53p in the DNA replication checkpoint and colocalizes with Rad53p in S-phase-specific foci. *Genes Dev*, **14**, 81-96.
- Fujita, M., Kiyono, T., Hayashi, Y. and Ishibashi, M. (1996) hCDC47, a human member of the MCM family. Dissociation of the nucleus-bound form during S phase. *J Biol Chem*, **271**, 4349-4354.
- Fujiwara, T., Saito, A., Suzuki, M., Shinomiya, H., Suzuki, T., Takahashi, E., Tanigami, A., Ichiyama, A., Chung, C.H., Nakamura, Y. and Tanaka, K. (1998) Identification and chromosomal assignment of USP1, a novel gene encoding a human ubiquitin-specific protease. *Genomics*, **54**, 155-158.
- Gambus, A., Jones, R.C., Sanchez-Diaz, A., Kanemaki, M., van Deursen, F., Edmondson, R.D. and Labib, K. (2006) GINS maintains association of Cdc45 with MCM in replisome progression complexes at eukaryotic DNA replication forks. *Nat Cell Biol*, **8**, 358-366.
- Gangloff, S., McDonald, J.P., Bendixen, C., Arthur, L. and Rothstein, R. (1994) The yeast type I topoisomerase Top3 interacts with Sgs1, a DNA helicase homolog: a potential eukaryotic reverse gyrase. *Mol Cell Biol*, **14**, 8391-8398.
- Gangloff, S., Soustelle, C. and Fabre, F. (2000) Homologous recombination is responsible for cell death in the absence of the Sgs1 and Srs2 helicases. *Nat Genet*, **25**, 192-194.
- Gao, L., Deng, H., Zhao, H., Hirbe, A., Harding, J., Ratner, L. and Weilbaecher, K. (2005) HTLV-1 Tax transgenic mice develop spontaneous osteolytic bone metastases prevented by osteoclast inhibition. *Blood*, **106**, 4294-4302.
- Garcia-Higuera, I., Taniguchi, T., Ganesan, S., Meyn, M.S., Timmers, C., Hejna, J., Grompe, M. and D'Andrea, A.D. (2001) Interaction of the Fanconi anemia proteins and BRCA1 in a common pathway. *Mol Cell*, **7**, 249-262.
- Garcia-Muse, T. and Boulton, S.J. (2005) Distinct modes of ATR activation after replication stress and DNA double-strand breaks in *Caenorhabditis elegans*. *Embo J*, **24**, 4345-4355.
- 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.

- Ghimenti, C., Sensi, E., Presciuttini, S., Brunetti, I.M., Conte, P., Bevilacqua, G. and Caligo, M.A. (2002) Germline mutations of the BRCA1-associated ring domain (BARD1) gene in breast and breast/ovarian families negative for BRCA1 and BRCA2 alterations. *Genes Chromosomes Cancer*, **33**, 235-242.
- Gillespie, P.J., Li, A. and Blow, J.J. (2001) Reconstitution of licensed replication origins on *Xenopus* sperm nuclei using purified proteins. *BMC Biochem*, **2**, 15.
- Golub, E.I., Gupta, R.C., Haaf, T., Wold, M.S. and Radding, C.M. (1998) Interaction of human rad51 recombination protein with single-stranded DNA binding protein, RPA. *Nucleic Acids Res*, **26**, 5388-5393.
- Gottifredi, V., Karni-Schmidt, O., Shieh, S.S. and Prives, C. (2001) p53 down-regulates CHK1 through p21 and the retinoblastoma protein. *Mol Cell Biol*, **21**, 1066-1076.
- Gottifredi, V., McKinney, K., Poyurovsky, M.V. and Prives, C. (2004) Decreased p21 levels are required for efficient restart of DNA synthesis after S phase block. *J Biol Chem*, **279**, 5802-5810.
- Gottifredi, V., Shieh, S., Taya, Y. and Prives, C. (2001) p53 accumulates but is functionally impaired when DNA synthesis is blocked. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 1036-1041.
- Gowen, L.C., Avrutskaya, A.V., Latour, A.M., Koller, B.H. and Leadon, S.A. (1998) BRCA1 required for transcription-coupled repair of oxidative DNA damage. *Science*, **281**, 1009-1012.
- Grassmann, R., Berchtold, S., Radant, I., Alt, M., Fleckenstein, B., Sodroski, J.G., Haseltine, W.A. and Ramstedt, U. (1992) Role of human T-cell leukemia virus type 1 X region proteins in immortalization of primary human lymphocytes in culture. *J Virol*, **66**, 4570-4575.
- Gregg, A.V., McGlynn, P., Jaktaji, R.P. and Lloyd, R.G. (2002) Direct rescue of stalled DNA replication forks via the combined action of PriA and RecG helicase activities. *Mol Cell*, **9**, 241-251.
- Gregory, R.C., Taniguchi, T. and D'Andrea, A.D. (2003) Regulation of the Fanconi anemia pathway by monoubiquitination. *Semin Cancer Biol*, **13**, 77-82.
- Gretarsdottir, S., Thorlacius, S., Valgardsdottir, R., Gudlaugsdottir, S., Sigurdsson, S., Steinarsdottir, M., Jonasson, J.G., Anamthawat-Jonsson, K. and Eyfjord, J.E. (1998) BRCA2 and p53 mutations in primary breast cancer in relation to genetic instability. *Cancer Res*, **58**, 859-862.
- Grossman, W.J., Kimata, J.T., Wong, F.H., Zutter, M., Ley, T.J. and Ratner, L. (1995) Development of leukemia in mice transgenic for the tax gene of human T-cell leukemia virus type I. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**, 1057-1061.
- Guo, Z., Kumagai, A., Wang, S.X. and Dunphy, W.G. (2000) Requirement for Atr in phosphorylation of Chk1 and cell cycle regulation in response to DNA replication blocks and UV-damaged DNA in *Xenopus* egg extracts. *Genes Dev*, **14**, 2745-2756.
- Gupta, R., Sharma, S., Sommers, J.A., Jin, Z., Cantor, S.B. and Brosh, R.M., Jr. (2005) Analysis of the DNA substrate specificity of the human BACH1 helicase associated with breast cancer. *J Biol Chem*, **280**, 25450-25460.

- Haaf, T., Golub, E.I., Reddy, G., Radding, C.M. and Ward, D.C. (1995) Nuclear foci of mammalian Rad51 recombination protein in somatic cells after DNA damage and its localization in synaptonemal complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**, 2298-2302.
- Hammond, E.M., Denko, N.C., Dorie, M.J., Abraham, R.T. and Giaccia, A.J. (2002) Hypoxia links ATR and p53 through replication arrest. *Mol Cell Biol*, **22**, 1834-1843.
- Hammond, E.M., Dorie, M.J. and Giaccia, A.J. (2003) ATR/ATM targets are phosphorylated by ATR in response to hypoxia and ATM in response to reoxygenation. *J Biol Chem*, **278**, 12207-12213.
- Haoudi, A., Daniels, R.C., Wong, E., Kupfer, G. and Semmes, O.J. (2003) Human T-cell leukemia virus-I tax oncoprotein functionally targets a subnuclear complex involved in cellular DNA damage-response. *J Biol Chem*, **278**, 37736-37744.
- Haracska, L., Unk, I., Prakash, L. and Prakash, S. (2006) Ubiquitylation of yeast proliferating cell nuclear antigen and its implications for translesion DNA synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**, 6477-6482.
- Hartwell, L.H. (1976) Sequential function of gene products relative to DNA synthesis in the yeast cell cycle. *J Mol Biol*, **104**, 803-817.
- Hashizume, R., Fukuda, M., Maeda, I., Nishikawa, H., Oyake, D., Yabuki, Y., Ogata, H. and Ohta, T. (2001) The RING heterodimer BRCA1-BARD1 is a ubiquitin ligase inactivated by a breast cancer-derived mutation. *J Biol Chem*, **276**, 14537-14540.
- Heessen, S., Masucci, M.G. and Dantuma, N.P. (2005) The UBA2 domain functions as an intrinsic stabilization signal that protects Rad23 from proteasomal degradation. *Mol Cell*, **18**, 225-235.
- Higa, L.A., Mihaylov, I.S., Banks, D.P., Zheng, J. and Zhang, H. (2003) Radiation-mediated proteolysis of CDT1 by CUL4-ROC1 and CSN complexes constitutes a new checkpoint. *Nat Cell Biol*, **5**, 1008-1015.
- Higgins, N.P., Kato, K. and Strauss, B. (1976) A model for replication repair in mammalian cells. *J Mol Biol*, **101**, 417-425.
- Hirano, S., Yamamoto, K., Ishiai, M., Yamazoe, M., Seki, M., Matsushita, N., Ohzeki, M., Yamashita, Y.M., Arakawa, H., Buerstedde, J.M., Enomoto, T., Takeda, S., Thompson, L.H. and Takata, M. (2005) Functional relationships of FANCC to homologous recombination, translesion synthesis, and BLM. *Embo J*, **24**, 418-427.
- Hirsch, B., Shimamura, A., Moreau, L., Baldinger, S., Hag-alshiekh, M., Bostrom, B., Sencer, S. and D'Andrea, A.D. (2004) Association of biallelic BRCA2/FANCD1 mutations with spontaneous chromosomal instability and solid tumors of childhood. *Blood*, **103**, 2554-2559.
- Hoareau Alves, K., Bochar, V., Rety, S. and Jalinot, P. (2002) Association of the mammalian proto-oncoprotein Int-6 with the three protein complexes eIF3, COP9 signalosome and 26S proteasome. *FEBS Lett*, **527**, 15-21.
- Hodgson, B., Li, A., Tada, S. and Blow, J.J. (2002) Geminin becomes activated as an inhibitor of Cdt1/RLF-B following nuclear import. *Curr Biol*, **12**, 678-683.
- Hoege, C., Pfander, B., Moldovan, G.L., Pyrowolakis, G. and Jentsch, S. (2002) RAD6-dependent DNA repair is linked to modification of PCNA by ubiquitin and SUMO. *Nature*, **419**, 135-141.

- Hofmann, R.M. and Pickart, C.M. (1999) Noncanonical MMS2-encoded ubiquitin-conjugating enzyme functions in assembly of novel polyubiquitin chains for DNA repair. *Cell*, **96**, 645-653.
- Homesley, L., Lei, M., Kawasaki, Y., Sawyer, S., Christensen, T. and Tye, B.K. (2000) Mcm10 and the MCM2-7 complex interact to initiate DNA synthesis and to release replication factors from origins. *Genes Dev*, **14**, 913-926.
- Hook, S.S., Orian, A., Cowley, S.M. and Eisenman, R.N. (2002) Histone deacetylase 6 binds polyubiquitin through its zinc finger (PAZ domain) and copurifies with deubiquitinating enzymes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 13425-13430.
- Howlett, N.G., Taniguchi, T., Olson, S., Cox, B., Waisfisz, Q., De Die-Smulders, C., Persky, N., Grompe, M., Joenje, H., Pals, G., Ikeda, H., Fox, E.A. and D'Andrea, A.D. (2002) Biallelic inactivation of BRCA2 in Fanconi anemia. *Science*, **297**, 606-609.
- Hu, J., McCall, C.M., Ohta, T. and Xiong, Y. (2004) Targeted ubiquitination of CDT1 by the DDB1-CUL4A-ROC1 ligase in response to DNA damage. *Nat Cell Biol*, **6**, 1003-1009.
- Hua, X.H. and Newport, J. (1998) Identification of a preinitiation step in DNA replication that is independent of origin recognition complex and cdc6, but dependent on cdk2. *J Cell Biol*, **140**, 271-281.
- Huang, T.T., Nijman, S.M., Mirchandani, K.D., Galardy, P.J., Cohn, M.A., Haas, W., Gygi, S.P., Ploegh, H.L., Bernards, R. and D'Andrea, A.D. (2006) Regulation of monoubiquitinated PCNA by DUB autocleavage. *Nat Cell Biol*, **8**, 339-347.
- Hussain, S., Wilson, J.B., Medhurst, A.L., Hejna, J., Witt, E., Ananth, S., Davies, A., Masson, J.Y., Moses, R., West, S.C., de Winter, J.P., Ashworth, A., Jones, N.J. and Mathew, C.G. (2004) Direct interaction of FANCD2 with BRCA2 in DNA damage response pathways. *Hum Mol Genet*, **13**, 1241-1248.
- Hwang, G.W., Sasaki, D. and Naganuma, A. (2005) Overexpression of Rad23 confers resistance to methylmercury in *Saccharomyces cerevisiae* via inhibition of the degradation of ubiquitinated proteins. *Mol Pharmacol*, **68**, 1074-1078.
- Ira, G., Malkova, A., Liberi, G., Foiani, M. and Haber, J.E. (2003) Srs2 and Sgs1-Top3 suppress crossovers during double-strand break repair in yeast. *Cell*, **115**, 401-411.
- Ishimi, Y. (1997) A DNA helicase activity is associated with an MCM4, -6, and -7 protein complex. *J Biol Chem*, **272**, 24508-24513.
- Ishimi, Y., Komamura-Kohno, Y., Kwon, H.J., Yamada, K. and Nakanishi, M. (2003) Identification of MCM4 as a target of the DNA replication block checkpoint system. *J Biol Chem*, **278**, 24644-24650.
- Ishitobi, M., Miyoshi, Y., Hasegawa, S., Egawa, C., Tamaki, Y., Monden, M. and Noguchi, S. (2003) Mutational analysis of BARD1 in familial breast cancer patients in Japan. *Cancer Lett*, **200**, 1-7.
- Ivanov, E.L., Korolev, V.G. and Fabre, F. (1992) XRS2, a DNA repair gene of *Saccharomyces cerevisiae*, is needed for meiotic recombination. *Genetics*, **132**, 651-664.
- Izumi, M., Yatagai, F. and Hanaoka, F. (2004) Localization of human Mcm10 is spatially and temporally regulated during the S phase. *J Biol Chem*, **279**, 32569-32577.

- Jallepalli, P.V., Brown, G.W., Muzi-Falconi, M., Tien, D. and Kelly, T.J. (1997) Regulation of the replication initiator protein p65cdc18 by CDK phosphorylation. *Genes Dev*, **11**, 2767-2779.
- Jensen, D.E., Proctor, M., Marquis, S.T., Gardner, H.P., Ha, S.I., Chodosh, L.A., Ishov, A.M., Tommerup, N., Vissing, H., Sekido, Y., Minna, J., Borodovsky, A., Schultz, D.C., Wilkinson, K.D., Maul, G.G., Barlev, N., Berger, S.L., Prendergast, G.C. and Rauscher, F.J., 3rd. (1998) BAP1: a novel ubiquitin hydrolase which binds to the BRCA1 RING finger and enhances BRCA1-mediated cell growth suppression. *Oncogene*, **16**, 1097-1112.
- Jentsch, S., McGrath, J.P. and Varshavsky, A. (1987) The yeast DNA repair gene RAD6 encodes a ubiquitin-conjugating enzyme. *Nature*, **329**, 131-134.
- Jiang, W., McDonald, D., Hope, T.J. and Hunter, T. (1999) Mammalian Cdc7-Dbf4 protein kinase complex is essential for initiation of DNA replication. *Embo J*, **18**, 5703-5713.
- Jin, J., Arias, E.E., Chen, J., Harper, J.W. and Walter, J.C. (2006) A family of diverse Cul4-Ddb1-interacting proteins includes Cdt2, which is required for S phase destruction of the replication factor Cdt1. *Mol Cell*, **23**, 709-721.
- Jin, J., Shirogane, T., Xu, L., Nalepa, G., Qin, J., Elledge, S.J. and Harper, J.W. (2003) SCFbeta-TRCP links Chk1 signaling to degradation of the Cdc25A protein phosphatase. *Genes Dev*, **17**, 3062-3074.
- Joazeiro, C.A. and Weissman, A.M. (2000) RING finger proteins: mediators of ubiquitin ligase activity. *Cell*, **102**, 549-552.
- Johnson, R.E., Henderson, S.T., Petes, T.D., Prakash, S., Bankmann, M. and Prakash, L. (1992) *Saccharomyces cerevisiae* RAD5-encoded DNA repair protein contains DNA helicase and zinc-binding sequence motifs and affects the stability of simple repetitive sequences in the genome. *Mol Cell Biol*, **12**, 3807-3818.
- Johnson, R.E., Kondratick, C.M., Prakash, S. and Prakash, L. (1999) hRAD30 mutations in the variant form of xeroderma pigmentosum. *Science*, **285**, 263-265.
- Jones, J.M. and Nakai, H. (1999) Duplex opening by primosome protein PriA for replisome assembly on a recombination intermediate. *J Mol Biol*, **289**, 503-516.
- Jones, J.S., Weber, S. and Prakash, L. (1988) The *Saccharomyces cerevisiae* RAD18 gene encodes a protein that contains potential zinc finger domains for nucleic acid binding and a putative nucleotide binding sequence. *Nucleic Acids Res*, **16**, 7119-7131.
- Joukov, V., Chen, J., Fox, E.A., Green, J.B. and Livingston, D.M. (2001) Functional communication between endogenous BRCA1 and its partner, BARD1, during *Xenopus laevis* development. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 12078-12083.
- Jung, Y. and Lippard, S.J. (2006) RNA polymerase II blockage by cisplatin-damaged DNA. Stability and polyubiquitylation of stalled polymerase. *J Biol Chem*, **281**, 1361-1370.
- Kanemaki, M., Sanchez-Diaz, A., Gambus, A. and Labib, K. (2003) Functional proteomic identification of DNA replication proteins by induced proteolysis in vivo. *Nature*, **423**, 720-724.
- Kannouche, P., Broughton, B.C., Volker, M., Hanaoka, F., Mullenders, L.H. and Lehmann, A.R. (2001) Domain structure, localization, and function of DNA polymerase eta, defective in xeroderma pigmentosum variant cells. *Genes Dev*, **15**, 158-172.

- Kannouche, P.L., Wing, J. and Lehmann, A.R. (2004) Interaction of human DNA polymerase η with monoubiquitinated PCNA: a possible mechanism for the polymerase switch in response to DNA damage. *Mol Cell*, **14**, 491-500.
- Karow, J.K., Chakraverty, R.K. and Hickson, I.D. (1997) The Bloom's syndrome gene product is a 3'-5' DNA helicase. *J Biol Chem*, **272**, 30611-30614.
- Karow, J.K., Constantinou, A., Li, J.L., West, S.C. and Hickson, I.D. (2000) The Bloom's syndrome gene product promotes branch migration of holliday junctions. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 6504-6508.
- Kawaguchi, Y., Kovacs, J.J., McLaurin, A., Vance, J.M., Ito, A. and Yao, T.P. (2003) The deacetylase HDAC6 regulates aggresome formation and cell viability in response to misfolded protein stress. *Cell*, **115**, 727-738.
- Kehn, K., Fuente Cde, L., Strouss, K., Berro, R., Jiang, H., Brady, J., Mahieux, R., Pumfery, A., Bottazzi, M.E. and Kashanchi, F. (2005) The HTLV-I Tax oncoprotein targets the retinoblastoma protein for proteasomal degradation. *Oncogene*, **24**, 525-540.
- Kobayashi, J., Antocchia, A., Tauchi, H., Matsuura, S. and Komatsu, K. (2004) NBS1 and its functional role in the DNA damage response. *DNA Repair (Amst)*, **3**, 855-861.
- Kobayashi, T. and Horiuchi, T. (1996) A yeast gene product, Fob1 protein, required for both replication fork blocking and recombinational hotspot activities. *Genes Cells*, **1**, 465-474.
- Komarova, E.A., Zelnick, C.R., Chin, D., Zeremski, M., Gleiberman, A.S., Bacus, S.S. and Gudkov, A.V. (1997) Intracellular localization of p53 tumor suppressor protein in gamma-irradiated cells is cell cycle regulated and determined by the nucleus. *Cancer Res*, **57**, 5217-5220.
- Kominami, K. and Toda, T. (1997) Fission yeast WD-repeat protein pop1 regulates genome ploidy through ubiquitin-proteasome-mediated degradation of the CDK inhibitor Rum1 and the S-phase initiator Cdc18. *Genes Dev*, **11**, 1548-1560.
- Komori, K., Fujikane, R., Shinagawa, H. and Ishino, Y. (2002) Novel endonuclease in Archaea cleaving DNA with various branched structure. *Genes Genet Syst*, **77**, 227-241.
- Kong, D., Coleman, T.R. and DePamphilis, M.L. (2003) Xenopus origin recognition complex (ORC) initiates DNA replication preferentially at sequences targeted by *Schizosaccharomyces pombe* ORC. *Embo J*, **22**, 3441-3450.
- Kong, D. and DePamphilis, M.L. (2002) Site-specific ORC binding, pre-replication complex assembly and DNA synthesis at *Schizosaccharomyces pombe* replication origins. *Embo J*, **21**, 5567-5576.
- Koumenis, C., Alarcon, R., Hammond, E., Sutphin, P., Hoffman, W., Murphy, M., Derr, J., Taya, Y., Lowe, S.W., Kastan, M. and Giaccia, A. (2001) Regulation of p53 by hypoxia: dissociation of transcriptional repression and apoptosis from p53-dependent transactivation. *Mol Cell Biol*, **21**, 1297-1310.
- Kowalczykowski, S.C. (2002) Molecular mimicry connects BRCA2 to Rad51 and recombinational DNA repair. *Nat Struct Biol*, **9**, 897-899.
- Kraakman-van der Zwet, M., Overkamp, W.J., van Lange, R.E., Essers, J., van Duijn-Goedhart, A., Wiggers, I., Swaminathan, S., van Buul, P.P., Errami, A., Tan, R.T.,

- Jaspers, N.G., Sharan, S.K., Kanaar, R. and Zdzienicka, M.Z. (2002) Brca2 (XRCC11) deficiency results in radioresistant DNA synthesis and a higher frequency of spontaneous deletions. *Mol Cell Biol*, **22**, 669-679.
- Krasilnikova, M.M., Samadashwily, G.M., Krasilnikov, A.S. and Mirkin, S.M. (1998) Transcription through a simple DNA repeat blocks replication elongation. *Embo J*, **17**, 5095-5102.
- Kreitz, S., Ritzi, M., Baack, M. and Knippers, R. (2001) The human origin recognition complex protein 1 dissociates from chromatin during S phase in HeLa cells. *J Biol Chem*, **276**, 6337-6342.
- Krejci, L., Van Komen, S., Li, Y., Villemain, J., Reddy, M.S., Klein, H., Ellenberger, T. and Sung, P. (2003) DNA helicase Srs2 disrupts the Rad51 presynaptic filament. *Nature*, **423**, 305-309.
- Krum, S.A., Miranda, G.A., Lin, C. and Lane, T.F. (2003) BRCA1 associates with processive RNA polymerase II. *J Biol Chem*, **278**, 52012-52020.
- Kubota, Y., Takase, Y., Komori, Y., Hashimoto, Y., Arata, T., Kamimura, Y., Araki, H. and Takisawa, H. (2003) A novel ring-like complex of Xenopus proteins essential for the initiation of DNA replication. *Genes Dev*, **17**, 1141-1152.
- Kuhne, C. and Banks, L. (1998) E3-ubiquitin ligase/E6-AP links multicopy maintenance protein 7 to the ubiquitination pathway by a novel motif, the L2G box. *J Biol Chem*, **273**, 34302-34309.
- Kuo, Y.L. and Giam, C.Z. (2006) Activation of the anaphase promoting complex by HTLV-1 tax leads to senescence. *Embo J*, **25**, 1741-1752.
- Kuzminov, A. (1995) Collapse and repair of replication forks in Escherichia coli. *Mol Microbiol*, **16**, 373-384.
- Labib, K., Tercero, J.A. and Diffley, J.F. (2000) Uninterrupted MCM2-7 function required for DNA replication fork progression. *Science*, **288**, 1643-1647.
- Ladenburger, E.M., Keller, C. and Knippers, R. (2002) Identification of a binding region for human origin recognition complex proteins 1 and 2 that coincides with an origin of DNA replication. *Mol Cell Biol*, **22**, 1036-1048.
- Lee, J., Kumagai, A. and Dunphy, W.G. (2003) Claspin, a Chk1-regulatory protein, monitors DNA replication on chromatin independently of RPA, ATR, and Rad17. *Mol Cell*, **11**, 329-340.
- Lee, J.K. and Hurwitz, J. (2001) Processive DNA helicase activity of the minichromosome maintenance proteins 4, 6, and 7 complex requires forked DNA structures. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 54-59.
- Lehmann, A.R. (2005) The role of SMC proteins in the responses to DNA damage. *DNA Repair (Amst)*, **4**, 309-314.
- Lemoine, F.J., Degtyareva, N.P., Lobachev, K. and Petes, T.D. (2005) Chromosomal translocations in yeast induced by low levels of DNA polymerase a model for chromosome fragile sites. *Cell*, **120**, 587-598.
- Levitus, M., Roomans, M.A., Steltenpool, J., Cool, N.F., Oostra, A.B., Mathew, C.G., Hoatlin, M.E., Waisfisz, Q., Arwert, F., de Winter, J.P. and Joenje, H. (2004)

- Heterogeneity in Fanconi anemia: evidence for 2 new genetic subtypes. *Blood*, **103**, 2498-2503.
- Levitus, M., Waisfisz, Q., Godthelp, B.C., de Vries, Y., Hussain, S., Wiegant, W.W., Elghalbzouri-Maghrani, E., Steltenpool, J., Rooimans, M.A., Pals, G., Arwert, F., Mathew, C.G., Zdzienicka, M.Z., Hiom, K., De Winter, J.P. and Joenje, H. (2005) The DNA helicase BRIP1 is defective in Fanconi anemia complementation group J. *Nat Genet*, **37**, 934-935.
- Levrán, O., Attwooll, C., Henry, R.T., Milton, K.L., Neveling, K., Rio, P., Batish, S.D., Kalb, R., Velleuer, E., Barral, S., Ott, J., Petrini, J., Schindler, D., Hanenberg, H. and Auerbach, A.D. (2005) The BRCA1-interacting helicase BRIP1 is deficient in Fanconi anemia. *Nat Genet*, **37**, 931-933.
- Li, W., Kim, S.M., Lee, J. and Dunphy, W.G. (2004) Absence of BLM leads to accumulation of chromosomal DNA breaks during both unperturbed and disrupted S phases. *J Cell Biol*, **165**, 801-812.
- Li, X., Zhao, Q., Liao, R., Sun, P. and Wu, X. (2003) The SCF(Skp2) ubiquitin ligase complex interacts with the human replication licensing factor Cdt1 and regulates Cdt1 degradation. *J Biol Chem*, **278**, 30854-30858.
- Li, Z., Xiao, W., McCormick, J.J. and Maher, V.M. (2002) Identification of a protein essential for a major pathway used by human cells to avoid UV- induced DNA damage. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 4459-4464.
- Liberi, G., Maffioletti, G., Lucca, C., Chiolo, I., Baryshnikova, A., Cotta-Ramusino, C., Lopes, M., Pellicoli, A., Haber, J.E. and Foiani, M. (2005) Rad51-dependent DNA structures accumulate at damaged replication forks in sgs1 mutants defective in the yeast ortholog of BLM RecQ helicase. *Genes Dev*, **19**, 339-350.
- 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.
- Lin, S.Y., Li, K., Stewart, G.S. and Elledge, S.J. (2004) Human Claspin works with BRCA1 to both positively and negatively regulate cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 6484-6489.
- 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.
- Litman, R., Peng, M., Jin, Z., Zhang, F., Zhang, J., Powell, S., Andreassen, P.R. and Cantor, S.B. (2005) BACH1 is critical for homologous recombination and appears to be the Fanconi anemia gene product FANCF. *Cancer Cell*, **8**, 255-265.
- Liu, J., Xu, L., Sandler, S.J. and Marians, K.J. (1999) Replication fork assembly at recombination intermediates is required for bacterial growth. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 3552-3555.
- Liu, P., Barkley, L.R., Day, T., Bi, X., Slater, D.M., Alexandrow, M.G., Nasheuer, H.P. and Vaziri, C. (2006) The Chk1-mediated S-phase Checkpoint Targets Initiation Factor Cdc45 via a Cdc25A/Cdk2-independent Mechanism. *J Biol Chem*, **281**, 30631-30644.

- Lommel, L., Chen, L., Madura, K. and Sweder, K. (2000) The 26S proteasome negatively regulates the level of overall genomic nucleotide excision repair. *Nucleic Acids Res*, **28**, 4839-4845.
- Lommel, L., Ortolan, T., Chen, L., Madura, K. and Sweder, K.S. (2002) Proteolysis of a nucleotide excision repair protein by the 26 S proteasome. *Curr Genet*, **42**, 9-20.
- Lomonosov, M., Anand, S., Sangrithi, M., Davies, R. and Venkitaraman, A.R. (2003) Stabilization of stalled DNA replication forks by the BRCA2 breast cancer susceptibility protein. *Genes Dev*, **17**, 3017-3022.
- Lopes, M., Cotta-Ramusino, C., Liberi, G. and Foiani, M. (2003) Branch migrating sister chromatid junctions form at replication origins through Rad51/Rad52-independent mechanisms. *Mol Cell*, **12**, 1499-1510.
- 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.
- Lorick, K.L., Jensen, J.P., Fang, S., Ong, A.M., Hatakeyama, S. and Weissman, A.M. (1999) RING fingers mediate ubiquitin-conjugating enzyme (E2)-dependent ubiquitination. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 11364-11369.
- Lucas, I. and Hyrien, O. (2000) Hemicatenanes form upon inhibition of DNA replication. *Nucleic Acids Res*, **28**, 2187-2193.
- Lucca, C., Vanoli, F., Cotta-Ramusino, C., Pelliccioli, A., Liberi, G., Haber, J. and Foiani, M. (2004) Checkpoint-mediated control of replisome-fork association and signalling in response to replication pausing. *Oncogene*, **23**, 1206-1213.
- Maga, G. and Hubscher, U. (2003) Proliferating cell nuclear antigen (PCNA): a dancer with many partners. *J Cell Sci*, **116**, 3051-3060.
- Maga, G., Stucki, M., Spadari, S. and Hubscher, U. (2000) DNA polymerase switching: I. Replication factor C displaces DNA polymerase alpha prior to PCNA loading. *J Mol Biol*, **295**, 791-801.
- Mailand, N., Bekker-Jensen, S., Bartek, J. and Lukas, J. (2006) Destruction of Claspin by SCFbetaTrCP restrains Chk1 activation and facilitates recovery from genotoxic stress. *Mol Cell*, **23**, 307-318.
- Mailand, N., Falck, J., Lukas, C., Syljuasen, R.G., Welcker, M., Bartek, J. and Lukas, J. (2000) Rapid destruction of human Cdc25A in response to DNA damage. *Science*, **288**, 1425-1429.
- Mailand, N., Podtelejnikov, A.V., Groth, A., Mann, M., Bartek, J. and Lukas, J. (2002) Regulation of G(2)/M events by Cdc25A through phosphorylation-dependent modulation of its stability. *Embo J*, **21**, 5911-5920.
- Maiorano, D., Cuvier, O., Danis, E. and Mechali, M. (2005) MCM8 is an MCM2-7-related protein that functions as a DNA helicase during replication elongation and not initiation. *Cell*, **120**, 315-328.
- Maiorano, D., Krasinska, L., Lutzmann, M. and Mechali, M. (2005) Recombinant Cdt1 induces rereplication of G2 nuclei in *Xenopus* egg extracts. *Curr Biol*, **15**, 146-153.
- Maiorano, D., Moreau, J. and Mechali, M. (2000) XCDT1 is required for the assembly of pre-replicative complexes in *Xenopus laevis*. *Nature*, **404**, 622-625.

- Mallery, D.L., Vandenberg, C.J. and Hiom, K. (2002) Activation of the E3 ligase function of the BRCA1/BARD1 complex by polyubiquitin chains. *Embo J*, **21**, 6755-6762.
- Mamely, I., van Vugt, M.A., Smits, V.A., Semple, J.I., Lemmens, B., Perrakis, A., Medema, R.H. and Freire, R. (2006) Polo-like Kinase-1 Controls Proteasome-Dependent Degradation of Claspin during Checkpoint Recovery. *Curr Biol*, **16**, 1950-1955.
- Mani, A. and Gelmann, E.P. (2005) The ubiquitin-proteasome pathway and its role in cancer. *J Clin Oncol*, **23**, 4776-4789.
- Marchetti, A., Buttitta, F., Miyazaki, S., Gallahan, D., Smith, G.H. and Callahan, R. (1995) Int-6, a highly conserved, widely expressed gene, is mutated by mouse mammary tumor virus in mammary preneoplasia. *J Virol*, **69**, 1932-1938.
- Marriott, S.J. and Semmes, O.J. (2005) Impact of HTLV-I Tax on cell cycle progression and the cellular DNA damage repair response. *Oncogene*, **24**, 5986-5995.
- Masumoto, H., Sugino, A. and Araki, H. (2000) Dpb11 controls the association between DNA polymerases alpha and epsilon and the autonomously replicating sequence region of budding yeast. *Mol Cell Biol*, **20**, 2809-2817.
- Masutani, C., Kusumoto, R., Iwai, S. and Hanaoka, F. (2000) Mechanisms of accurate translesion synthesis by human DNA polymerase eta. *Embo J*, **19**, 3100-3109.
- Masutani, C., Kusumoto, R., Yamada, A., Dohmae, N., Yokoi, M., Yuasa, M., Araki, M., Iwai, S., Takio, K. and Hanaoka, F. (1999) The XPV (xeroderma pigmentosum variant) gene encodes human DNA polymerase eta. *Nature*, **399**, 700-704.
- Masutani, C., Sugasawa, K., Yanagisawa, J., Sonoyama, T., Ui, M., Enomoto, T., Takio, K., Tanaka, K., van der Spek, P.J., Bootsma, D. and et al. (1994) Purification and cloning of a nucleotide excision repair complex involving the xeroderma pigmentosum group C protein and a human homologue of yeast RAD23. *Embo J*, **13**, 1831-1843.
- Mayeur, G.L. and Hershey, J.W. (2002) Malignant transformation by the eukaryotic translation initiation factor 3 subunit p48 (eIF3e). *FEBS Lett*, **514**, 49-54.
- McCarthy, E.E., Celebi, J.T., Baer, R. and Ludwig, T. (2003) Loss of Bard1, the heterodimeric partner of the Brca1 tumor suppressor, results in early embryonic lethality and chromosomal instability. *Mol Cell Biol*, **23**, 5056-5063.
- McCulloch, S.D., Kokoska, R.J., Masutani, C., Iwai, S., Hanaoka, F. and Kunkel, T.A. (2004) Preferential cis-syn thymine dimer bypass by DNA polymerase eta occurs with biased fidelity. *Nature*, **428**, 97-100.
- McGarry, T.J. and Kirschner, M.W. (1998) Geminin, an inhibitor of DNA replication, is degraded during mitosis. *Cell*, **93**, 1043-1053.
- McGlynn, P. and Lloyd, R.G. (2000) Modulation of RNA polymerase by (p)ppGpp reveals a RecG-dependent mechanism for replication fork progression. *Cell*, **101**, 35-45.
- McGlynn, P. and Lloyd, R.G. (2001) Rescue of stalled replication forks by RecG: simultaneous translocation on the leading and lagging strand templates supports an active DNA unwinding model of fork reversal and Holliday junction formation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 8227-8234.
- McIlwraith, M.J., Van Dyck, E., Masson, J.Y., Stasiak, A.Z., Stasiak, A. and West, S.C. (2000) Reconstitution of the strand invasion step of double-strand break repair using human Rad51 Rad52 and RPA proteins. *J Mol Biol*, **304**, 151-164.

- McKenna, S., Moraes, T., Pastushok, L., Ptak, C., Xiao, W., Spyropoulos, L. and Ellison, M.J. (2003) An NMR-based model of the ubiquitin-bound human ubiquitin conjugation complex Mms2.Ubc13. The structural basis for lysine 63 chain catalysis. *J Biol Chem*, **278**, 13151-13158.
- McKenna, S., Spyropoulos, L., Moraes, T., Pastushok, L., Ptak, C., Xiao, W. and Ellison, M.J. (2001) Noncovalent interaction between ubiquitin and the human DNA repair protein Mms2 is required for Ubc13-mediated polyubiquitination. *J Biol Chem*, **276**, 40120-40126.
- Meetei, A.R., de Winter, J.P., Medhurst, A.L., Wallisch, M., Waisfisz, Q., van de Vrugt, H.J., Oostra, A.B., Yan, Z., Ling, C., Bishop, C.E., Hoatlin, M.E., Joenje, H. and Wang, W. (2003) A novel ubiquitin ligase is deficient in Fanconi anemia. *Nat Genet*, **35**, 165-170.
- Meetei, A.R., Medhurst, A.L., Ling, C., Xue, Y., Singh, T.R., Bier, P., Steltenpool, J., Stone, S., Dokal, I., Mathew, C.G., Hoatlin, M., Joenje, H., de Winter, J.P. and Wang, W. (2005) A human ortholog of archaeal DNA repair protein Hef is defective in Fanconi anemia complementation group M. *Nat Genet*, **37**, 958-963.
- Meetei, A.R., Sechi, S., Wallisch, M., Yang, D., Young, M.K., Joenje, H., Hoatlin, M.E. and Wang, W. (2003) A multiprotein nuclear complex connects Fanconi anemia and Bloom syndrome. *Mol Cell Biol*, **23**, 3417-3426.
- Melixetian, M., Ballabeni, A., Masiero, L., Gasparini, P., Zamponi, R., Bartek, J., Lukas, J. and Helin, K. (2004) Loss of Geminin induces rereplication in the presence of functional p53. *J Cell Biol*, **165**, 473-482.
- Mendez, J. and Stillman, B. (2000) Chromatin association of human origin recognition complex, cdc6, and minichromosome maintenance proteins during the cell cycle: assembly of prereplication complexes in late mitosis. *Mol Cell Biol*, **20**, 8602-8612.
- Mendez, J., Zou-Yang, X.H., Kim, S.Y., Hidaka, M., Tansey, W.P. and Stillman, B. (2002) Human origin recognition complex large subunit is degraded by ubiquitin-mediated proteolysis after initiation of DNA replication. *Mol Cell*, **9**, 481-491.
- Mi, J. and Kupfer, G.M. (2005) The Fanconi anemia core complex associates with chromatin during S phase. *Blood*, **105**, 759-766.
- Mihaylov, I.S., Kondo, T., Jones, L., Ryzhikov, S., Tanaka, J., Zheng, J., Higa, L.A., Minamino, N., Cooley, L. and Zhang, H. (2002) Control of DNA replication and chromosome ploidy by geminin and cyclin A. *Mol Cell Biol*, **22**, 1868-1880.
- Milne, G.T. and Weaver, D.T. (1993) Dominant negative alleles of RAD52 reveal a DNA repair/recombination complex including Rad51 and Rad52. *Genes Dev*, **7**, 1755-1765.
- Mimura, S., Masuda, T., Matsui, T. and Takisawa, H. (2000) Central role for cdc45 in establishing an initiation complex of DNA replication in *Xenopus* egg extracts. *Genes Cells*, **5**, 439-452.
- Mimura, S. and Takisawa, H. (1998) *Xenopus* Cdc45-dependent loading of DNA polymerase alpha onto chromatin under the control of S-phase Cdk. *Embo J*, **17**, 5699-5707.
- Mirzoeva, O.K. and Petrini, J.H. (2003) DNA replication-dependent nuclear dynamics of the Mre11 complex. *Mol Cancer Res*, **1**, 207-218.

- Miyase, S., Tateishi, S., Watanabe, K., Tomita, K., Suzuki, K., Inoue, H. and Yamaizumi, M. (2005) Differential regulation of Rad18 through Rad6-dependent mono- and polyubiquitination. *J Biol Chem*, **280**, 515-524.
- Mizuno, T., Yamagishi, K., Miyazawa, H. and Hanaoka, F. (1999) Molecular architecture of the mouse DNA polymerase alpha-primase complex. *Mol Cell Biol*, **19**, 7886-7896.
- Mizuta, R., LaSalle, J.M., Cheng, H.L., Shinohara, A., Ogawa, H., Copeland, N., Jenkins, N.A., Lalande, M. and Alt, F.W. (1997) RAB22 and RAB163/mouse BRCA2: proteins that specifically interact with the RAD51 protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 6927-6932.
- Molinari, M., Mercurio, C., Dominguez, J., Goubin, F. and Draetta, G.F. (2000) Human Cdc25 A inactivation in response to S phase inhibition and its role in preventing premature mitosis. *EMBO Rep*, **1**, 71-79.
- Montes de Oca, R., Andreassen, P.R., Margossian, S.P., Gregory, R.C., Taniguchi, T., Wang, X., Houghtaling, S., Grompe, M. and D'Andrea, A.D. (2005) Regulated interaction of the Fanconi anemia protein, FANCD2, with chromatin. *Blood*, **105**, 1003-1009.
- Moore, J.K. and Haber, J.E. (1996) Cell cycle and genetic requirements of two pathways of nonhomologous end-joining repair of double-strand breaks in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*, **16**, 2164-2173.
- Morris, C. and Jalinet, P. (2005) Silencing of human Int-6 impairs mitosis progression and inhibits cyclin B-Cdk1 activation. *Oncogene*, **24**, 1203-1211.
- Morris, J.R. and Solomon, E. (2004) BRCA1: BARD1 induces the formation of conjugated ubiquitin structures, dependent on K6 of ubiquitin, in cells during DNA replication and repair. *Hum Mol Genet*, **13**, 807-817.
- Mortensen, U.H., Bendixen, C., Sunjevaric, I. and Rothstein, R. (1996) DNA strand annealing is promoted by the yeast Rad52 protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 10729-10734.
- Mosedale, G., Niedzwiedz, W., Alpi, A., Perrina, F., Pereira-Leal, J.B., Johnson, M., Langevin, F., Pace, P. and Patel, K.J. (2005) The vertebrate Hef ortholog is a component of the Fanconi anemia tumor-suppressor pathway. *Nat Struct Mol Biol*, **12**, 763-771.
- Mossi, R., Keller, R.C., Ferrari, E. and Hubscher, U. (2000) DNA polymerase switching: II. Replication factor C abrogates primer synthesis by DNA polymerase alpha at a critical length. *J Mol Biol*, **295**, 803-814.
- Moynahan, M.E., Chiu, J.W., Koller, B.H. and Jasin, M. (1999) Brca1 controls homology-directed DNA repair. *Mol Cell*, **4**, 511-518.
- Moynahan, M.E., Cui, T.Y. and Jasin, M. (2001) Homology-directed dna repair, mitomycin-c resistance, and chromosome stability is restored with correction of a Brca1 mutation. *Cancer Res*, **61**, 4842-4850.
- Myers, J.S. and Cortez, D. (2006) Rapid activation of ATR by ionizing radiation requires ATM and Mre11. *J Biol Chem*, **281**, 9346-9350.
- Myung, K., Datta, A., Chen, C. and Kolodner, R.D. (2001) SGS1, the *Saccharomyces cerevisiae* homologue of BLM and WRN, suppresses genome instability and homeologous recombination. *Nat Genet*, **27**, 113-116.

- Nakanishi, K., Taniguchi, T., Ranganathan, V., New, H.V., Moreau, L.A., Stotsky, M., Mathew, C.G., Kastan, M.B., Weaver, D.T. and D'Andrea, A.D. (2002) Interaction of FANCD2 and NBS1 in the DNA damage response. *Nat Cell Biol*, **4**, 913-920.
- Nakanishi, K., Yang, Y.G., Pierce, A.J., Taniguchi, T., Digweed, M., D'Andrea, A.D., Wang, Z.Q. and Jasin, M. (2005) Human Fanconi anemia monoubiquitination pathway promotes homologous DNA repair. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**, 1110-1115.
- Navas, T.A., Zhou, Z. and Elledge, S.J. (1995) DNA polymerase epsilon links the DNA replication machinery to the S phase checkpoint. *Cell*, **80**, 29-39.
- Nedelcheva, M.N., Roguev, A., Dolapchiev, L.B., Shevchenko, A., Taskov, H.B., Shevchenko, A., Stewart, A.F. and Stoynev, S.S. (2005) Uncoupling of unwinding from DNA synthesis implies regulation of MCM helicase by Tof1/Mrc1/Csm3 checkpoint complex. *J Mol Biol*, **347**, 509-521.
- 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.
- Nelson, J.R., Lawrence, C.W. and Hinkle, D.C. (1996) Deoxycytidyl transferase activity of yeast REV1 protein. *Nature*, **382**, 729-731.
- New, J.H., Sugiyama, T., Zaitseva, E. and Kowalczykowski, S.C. (1998) Rad52 protein stimulates DNA strand exchange by Rad51 and replication protein A. *Nature*, **391**, 407-410.
- Ng, J.M., Vermeulen, W., van der Horst, G.T., Bergink, S., Sugawara, K., Vrieling, H. and Hoeijmakers, J.H. (2003) A novel regulation mechanism of DNA repair by damage-induced and RAD23-dependent stabilization of xeroderma pigmentosum group C protein. *Genes Dev*, **17**, 1630-1645.
- Niedernhofer, L.J., Lalai, A.S. and Hoeijmakers, J.H. (2005) Fanconi anemia (cross)linked to DNA repair. *Cell*, **123**, 1191-1198.
- Niedzwiedz, W., Mosedale, G., Johnson, M., Ong, C.Y., Pace, P. and Patel, K.J. (2004) The Fanconi anaemia gene FANCC promotes homologous recombination and error-prone DNA repair. *Mol Cell*, **15**, 607-620.
- Nijman, S.M., Huang, T.T., Dirac, A.M., Brummelkamp, T.R., Kerkhoven, R.M., D'Andrea, A.D. and Bernards, R. (2005) The deubiquitinating enzyme USP1 regulates the Fanconi anemia pathway. *Mol Cell*, **17**, 331-339.
- Nishikawa, H., Ooka, S., Sato, K., Arima, K., Okamoto, J., Klevit, R.E., Fukuda, M. and Ohta, T. (2004) Mass spectrometric and mutational analyses reveal Lys-6-linked polyubiquitin chains catalyzed by BRCA1-BARD1 ubiquitin ligase. *J Biol Chem*, **279**, 3916-3924.
- Nishitani, H., Lygerou, Z., Nishimoto, T. and Nurse, P. (2000) The Cdt1 protein is required to license DNA for replication in fission yeast. *Nature*, **404**, 625-628.
- Nishitani, H., Sugimoto, N., Roukos, V., Nakanishi, Y., Saijo, M., Obuse, C., Tsurimoto, T., Nakayama, K.I., Nakayama, K., Fujita, M., Lygerou, Z. and Nishimoto, T. (2006) Two E3 ubiquitin ligases, SCF-Skp2 and DDB1-Cul4, target human Cdt1 for proteolysis. *Embo J*, **25**, 1126-1136.

- Nishitani, H., Taraviras, S., Lygerou, Z. and Nishimoto, T. (2001) The human licensing factor for DNA replication Cdt1 accumulates in G1 and is destabilized after initiation of S-phase. *J Biol Chem*, **276**, 44905-44911.
- Okada, T., Sonoda, E., Yamashita, Y.M., Koyoshi, S., Tateishi, S., Yamaizumi, M., Takata, M., Ogawa, O. and Takeda, S. (2002) Involvement of vertebrate polkappa in Rad18-independent postreplication repair of UV damage. *J Biol Chem*, **277**, 48690-48695.
- Pace, P., Johnson, M., Tan, W.M., Mosedale, G., Sng, C., Hoatlin, M., de Winter, J., Joenje, H., Gergely, F. and Patel, K.J. (2002) FANCE: the link between Fanconi anaemia complex assembly and activity. *Embo J*, **21**, 3414-3423.
- Pacek, M., Tutter, A.V., Kubota, Y., Takisawa, H. and Walter, J.C. (2006) Localization of MCM2-7, Cdc45, and GINS to the site of DNA unwinding during eukaryotic DNA replication. *Mol Cell*, **21**, 581-587.
- Pages, V. and Fuchs, R.P. (2003) Uncoupling of leading- and lagging-strand DNA replication during lesion bypass in vivo. *Science*, **300**, 1300-1303.
- Papouli, E., Chen, S., Davies, A.A., Huttner, D., Krejci, L., Sung, P. and Ulrich, H.D. (2005) Crosstalk between SUMO and ubiquitin on PCNA is mediated by recruitment of the helicase Srs2p. *Mol Cell*, **19**, 123-133.
- Park, H.U., Jeong, J.H., Chung, J.H. and Brady, J.N. (2004) Human T-cell leukemia virus type 1 Tax interacts with Chk1 and attenuates DNA-damage induced G2 arrest mediated by Chk1. *Oncogene*, **23**, 4966-4974.
- Park, H.U., Jeong, S.J., Jeong, J.H., Chung, J.H. and Brady, J.N. (2006) Human T-cell leukemia virus type 1 Tax attenuates gamma-irradiation-induced apoptosis through physical interaction with Chk2. *Oncogene*, **25**, 438-447.
- Pasero, P., Duncker, B.P. and Gasser, S.M. (1999) In vitro DNA replication in yeast nuclear extracts. *Methods*, **18**, 368-376, 323.
- Patel, K.J., Yu, V.P., Lee, H., Corcoran, A., Thistlethwaite, F.C., Evans, M.J., Colledge, W.H., Friedman, L.S., Ponder, B.A. and Venkitaraman, A.R. (1998) Involvement of Brca2 in DNA repair. *Mol Cell*, **1**, 347-357.
- Paull, T.T., Rogakou, E.P., Yamazaki, V., Kirchgessner, C.U., Gellert, M. and Bonner, W.M. (2000) A critical role for histone H2AX in recruitment of repair factors to nuclear foci after DNA damage. *Curr Biol*, **10**, 886-895.
- Paulovich, A.G. and Hartwell, L.H. (1995) A checkpoint regulates the rate of progression through S phase in *S. cerevisiae* in response to DNA damage. *Cell*, **82**, 841-847.
- Pellegrini, L., Yu, D.S., Lo, T., Anand, S., Lee, M., Blundell, T.L. and Venkitaraman, A.R. (2002) Insights into DNA recombination from the structure of a RAD51-BRCA2 complex. *Nature*, **420**, 287-293.
- Peng, J., Schwartz, D., Elias, J.E., Thoreen, C.C., Cheng, D., Marsischky, G., Roelofs, J., Finley, D. and Gygi, S.P. (2003) A proteomics approach to understanding protein ubiquitination. *Nat Biotechnol*, **21**, 921-926.
- Peschiaroli, A., Dorrello, N.V., Guardavaccaro, D., Venere, M., Halazonetis, T., Sherman, N.E. and Pagano, M. (2006) SCFbetaTrCP-mediated degradation of Claspin regulates recovery from the DNA replication checkpoint response. *Mol Cell*, **23**, 319-329.

- Petersen, B.O., Lukas, J., Sorensen, C.S., Bartek, J. and Helin, K. (1999) Phosphorylation of mammalian CDC6 by cyclin A/CDK2 regulates its subcellular localization. *Embo J*, **18**, 396-410.
- Petukhova, G., Van Komen, S., Vergano, S., Klein, H. and Sung, P. (1999) Yeast Rad54 promotes Rad51-dependent homologous DNA pairing via ATP hydrolysis-driven change in DNA double helix conformation. *J Biol Chem*, **274**, 29453-29462.
- 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.
- Pichierri, P. and Rosselli, F. (2004) The DNA crosslink-induced S-phase checkpoint depends on ATR-CHK1 and ATR-NBS1-FANCD2 pathways. *Embo J*, **23**, 1178-1187.
- Pichierri, P., Rosselli, F. and Franchitto, A. (2003) Werner's syndrome protein is phosphorylated in an ATR/ATM-dependent manner following replication arrest and DNA damage induced during the S phase of the cell cycle. *Oncogene*, **22**, 1491-1500.
- Plosky, B.S., Vidal, A.E., de Henestrosa, A.R., McLenigan, M.P., McDonald, J.P., Mead, S. and Woodgate, R. (2006) Controlling the subcellular localization of DNA polymerases iota and eta via interactions with ubiquitin. *Embo J*, **25**, 2847-2855.
- Poiesz, B.J., Ruscetti, F.W., Gazdar, A.F., Bunn, P.A., Minna, J.D. and Gallo, R.C. (1980) Detection and isolation of type C retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T-cell lymphoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **77**, 7415-7419.
- Polanowska, J., Martin, J.S., Garcia-Muse, T., Petalcorin, M.I. and Boulton, S.J. (2006) A conserved pathway to activate BRCA1-dependent ubiquitylation at DNA damage sites. *Embo J*, **25**, 2178-2188.
- Pollok, S., Stoepel, J., Bauerschmidt, C., Kremmer, E. and Nasheuer, H.P. (2003) Regulation of eukaryotic DNA replication at the initiation step. *Biochem Soc Trans*, **31**, 266-269.
- Postow, L., Ullsperger, C., Keller, R.W., Bustamante, C., Vologodskii, A.V. and Cozzarelli, N.R. (2001) Positive torsional strain causes the formation of a four-way junction at replication forks. *J Biol Chem*, **276**, 2790-2796.
- Prakash, L. (1994) The RAD6 gene and protein of *Saccharomyces cerevisiae*. *Ann N Y Acad Sci*, **726**, 267-273.
- Prokhorova, T.A. and Blow, J.J. (2000) Sequential MCM/P1 subcomplex assembly is required to form a heterohexamer with replication licensing activity. *J Biol Chem*, **275**, 2491-2498.
- Quinn, L.M., Herr, A., McGarry, T.J. and Richardson, H. (2001) The *Drosophila* Geminin homolog: roles for Geminin in limiting DNA replication, in anaphase and in neurogenesis. *Genes Dev*, **15**, 2741-2754.
- Raasi, S. and Pickart, C.M. (2003) Rad23 ubiquitin-associated domains (UBA) inhibit 26 S proteasome-catalyzed proteolysis by sequestering lysine 48-linked polyubiquitin chains. *J Biol Chem*, **278**, 8951-8959.
- Raderschall, E., Golub, E.I. and Haaf, T. (1999) Nuclear foci of mammalian recombination proteins are located at single-stranded DNA regions formed after DNA damage. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 1921-1926.

- Radman, M. (1975) SOS repair hypothesis: phenomenology of an inducible DNA repair which is accompanied by mutagenesis. *Basic Life Sci*, **5A**, 355-367.
- Rao, H. and Stillman, B. (1995) The origin recognition complex interacts with a bipartite DNA binding site within yeast replicators. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**, 2224-2228.
- Rasmussen, S.B., Kordon, E., Callahan, R. and Smith, G.H. (2001) Evidence for the transforming activity of a truncated Int6 gene, in vitro. *Oncogene*, **20**, 5291-5301.
- Rassool, F.V., North, P.S., Mufti, G.J. and Hickson, I.D. (2003) Constitutive DNA damage is linked to DNA replication abnormalities in Bloom's syndrome cells. *Oncogene*, **22**, 8749-8757.
- Reuven, N.B., Arad, G., Maor-Shoshani, A. and Livneh, Z. (1999) The mutagenesis protein UmuC is a DNA polymerase activated by UmuD', RecA, and SSB and is specialized for translesion replication. *J Biol Chem*, **274**, 31763-31766.
- Richmond, E. and Peterson, C.L. (1996) Functional analysis of the DNA-stimulated ATPase domain of yeast SWI2/SNF2. *Nucleic Acids Res*, **24**, 3685-3692.
- Ricke, R.M. and Bielinsky, A.K. (2004) Mcm10 regulates the stability and chromatin association of DNA polymerase-alpha. *Mol Cell*, **16**, 173-185.
- Robu, M.E., Inman, R.B. and Cox, M.M. (2001) RecA protein promotes the regression of stalled replication forks in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 8211-8218.
- Robu, M.E., Inman, R.B. and Cox, M.M. (2004) Situational repair of replication forks: roles of RecG and RecA proteins. *J Biol Chem*, **279**, 10973-10981.
- Rodriguez-Lopez, A.M., Jackson, D.A., Iborra, F. and Cox, L.S. (2002) Asymmetry of DNA replication fork progression in Werner's syndrome. *Aging Cell*, **1**, 30-39.
- Rogakou, E.P., Boon, C., Redon, C. and Bonner, W.M. (1999) Megabase chromatin domains involved in DNA double-strand breaks in vivo. *J Cell Biol*, **146**, 905-916.
- Rogakou, E.P., Pilch, D.R., Orr, A.H., Ivanova, V.S. and Bonner, W.M. (1998) DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *J Biol Chem*, **273**, 5858-5868.
- Ross, A.L., Simpson, L.J. and Sale, J.E. (2005) Vertebrate DNA damage tolerance requires the C-terminus but not BRCT or transferase domains of REV1. *Nucleic Acids Res*, **33**, 1280-1289.
- Rothfuss, A. and Grompe, M. (2004) Repair kinetics of genomic interstrand DNA cross-links: evidence for DNA double-strand break-dependent activation of the Fanconi anemia/BRCA pathway. *Mol Cell Biol*, **24**, 123-134.
- Ruffner, H., Joazeiro, C.A., Hemmati, D., Hunter, T. and Verma, I.M. (2001) Cancer-predisposing mutations within the RING domain of BRCA1: loss of ubiquitin protein ligase activity and protection from radiation hypersensitivity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 5134-5139.
- Ryu, M.J., Kim, B.J., Lee, J.W., Lee, M.W., Choi, H.K. and Kim, S.T. (2006) Direct interaction between cohesin complex and DNA replication machinery. *Biochem Biophys Res Commun*, **341**, 770-775.
- Saintigny, Y., Makienko, K., Swanson, C., Emond, M.J. and Monnat, R.J., Jr. (2002) Homologous recombination resolution defect in werner syndrome. *Mol Cell Biol*, **22**, 6971-6978.

- Sakamoto, S., Nishikawa, K., Heo, S.J., Goto, M., Furuichi, Y. and Shimamoto, A. (2001) Werner helicase relocates into nuclear foci in response to DNA damaging agents and co-localizes with RPA and Rad51. *Genes Cells*, **6**, 421-430.
- Sala-Trepat, M., Rouillard, D., Escarceller, M., Laquerbe, A., Moustacchi, E. and Papadopoulo, D. (2000) Arrest of S-phase progression is impaired in Fanconi anemia cells. *Exp Cell Res*, **260**, 208-215.
- Sancho, E., Vila, M.R., Sanchez-Pulido, L., Lozano, J.J., Paciucci, R., Nadal, M., Fox, M., Harvey, C., Bercovich, B., Loukili, N., Ciechanover, A., Lin, S.L., Sanz, F., Estivill, X., Valencia, A. and Thomson, T.M. (1998) Role of UEV-1, an inactive variant of the E2 ubiquitin-conjugating enzymes, in in vitro differentiation and cell cycle behavior of HT-29-M6 intestinal mucosecretory cells. *Mol Cell Biol*, **18**, 576-589.
- Sato, K., Hayami, R., Wu, W., Nishikawa, T., Nishikawa, H., Okuda, Y., Ogata, H., Fukuda, M. and Ohta, T. (2004) Nucleophosmin/B23 is a candidate substrate for the BRCA1-BARD1 ubiquitin ligase. *J Biol Chem*, **279**, 30919-30922.
- Schwacha, A. and Kleckner, N. (1994) Identification of joint molecules that form frequently between homologs but rarely between sister chromatids during yeast meiosis. *Cell*, **76**, 51-63.
- Scully, R., Chen, J., Ochs, R.L., Keegan, K., Hoekstra, M., Feunteun, J. and Livingston, D.M. (1997) Dynamic changes of BRCA1 subnuclear location and phosphorylation state are initiated by DNA damage. *Cell*, **90**, 425-435.
- Segurado, M., Gomez, M. and Antequera, F. (2002) Increased recombination intermediates and homologous integration hot spots at DNA replication origins. *Mol Cell*, **10**, 907-916.
- Senga, T., Sivaprasad, U., Zhu, W., Park, J.H., Arias, E.E., Walter, J.C. and Dutta, A. (2006) PCNA is a cofactor for Cdt1 degradation by CUL4/DDB1-mediated N-terminal ubiquitination. *J Biol Chem*, **281**, 6246-6252.
- Sengupta, S., Robles, A.I., Linke, S.P., Sinogeeva, N.I., Zhang, R., Pedoux, R., Ward, I.M., Celeste, A., Nussenzweig, A., Chen, J., Halazonetis, T.D. and Harris, C.C. (2004) Functional interaction between BLM helicase and 53BP1 in a Chk1-mediated pathway during S-phase arrest. *J Cell Biol*, **166**, 801-813.
- Sharan, S.K., Morimatsu, M., Albrecht, U., Lim, D.S., Regel, E., Dinh, C., Sands, A., Eichele, G., Hasty, P. and Bradley, A. (1997) Embryonic lethality and radiation hypersensitivity mediated by Rad51 in mice lacking Brca2. *Nature*, **386**, 804-810.
- Shen, Z., Cloud, K.G., Chen, D.J. and Park, M.S. (1996) Specific interactions between the human RAD51 and RAD52 proteins. *J Biol Chem*, **271**, 148-152.
- Shiloh, Y. (2003) ATM and related protein kinases: safeguarding genome integrity. *Nat Rev Cancer*, **3**, 155-168.
- Shimada, K., Pasero, P. and Gasser, S.M. (2002) ORC and the intra-S-phase checkpoint: a threshold regulates Rad53p activation in S phase. *Genes Dev*, **16**, 3236-3252.
- Shinohara, A., Ogawa, H. and Ogawa, T. (1992) Rad51 protein involved in repair and recombination in *S. cerevisiae* is a RecA-like protein. *Cell*, **69**, 457-470.
- Shinohara, A. and Ogawa, T. (1998) Stimulation by Rad52 of yeast Rad51-mediated recombination. *Nature*, **391**, 404-407.

- Siddique, M.A., Nakanishi, K., Taniguchi, T., Grompe, M. and D'Andrea, A.D. (2001) Function of the Fanconi anemia pathway in Fanconi anemia complementation group F and D1 cells. *Exp Hematol*, **29**, 1448-1455.
- Sigurdsson, S., Van Komen, S., Petukhova, G. and Sung, P. (2002) Homologous DNA pairing by human recombination factors Rad51 and Rad54. *J Biol Chem*, **277**, 42790-42794.
- Simons, A.M., Horwitz, A.A., Starita, L.M., Griffin, K., Williams, R.S., Glover, J.N. and Parvin, J.D. (2006) BRCA1 DNA-binding activity is stimulated by BARD1. *Cancer Res*, **66**, 2012-2018.
- Singleton, M.R., Scaife, S. and Wigley, D.B. (2001) Structural analysis of DNA replication fork reversal by RecG. *Cell*, **107**, 79-89.
- Snaith, H.A., Brown, G.W. and Forsburg, S.L. (2000) *Schizosaccharomyces pombe* Hsk1p is a potential *cds1p* target required for genome integrity. *Mol Cell Biol*, **20**, 7922-7932.
- Snouwaert, J.N., Gowen, L.C., Latour, A.M., Mohn, A.R., Xiao, A., DiBiase, L. and Koller, B.H. (1999) BRCA1 deficient embryonic stem cells display a decreased homologous recombination frequency and an increased frequency of non-homologous recombination that is corrected by expression of a *brca1* transgene. *Oncogene*, **18**, 7900-7907.
- 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.
- Solomon, D.A., Cardoso, M.C. and Knudsen, E.S. (2004) Dynamic targeting of the replication machinery to sites of DNA damage. *J Cell Biol*, **166**, 455-463.
- Solovjeva, L., Svetlova, M., Sasina, L., Tanaka, K., Saijo, M., Nazarov, I., Bradbury, M. and Tomilin, N. (2005) High mobility of flap endonuclease 1 and DNA polymerase ϵ associated with replication foci in mammalian S-phase nucleus. *Mol Biol Cell*, **16**, 2518-2528.
- Sorensen, C.S., Syljuasen, R.G., Falck, J., Schroeder, T., Ronnstrand, L., Khanna, K.K., Zhou, B.B., Bartek, J. and Lukas, J. (2003) Chk1 regulates the S phase checkpoint by coupling the physiological turnover and ionizing radiation-induced accelerated proteolysis of Cdc25A. *Cancer Cell*, **3**, 247-258.
- Sorensen, C.S., Syljuasen, R.G., Lukas, J. and Bartek, J. (2004) ATR, Claspin and the Rad9-Rad1-Hus1 complex regulate Chk1 and Cdc25A in the absence of DNA damage. *Cell Cycle*, **3**, 941-945.
- Sporbert, A., Gahl, A., Ankerhold, R., Leonhardt, H. and Cardoso, M.C. (2002) DNA polymerase clamp shows little turnover at established replication sites but sequential de novo assembly at adjacent origin clusters. *Mol Cell*, **10**, 1355-1365.
- Starita, L.M., Horwitz, A.A., Keogh, M.C., Ishioka, C., Parvin, J.D. and Chiba, N. (2005) BRCA1/BARD1 ubiquitinate phosphorylated RNA polymerase II. *J Biol Chem*, **280**, 24498-24505.
- Starita, L.M., Machida, Y., Sankaran, S., Elias, J.E., Griffin, K., Schlegel, B.P., Gygi, S.P. and Parvin, J.D. (2004) BRCA1-dependent ubiquitination of gamma-tubulin regulates centrosome number. *Mol Cell Biol*, **24**, 8457-8466.
- Stelter, P. and Ulrich, H.D. (2003) Control of spontaneous and damage-induced mutagenesis by SUMO and ubiquitin conjugation. *Nature*, **425**, 188-191.

- Sterner, J.M., Dew-Knight, S., Musahl, C., Kornbluth, S. and Horowitz, J.M. (1998) Negative regulation of DNA replication by the retinoblastoma protein is mediated by its association with MCM7. *Mol Cell Biol*, **18**, 2748-2757.
- Stewart, G.S., Maser, R.S., Stankovic, T., Bressan, D.A., Kaplan, M.I., Jaspers, N.G., Raams, A., Byrd, P.J., Petrini, J.H. and Taylor, A.M. (1999) The DNA double-strand break repair gene hMRE11 is mutated in individuals with an ataxia-telangiectasia-like disorder. *Cell*, **99**, 577-587.
- Sugasawa, K., Okuda, Y., Saijo, M., Nishi, R., Matsuda, N., Chu, G., Mori, T., Iwai, S., Tanaka, K., Tanaka, K. and Hanaoka, F. (2005) UV-induced ubiquitylation of XPC protein mediated by UV-DDB-ubiquitin ligase complex. *Cell*, **121**, 387-400.
- Sung, P. (1994) Catalysis of ATP-dependent homologous DNA pairing and strand exchange by yeast RAD51 protein. *Science*, **265**, 1241-1243.
- Sung, P., Prakash, S. and Prakash, L. (1990) Mutation of cysteine-88 in the *Saccharomyces cerevisiae* RAD6 protein abolishes its ubiquitin-conjugating activity and its various biological functions. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **87**, 2695-2699.
- Sung, P. and Roberson, D.L. (1995) DNA strand exchange mediated by a RAD51-ssDNA nucleoprotein filament with polarity opposite to that of RecA. *Cell*, **82**, 453-461.
- Tada, S., Li, A., Maiorano, D., Mechali, M. and Blow, J.J. (2001) Repression of origin assembly in metaphase depends on inhibition of RLF-B/Cdt1 by geminin. *Nat Cell Biol*, **3**, 107-113.
- Takahashi, T., Ohara, E., Nishitani, H. and Masukata, H. (2003) Multiple ORC-binding sites are required for efficient MCM loading and origin firing in fission yeast. *Embo J*, **22**, 964-974.
- Takayama, Y., Kamimura, Y., Okawa, M., Muramatsu, S., Sugino, A. and Araki, H. (2003) GINS, a novel multiprotein complex required for chromosomal DNA replication in budding yeast. *Genes Dev*, **17**, 1153-1165.
- Takeda, T., Ogino, K., Tatebayashi, K., Ikeda, H., Arai, K. and Masai, H. (2001) Regulation of initiation of S phase, replication checkpoint signaling, and maintenance of mitotic chromosome structures during S phase by Hsk1 kinase in the fission yeast. *Mol Biol Cell*, **12**, 1257-1274.
- Takenaka, K., Ogi, T., Okada, T., Sonoda, E., Guo, C., Friedberg, E.C. and Takeda, S. (2006) Involvement of vertebrate Polkappa in translesion DNA synthesis across DNA monoalkylation damage. *J Biol Chem*, **281**, 2000-2004.
- Takeuchi, Y., Horiuchi, T. and Kobayashi, T. (2003) Transcription-dependent recombination and the role of fork collision in yeast rDNA. *Genes Dev*, **17**, 1497-1506.
- Tan, S. and Wang, T.S. (2000) Analysis of fission yeast primase defines the checkpoint responses to aberrant S phase initiation. *Mol Cell Biol*, **20**, 7853-7866.
- Tanaka, A., Takahashi, C., Yamaoka, S., Nosaka, T., Maki, M. and Hatanaka, M. (1990) Oncogenic transformation by the tax gene of human T-cell leukemia virus type I in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **87**, 1071-1075.
- Tanaka, S. and Diffley, J.F. (2002) Interdependent nuclear accumulation of budding yeast Cdt1 and Mcm2-7 during G1 phase. *Nat Cell Biol*, **4**, 198-207.

- Tang, M., Shen, X., Frank, E.G., O'Donnell, M., Woodgate, R. and Goodman, M.F. (1999) UmuD'(2)C is an error-prone DNA polymerase, *Escherichia coli* pol V. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 8919-8924.
- Taniguchi, T. and D'Andrea, A.D. (2002) The Fanconi anemia protein, FANCD1, promotes the nuclear accumulation of FANCD2. *Blood*, **100**, 2457-2462.
- Taniguchi, T., Garcia-Higuera, I., Andreassen, P.R., Gregory, R.C., Grompe, M. and D'Andrea, A.D. (2002) S-phase-specific interaction of the Fanconi anemia protein, FANCD2, with BRCA1 and RAD51. *Blood*, **100**, 2414-2420.
- Taniguchi, T., Garcia-Higuera, I., Xu, B., Andreassen, P.R., Gregory, R.C., Kim, S.T., Lane, W.S., Kastan, M.B. and D'Andrea, A.D. (2002) Convergence of the fanconi anemia and ataxia telangiectasia signaling pathways. *Cell*, **109**, 459-472.
- Tarsounas, M., Davies, D. and West, S.C. (2003) BRCA2-dependent and independent formation of RAD51 nuclear foci. *Oncogene*, **22**, 1115-1123.
- Tashiro, S., Kotomura, N., Shinohara, A., Tanaka, K., Ueda, K. and Kamada, N. (1996) S phase specific formation of the human Rad51 protein nuclear foci in lymphocytes. *Oncogene*, **12**, 2165-2170.
- Tashiro, S., Walter, J., Shinohara, A., Kamada, N. and Cremer, T. (2000) Rad51 accumulation at sites of DNA damage and in postreplicative chromatin. *J Cell Biol*, **150**, 283-291.
- Tatsumi, Y., Ohta, S., Kimura, H., Tsurimoto, T. and Obuse, C. (2003) The ORC1 cycle in human cells: I. cell cycle-regulated oscillation of human ORC1. *J Biol Chem*, **278**, 41528-41534.
- Tercero, J.A. and Diffley, J.F. (2001) Regulation of DNA replication fork progression through damaged DNA by the Mec1/Rad53 checkpoint. *Nature*, **412**, 553-557.
- Tercero, J.A., Labib, K. and Diffley, J.F. (2000) DNA synthesis at individual replication forks requires the essential initiation factor Cdc45p. *Embo J*, **19**, 2082-2093.
- 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.
- Thomer, M., May, N.R., Aggarwal, B.D., Kwok, G. and Calvi, B.R. (2004) Drosophila double-parked is sufficient to induce re-replication during development and is regulated by cyclin E/CDK2. *Development*, **131**, 4807-4818.
- Thommes, P., Kubota, Y., Takisawa, H. and Blow, J.J. (1997) The RLF-M component of the replication licensing system forms complexes containing all six MCM/P1 polypeptides. *Embo J*, **16**, 3312-3319.
- Thompson, L.H. and Schild, D. (2001) Homologous recombinational repair of DNA ensures mammalian chromosome stability. *Mutat Res*, **477**, 131-153.
- Tirkkonen, M., Johannsson, O., Agnarsson, B.A., Olsson, H., Ingvarsson, S., Karhu, R., Tanner, M., Isola, J., Barkardottir, R.B., Borg, A. and Kallioniemi, O.P. (1997) Distinct somatic genetic changes associated with tumor progression in carriers of BRCA1 and BRCA2 germ-line mutations. *Cancer Res*, **57**, 1222-1227.
- Trenz, K., Smith, E., Smith, S. and Costanzo, V. (2006) ATM and ATR promote Mre11 dependent restart of collapsed replication forks and prevent accumulation of DNA breaks. *Embo J*, **25**, 1764-1774.

- Tsao, C.C., Geisen, C. and Abraham, R.T. (2004) Interaction between human MCM7 and Rad17 proteins is required for replication checkpoint signaling. *Embo J*, **23**, 4660-4669.
- Tsuyama, T., Tada, S., Watanabe, S., Seki, M. and Enomoto, T. (2005) Licensing for DNA replication requires a strict sequential assembly of Cdc6 and Cdt1 onto chromatin in *Xenopus* egg extracts. *Nucleic Acids Res*, **33**, 765-775.
- Uchiyama, M., Griffiths, D., Arai, K. and Masai, H. (2001) Essential role of Sna41/Cdc45 in loading of DNA polymerase alpha onto minichromosome maintenance proteins in fission yeast. *J Biol Chem*, **276**, 26189-26196.
- Ulrich, H.D. (2001) The srs2 suppressor of UV sensitivity acts specifically on the RAD5- and MMS2-dependent branch of the RAD6 pathway. *Nucleic Acids Res*, **29**, 3487-3494.
- Ulrich, H.D. (2003) Protein-protein interactions within an E2-RING finger complex. Implications for ubiquitin-dependent DNA damage repair. *J Biol Chem*, **278**, 7051-7058.
- Ulrich, H.D. and Jentsch, S. (2000) Two RING finger proteins mediate cooperation between ubiquitin-conjugating enzymes in DNA repair. *Embo J*, **19**, 3388-3397.
- VanDemark, A.P., Hofmann, R.M., Tsui, C., Pickart, C.M. and Wolberger, C. (2001) Molecular insights into polyubiquitin chain assembly: crystal structure of the Mms2/Ubc13 heterodimer. *Cell*, **105**, 711-720.
- Vandenberg, C.J., Gergely, F., Ong, C.Y., Pace, P., Mallery, D.L., Hiom, K. and Patel, K.J. (2003) BRCA1-independent ubiquitination of FANCD2. *Mol Cell*, **12**, 247-254.
- Varon, R., Vissinga, C., Platzer, M., Cerosaletti, K.M., Chrzanowska, K.H., Saar, K., Beckmann, G., Seemanova, E., Cooper, P.R., Nowak, N.J., Stumm, M., Weemaes, C.M., Gatti, R.A., Wilson, R.K., Digweed, M., Rosenthal, A., Sperling, K., Concannon, P. and Reis, A. (1998) Nibrin, a novel DNA double-strand break repair protein, is mutated in Nijmegen breakage syndrome. *Cell*, **93**, 467-476.
- Vaziri, C., Saxena, S., Jeon, Y., Lee, C., Murata, K., Machida, Y., Wagle, N., Hwang, D.S. and Dutta, A. (2003) A p53-dependent checkpoint pathway prevents rereplication. *Mol Cell*, **11**, 997-1008.
- Veaute, X., Jeusset, J., Soustelle, C., Kowalczykowski, S.C., Le Cam, E. and Fabre, F. (2003) The Srs2 helicase prevents recombination by disrupting Rad51 nucleoprotein filaments. *Nature*, **423**, 309-312.
- Vilette, D., Ehrlich, S.D. and Michel, B. (1995) Transcription-induced deletions in *Escherichia coli* plasmids. *Mol Microbiol*, **17**, 493-504.
- Volkening, M. and Hoffmann, I. (2005) Involvement of human MCM8 in prereplication complex assembly by recruiting hcdc6 to chromatin. *Mol Cell Biol*, **25**, 1560-1568.
- Wagner, J., Gruz, P., Kim, S.R., Yamada, M., Matsui, K., Fuchs, R.P. and Nohmi, T. (1999) The dinB gene encodes a novel *E. coli* DNA polymerase, DNA pol IV, involved in mutagenesis. *Mol Cell*, **4**, 281-286.
- Walker, G.C., Marsh, L. and Dodson, L. (1985) Cellular responses to DNA damage. *Environ Health Perspect*, **62**, 115-117.

- Wang, H., Wang, H., Powell, S.N., Iliakis, G. and Wang, Y. (2004) ATR affecting cell radiosensitivity is dependent on homologous recombination repair but independent of nonhomologous end joining. *Cancer Res*, **64**, 7139-7143.
- Wang, X., Andreassen, P.R. and D'Andrea, A.D. (2004) Functional interaction of monoubiquitinated FANCD2 and BRCA2/FANCD1 in chromatin. *Mol Cell Biol*, **24**, 5850-5862.
- Wang, Y., Cortez, D., Yazdi, P., Neff, N., Elledge, S.J. and Qin, J. (2000) BASC, a super complex of BRCA1-associated proteins involved in the recognition and repair of aberrant DNA structures. *Genes Dev*, **14**, 927-939.
- Ward, I.M. and Chen, J. (2001) Histone H2AX is phosphorylated in an ATR-dependent manner in response to replicational stress. *J Biol Chem*, **276**, 47759-47762.
- Watanabe, K., Tateishi, S., Kawasuji, M., Tsurimoto, T., Inoue, H. and Yamaizumi, M. (2004) Rad18 guides poleta to replication stalling sites through physical interaction and PCNA monoubiquitination. *Embo J*, **23**, 3886-3896.
- Watanabe, N., Arai, H., Nishihara, Y., Taniguchi, M., Watanabe, N., Hunter, T. and Osada, H. (2004) M-phase kinases induce phospho-dependent ubiquitination of somatic Wee1 by SCFbeta-TrCP. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 4419-4424.
- Weinreich, M. and Stillman, B. (1999) Cdc7p-Dbf4p kinase binds to chromatin during S phase and is regulated by both the APC and the RAD53 checkpoint pathway. *Embo J*, **18**, 5334-5346.
- Whitby, M.C., Osman, F. and Dixon, J. (2003) Cleavage of model replication forks by fission yeast Mus81-Eme1 and budding yeast Mus81-Mms4. *J Biol Chem*, **278**, 6928-6935.
- Wilson, J.B., Johnson, M.A., Stuckert, A.P., Trueman, K.L., May, S., Bryant, P.E., Meyn, R.E., D'Andrea, A.D. and Jones, N.J. (2001) The Chinese hamster FANCG/XRCC9 mutant NM3 fails to express the monoubiquitinated form of the FANCD2 protein, is hypersensitive to a range of DNA damaging agents and exhibits a normal level of spontaneous sister chromatid exchange. *Carcinogenesis*, **22**, 1939-1946.
- Wohlschlegel, J.A., Dhar, S.K., Prokhorova, T.A., Dutta, A. and Walter, J.C. (2002) Xenopus Mcm10 binds to origins of DNA replication after Mcm2-7 and stimulates origin binding of Cdc45. *Mol Cell*, **9**, 233-240.
- Wohlschlegel, J.A., Dwyer, B.T., Dhar, S.K., Cvetic, C., Walter, J.C. and Dutta, A. (2000) Inhibition of eukaryotic DNA replication by geminin binding to Cdt1. *Science*, **290**, 2309-2312.
- Wong, A.K., Pero, R., Ormonde, P.A., Tavtigian, S.V. and Bartel, P.L. (1997) RAD51 interacts with the evolutionarily conserved BRC motifs in the human breast cancer susceptibility gene brca2. *J Biol Chem*, **272**, 31941-31944.
- Woodward, A.M., Gohler, T., Luciani, M.G., Oehlmann, M., Ge, X., Gartner, A., Jackson, D.A. and Blow, J.J. (2006) Excess Mcm2-7 license dormant origins of replication that can be used under conditions of replicative stress. *J Cell Biol*, **173**, 673-683.
- Wu-Baer, F., Lagazon, K., Yuan, W. and Baer, R. (2003) The BRCA1/BARD1 heterodimer assembles polyubiquitin chains through an unconventional linkage involving lysine residue K6 of ubiquitin. *J Biol Chem*, **278**, 34743-34746.

- Wu, L., Davies, S.L., Levitt, N.C. and Hickson, I.D. (2001) Potential role for the BLM helicase in recombinational repair via a conserved interaction with RAD51. *J Biol Chem*, **276**, 19375-19381.
- Wu, L.C., Wang, Z.W., Tsan, J.T., Spillman, M.A., Phung, A., Xu, X.L., Yang, M.C., Hwang, L.Y., Bowcock, A.M. and Baer, R. (1996) Identification of a RING protein that can interact in vivo with the BRCA1 gene product. *Nat Genet*, **14**, 430-440.
- Wyrick, J.J., Aparicio, J.G., Chen, T., Barnett, J.D., Jennings, E.G., Young, R.A., Bell, S.P. and Aparicio, O.M. (2001) Genome-wide distribution of ORC and MCM proteins in *S. cerevisiae*: high-resolution mapping of replication origins. *Science*, **294**, 2357-2360.
- Xia, F., Taghian, D.G., DeFrank, J.S., Zeng, Z.C., Willers, H., Iliakis, G. and Powell, S.N. (2001) Deficiency of human BRCA2 leads to impaired homologous recombination but maintains normal nonhomologous end joining. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 8644-8649.
- Xia, Y., Pao, G.M., Chen, H.W., Verma, I.M. and Hunter, T. (2003) Enhancement of BRCA1 E3 ubiquitin ligase activity through direct interaction with the BARD1 protein. *J Biol Chem*, **278**, 5255-5263.
- Xiao, W., Chow, B.L., Broomfield, S. and Hanna, M. (2000) The *Saccharomyces cerevisiae* RAD6 group is composed of an error-prone and two error-free postreplication repair pathways. *Genetics*, **155**, 1633-1641.
- Xiao, W., Lin, S.L., Broomfield, S., Chow, B.L. and Wei, Y.F. (1998) The products of the yeast MMS2 and two human homologs (hMMS2 and CROC-1) define a structurally and functionally conserved Ubc-like protein family. *Nucleic Acids Res*, **26**, 3908-3914.
- Xu, X., Weaver, Z., Linke, S.P., Li, C., Gotay, J., Wang, X.W., Harris, C.C., Ried, T. and Deng, C.X. (1999) Centrosome amplification and a defective G2-M cell cycle checkpoint induce genetic instability in BRCA1 exon 11 isoform-deficient cells. *Mol Cell*, **3**, 389-395.
- Yamaguchi-Iwai, Y., Sonoda, E., Sasaki, M.S., Morrison, C., Haraguchi, T., Hiraoka, Y., Yamashita, Y.M., Yagi, T., Takata, M., Price, C., Kakazu, N. and Takeda, S. (1999) Mre11 is essential for the maintenance of chromosomal DNA in vertebrate cells. *Embo J*, **18**, 6619-6629.
- Yamamoto, K., Ishiai, M., Matsushita, N., Arakawa, H., Lamerdin, J.E., Buerstedde, J.M., Tanimoto, M., Harada, M., Thompson, L.H. and Takata, M. (2003) Fanconi anemia FANCG protein in mitigating radiation- and enzyme-induced DNA double-strand breaks by homologous recombination in vertebrate cells. *Mol Cell Biol*, **23**, 5421-5430.
- Yamashita, Y.M., Okada, T., Matsusaka, T., Sonoda, E., Zhao, G.Y., Araki, K., Tateishi, S., Yamaizumi, M. and Takeda, S. (2002) RAD18 and RAD54 cooperatively contribute to maintenance of genomic stability in vertebrate cells. *Embo J*, **21**, 5558-5566.
- Yan, H., Gibson, S. and Tye, B.K. (1991) Mcm2 and Mcm3, two proteins important for ARS activity, are related in structure and function. *Genes Dev*, **5**, 944-957.

- Yanagi, K., Mizuno, T., You, Z. and Hanaoka, F. (2002) Mouse geminin inhibits not only Cdt1-MCM6 interactions but also a novel intrinsic Cdt1 DNA binding activity. *J Biol Chem*, **277**, 40871-40880.
- Yen, H.C., Gordon, C. and Chang, E.C. (2003) Schizosaccharomyces pombe Int6 and Ras homologs regulate cell division and mitotic fidelity via the proteasome. *Cell*, **112**, 207-217.
- Ying, C.Y. and Gautier, J. (2005) The ATPase activity of MCM2-7 is dispensable for pre-RC assembly but is required for DNA unwinding. *Embo J*, **24**, 4334-4344.
- Yoon, D., Wang, Y., Stapleford, K., Wiesmuller, L. and Chen, J. (2004) P53 inhibits strand exchange and replication fork regression promoted by human Rad51. *J Mol Biol*, **336**, 639-654.
- Yoshida, M., Miyoshi, I. and Hinuma, Y. (1982) Isolation and characterization of retrovirus from cell lines of human adult T-cell leukemia and its implication in the disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **79**, 2031-2035.
- Yoshida, M., Seiki, M., Yamaguchi, K. and Takatsuki, K. (1984) Monoclonal integration of human T-cell leukemia provirus in all primary tumors of adult T-cell leukemia suggests causative role of human T-cell leukemia virus in the disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **81**, 2534-2537.
- Yu, V.P., Koehler, M., Steinlein, C., Schmid, M., Hanakahi, L.A., van Gool, A.J., West, S.C. and Venkitaraman, A.R. (2000) Gross chromosomal rearrangements and genetic exchange between nonhomologous chromosomes following BRCA2 inactivation. *Genes Dev*, **14**, 1400-1406.
- Yu, X., Fu, S., Lai, M., Baer, R. and Chen, J. (2006) BRCA1 ubiquitinates its phosphorylation-dependent binding partner CtIP. *Genes Dev*, **20**, 1721-1726.
- Yuan, S.S., Lee, S.Y., Chen, G., Song, M., Tomlinson, G.E. and Lee, E.Y. (1999) BRCA2 is required for ionizing radiation-induced assembly of Rad51 complex in vivo. *Cancer Res*, **59**, 3547-3551.
- Zhang, D., Zaugg, K., Mak, T.W. and Elledge, S.J. (2006) A role for the deubiquitinating enzyme USP28 in control of the DNA-damage response. *Cell*, **126**, 529-542.
- Zhang, J., Willers, H., Feng, Z., Ghosh, J.C., Kim, S., Weaver, D.T., Chung, J.H., Powell, S.N. and Xia, F. (2004) Chk2 phosphorylation of BRCA1 regulates DNA double-strand break repair. *Mol Cell Biol*, **24**, 708-718.
- Zhang, Y.W., Otterness, D.M., Chiang, G.G., Xie, W., Liu, Y.C., Mercurio, F. and Abraham, R.T. (2005) Genotoxic stress targets human Chk1 for degradation by the ubiquitin-proteasome pathway. *Mol Cell*, **19**, 607-618.
- Zhao, H., Watkins, J.L. and Piwnicka-Worms, H. (2002) Disruption of the checkpoint kinase 1/cell division cycle 25A pathway abrogates ionizing radiation-induced S and G2 checkpoints. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 14795-14800.
- Zhong, Q., Chen, C.F., Li, S., Chen, Y., Wang, C.C., Xiao, J., Chen, P.L., Sharp, Z.D. and Lee, W.H. (1999) Association of BRCA1 with the hRad50-hMre11-p95 complex and the DNA damage response. *Science*, **285**, 747-750.

- Zhong, W., Feng, H., Santiago, F.E. and Kipreos, E.T. (2003) CUL-4 ubiquitin ligase maintains genome stability by restraining DNA-replication licensing. *Nature*, **423**, 885-889.
- Zhu, W., Chen, Y. and Dutta, A. (2004) Rereplication by depletion of geminin is seen regardless of p53 status and activates a G2/M checkpoint. *Mol Cell Biol*, **24**, 7140-7150.
- Zou, L., Cortez, D. and Elledge, S.J. (2002) Regulation of ATR substrate selection by Rad17-dependent loading of Rad9 complexes onto chromatin. *Genes Dev*, **16**, 198-208.
- Zou, L. and Elledge, S.J. (2003) Sensing DNA damage through ATRIP recognition of RPA-ssDNA complexes. *Science*, **300**, 1542-1548.
- Zou, L. and Stillman, B. (1998) Formation of a preinitiation complex by S-phase cyclin CDK-dependent loading of Cdc45p onto chromatin. *Science*, **280**, 593-596.
- Zou, L. and Stillman, B. (2000) Assembly of a complex containing Cdc45p, replication protein A, and Mcm2p at replication origins controlled by S-phase cyclin-dependent kinases and Cdc7p-Dbf4p kinase. *Mol Cell Biol*, **20**, 3086-3096.

Avant la division cellulaire, la réplication du génome doit être complète et fidèle, car de son intégrité dépend l'activité normale des cellules. Cette réplication s'effectue au niveau des fourches de réplication, qui regroupent l'ensemble des protéines assurant l'ouverture et la duplication de la double hélice d'ADN. Lors de sa progression, chaque fourche détecte et signale à la cellule toute lésion de l'ADN causée par un stress génotoxique. Ainsi, les protéines actives aux fourches de réplication permettent non seulement la synthèse mais aussi la maintenance de l'ADN. Parmi elles, le complexe hexamérique MCM («MiniChromosome Maintenance») possède l'activité ADN hélicase catalysant l'ouverture de la double hélice d'ADN, préalablement à sa duplication. Mes travaux de thèse montrent qu'une de ses sous unités, MCM7, est régulée par ubiquitinylation. Cette modification post-traductionnelle, qui apparaît aujourd'hui comme cruciale pour le maintien de l'intégrité génomique, affecte la stabilité et/ou l'activité de ses substrats en leur conjuguant une petite protéine, l'ubiquitine. La conjugaison d'une ubiquitine (mono-ubiquitinylation) ou d'une chaîne d'ubiquitines (poly-ubiquitinylation) est un processus de régulation très puissant, de par la diversité de ses substrats, des enzymes de conjugaison, et des types de chaînes formées (au moins sept). J'ai montré que MCM7 est poly-ubiquitinylée quand elle est présente sur la chromatine en cours de réplication ou de réparation.

Pendant la réplication, l'ubiquitinylation de MCM7 provoque sa dégradation et son départ de la chromatine. Départ devant être programmé au moment adéquat afin d'assurer la duplication complète du génome. La proto-oncoprotéine Int6 est impliquée dans cette programmation en interagissant avec les formes ubiquitinylées de MCM7 pour les protéger de la dégradation. Son absence entraîne la déstabilisation de MCM7, des défauts de réplication, et finalement l'apparition de dommages à l'ADN. De façon intéressante, la capacité d'Int6 à réguler la dégradation de MCM7 et peut-être d'autres facteurs restant à identifier, semble donc primordiale pour la stabilité génomique. La perte de cette fonction pourrait être à l'origine de la mort par catastrophe mitotique que nous avons observée dans les cellules appauvries en Int6, ainsi que des tumeurs causées par la mutation d'*int6 in vivo*.

En réponse à une irradiation causant des cassures de l'ADN, j'ai également observé une ubiquitinylation de MCM7. Celle-ci a lieu sur la chromatine et est stimulée par la protéine BRCA1, un suppresseur de tumeur possédant une activité E3 ubiquitine ligase. Bien que très peu de ses substrats aient été identifiés, cette activité participe à la réponse cellulaire aux lésions de l'ADN. En effet, elle est souvent altérée par les mutations de BRCA1 causant des tumeurs mammaires. Mon travail suggère que MCM7 est un substrat de BRCA1. De plus, son ubiquitinylation en réponse à une irradiation est différente de celle intervenant en phase S, car elle n'entraîne pas sa dégradation. Cette observation devra être mise en perspective avec les fonctions récemment identifiées pour BRCA1 et MCM7 dans la réponse cellulaire aux dommages de l'ADN.

Par ailleurs, il faudra déterminer si la fonction et l'ubiquitinylation de MCM7 peuvent être modulées par la protéine Tax du virus HTLV-1. J'ai en effet montré que cette oncoprotéine interagit avec MCM7 et augmente son abondance sur la chromatine. De plus, elle stimule la réplication de l'ADN, ce qui pourrait participer à la transformation des cellules infectées par HTLV-1. Des études supplémentaires seront requises pour déterminer si cette stimulation est directement liée l'interaction entre Tax et MCM7.

En conclusion, mes travaux de thèse ont permis d'ajouter MCM7 à la liste croissante des protéines dont l'ubiquitinylation régule la réplication et/ou la réparation de l'ADN. De ces régulations, auxquelles participent Int6 et BRCA1, dépend l'intégrité du génome. Cela pourrait expliquer pourquoi la perte de la fonction de ces protéines conduit à des tumeurs.