



HAL
open science

Rôle de la protéine BLM dans le maintien de l'intégrité du centromère : implications dans le phénotype cellulaire associé au syndrome de Bloom

Sébastien Rouzeau

► To cite this version:

Sébastien Rouzeau. Rôle de la protéine BLM dans le maintien de l'intégrité du centromère : implications dans le phénotype cellulaire associé au syndrome de Bloom. Sciences agricoles. Université Paris Sud - Paris XI, 2011. Français. NNT : 2011PA11T110 . tel-00769941

HAL Id: tel-00769941

<https://theses.hal.science/tel-00769941>

Submitted on 4 Jan 2013

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.

Université Paris-Sud 11

Faculté de Médecine Paris-sud 11

Année 2011

N° attribué par la bibliothèque

--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

THESE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE PARIS-SUD 11

Champ disciplinaire : Biologie Cellulaire et Moléculaire

École Doctorale de rattachement : « Cancérologie : Biologie, Médecine, Santé »

Présentée et soutenue publiquement
par

Sébastien ROUZEAU

Le 16 Décembre 2011

**Rôle de la protéine BLM dans le maintien de l'intégrité du centromère :
implications dans le phénotype cellulaire associé au syndrome de Bloom**

Directrice de Thèse : Mounira AMOR-GUERET

JURY

Président : Pr Patrick FORTERRE
Rapporteur : Pr Jean-François RIOU
Rapporteur : Dr Emmanuel KAS
Examineur : Dr Sandrine RUCHAUD
Examineur : Pr Claire VOURC'H
Directrice de thèse : Dr Mounira AMOR-GUERET

Université Paris-Sud 11
Faculté de Médecine Paris-sud 11

Année 2011

N° attribué par la bibliothèque

--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

THESE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE PARIS-SUD 11

Champ disciplinaire : Biologie Cellulaire et Moléculaire

École Doctorale de rattachement : « Cancérologie : Biologie, Médecine, Santé »

Présentée et soutenue publiquement
par

Sébastien ROUZEAU

Le 16 Décembre 2011

**Rôle de la protéine BLM dans le maintien de l'intégrité du centromère :
implications dans le phénotype cellulaire associé au syndrome de Bloom**

Directrice de Thèse : Mounira AMOR-GUERET

JURY

Président : Pr Patrick FORTERRE
Rapporteur : Pr Jean-François RIOU
Rapporteur : Dr Emmanuel KAS
Examineur : Dr Sandrine RUCHAUD
Examineur : Pr Claire VOURC'H
Directrice de thèse : Dr Mounira AMOR-GUERET

TABLE DES MATIERES

Remerciements	<i>i</i>
Liste des figures	<i>v</i>
Liste des abréviations	<i>vii</i>
Avant-propos	<i>1</i>
Introduction	<i>3</i>
Chapitre I : La protéine BLM	<i>5</i>
Le syndrome de Bloom	<i>6</i>
Caractéristiques cliniques	<i>6</i>
Caractéristiques cytogénétiques	<i>8</i>
Hypothèses sur l'origine du syndrome de Bloom	<i>10</i>
La découverte du gène <i>BLM</i>	<i>10</i>
Le gène <i>BLM</i> code pour une hélicase de type RecQ	<i>13</i>
La protéine BLM	<i>16</i>
Les caractéristiques de la protéine BLM	<i>17</i>
Partenaires de la protéine BLM	<i>21</i>
Fonctions potentielles de la protéine BLM en phase S	<i>31</i>
BLM et la réplication	<i>31</i>
BLM et la recombinaison homologue	<i>36</i>
Chapitre II : Le centromère	<i>45</i>
La structure du centromère	<i>47</i>
Les séquences génomiques	<i>48</i>
Chromatine et modifications épigénétiques	<i>49</i>
Les fonctions du centromère	<i>52</i>
La Mitose : l'étape du cycle cellulaire où le centromère joue un rôle majeur	<i>52</i>

L'assemblage du kinétochore et point de contrôle de l'assemblage du fuseau	60
La cohésion des chromatides sœurs	68
Le métabolisme de l'ADN centromérique	72
La transcription des séquences centromériques	72
La décaténation des centromères	74
<i>Présentation du projet de recherche</i>	83
Contexte : La protéine BLM pendant la mitose	85
Les UFBs associés aux protéines de Fanconi	88
Les UFBs centromériques	90
Hypothèse de travail:	93
<i>Résultats</i>	95
Article	97
Résultats non publiés	127
La protéine BLM et la transcription des centromères	127
La protéine BLM et les UFBs centromériques	129
<i>Discussion et perspectives</i>	133
Discussion des résultats	135
Localisation cellulaire de BLM pendant la mitose	135
BLM, PICH et la décaténation des centromères	136
Résolution des UFBs centromériques	138
Mécanisme de régulation de la transcription centromérique par BLM	139
Implication du rôle de BLM aux centromères dans le phénotype BS	143
Conclusion	147
<i>Annexes</i>	149
<i>Références bibliographiques</i>	151

REMERCIEMENTS

Je souhaite tout d'abord remercier l'ensemble des membres du jury d'avoir accepté d'évaluer mes travaux de thèse. Merci au Professeur Patrick Forterre de m'avoir fait l'honneur de présider ce jury, merci au Professeur Jean-François Riou et au Docteur Emmanuel Käs d'avoir accepté d'être rapporteurs de mon manuscrit de thèse et enfin merci au Docteur Sandrine Ruchaud et au Professeur Claire Vourc'h d'avoir accepté d'être examinatrices de ce travail.

Je voudrais remercier les personnes qui m'ont initié, au cours de mon parcours scolaire, au travail de recherche et qui m'ont donné envie de faire une thèse. Merci au Docteur Patrick Dumont. Tu m'as encadré et a été très tolérant à mon égard, tu m'as appris toutes les bases indispensables à tout bon chercheur. Merci aussi au Professeur Alphonse Calenda pour nos nombreuses discussions qui m'ont aidé à orienter mon projet professionnel y compris après mon départ de l'ISSBA et aujourd'hui encore.

Je tiens à exprimer toute ma reconnaissance et ma profonde gratitude à ma directrice de thèse : le Docteur Mounira Amor-Guélet. Je te remercie sincèrement car c'est à grâce à toi que j'ai pu apprendre ce qu'est le métier de chercheur. Au cours de ces cinq dernières années, il m'est arrivé de passer par une gamme complète d'émotions, en passant par l'euphorie extrême que procurent les découvertes jusqu'à la déception amère face aux échecs, alors merci pour ton indéfectible confiance à chacun de ces instants. Merci également de m'avoir guidé et éclairé tout au long de ce projet sans jamais manquer de temps pour en discuter. Ta patience, ton enthousiasme et tes judicieux conseils m'ont permis de toujours continuer à avancer avec motivation sur mon projet de recherche. Et surtout merci de m'avoir transmis ta passion.

Je voudrais remercier tous les membres du laboratoire pour m'avoir soutenu et encouragé quand il le fallait. Merci surtout pour la bonne ambiance qui régnait dans ce laboratoire et qui m'a permis de venir tous les jours avec plaisir.

Qu'aurais-je pu faire sans toi Géraldine ? Je ne mentionnerai pas ici ton simple support technique mais plutôt ton réel talent scientifique pour faire fonctionner (presque) à chaque fois les manip. Merci pour ton incroyable efficacité et merci d'avoir considéré ce projet en partie comme le tien car c'est le cas.

Popo...un grand merci à toi. Trouve en ces quelques mots toute mon amitié et n'oublie pas qu'il nous reste encore un endroit où l'on doit aller...un jour.

Merci à toi Rosine pour m'avoir transmis ton savoir et ta rigueur bien qu'il me reste encore du chemin à parcourir à ce niveau. Merci particulièrement pour ta gentillesse et ta disponibilité.

Évidemment je te remercie aussi Fabrice. Je sais qu'officiellement tu ne fais pas partie de l'équipe mais pour moi c'est tout comme. Sans toi l'aventure « BLM et centromères » n'aurait peut-être jamais vu le jour... Merci pour ton aide qui est allée bien au-delà de tes simples obligations professionnelles. Merci pour la piscine (ou peut-être ça devrait être à toi de me remercier sur ce coup-là !).

Merci à Olivier pour ses précieux conseils et son aide mais surtout pour m'avoir évité durant cette dernière année d'être à nouveau le seul représentant de la gent masculine dans notre laboratoire! Emilie, Kenza, Nada je ne vous oublie pas. Merci à vous trois.

Merci à tous les membres de l'Unité 3348 et en particulier à Sarah Lambert et Aura Carreira car votre aide et vos précieuses suggestions m'ont permis d'enrichir nettement le contenu et la forme de mon article de recherche.

Merci à vous, mes fidèles compagnons de galère, Angela, Clémentine, Juan, Paul, Thibaud et Violena. Au-delà d'être mes collègues vous êtes des amis, mais ça vous le savez déjà.

Enfin, je remercie sincèrement ma famille ainsi que mes amis qui m'ont encouragé et soutenu tout au long de ces années, le plus souvent sans comprendre ce dont il s'agissait vraiment !

Je tiens principalement à remercier mes parents de m'avoir aidé à réaliser mon rêve car je n'y étais pas forcément prédestiné. Merci pour votre « support financier » mais surtout merci d'avoir toujours cru en moi car ce fut ma principale source de motivation durant toutes ces années. Mention spéciale pour Kévin, Poupou ainsi que Guy et son soutien messenger !

Réaliser une thèse est une chose difficile, mais vivre avec quelqu'un qui en fait une est tout aussi difficile...sinon plus! Je l'ai appris à mes dépens. Mais ces deux dernière années c'est toi qui m'a supportée Ophélie. Apparemment tu y es parvenue car tu es aujourd'hui ma femme. Merci pour ta patience, merci d'avoir compris et surtout merci d'avoir respecté mes choix.

Et pour ne prendre aucun risque, merci à tous à tous ceux que j'oublie de citer...

LISTE DES FIGURES

- Figure 1 : Marquage différentiel des chromatides sœurs par incorporation de BrdU
- Figure 2 : Exemple de chromosomes métaphasiques d'une cellule normale et d'une cellule BS
- Figure 3 : Représentation schématique de certains membres de la sous-famille des hélicases de type RecQ
- Figure 4 : Les substrats de l'hélicase BLM
- Figure 5 : Illustration des activités de régression de fourche et de migration inverse de branches de la protéine BLM
- Figure 6 : Le "BLM core complex"
- Figure 7 : Mécanisme de clivage de molécules d'ADN par les topoisomérases de type IA et II
- Figure 8 : Mécanisme d'action des topoisomérases de type IA
- Figure 9 : Dissolution des double jonctions de Holliday par BLM et Topo III α
- Figure 10 : La résolution de structures secondaires de l'ADN par BLM faciliterait la progression des fourches de réplication
- Figure 11 : Modèle de redémarrage par BLM d'une fourche de réplication bloquée
- Figure 12 : Mécanisme d'envahissement de brin par RAD51
- Figure 13 : Modèle de redémarrage par la recombinaison homologue d'une fourche de réplication bloquée
- Figure 14 : Restauration d'une fourche de réplication après CDB par la voie de réparation BIR
- Figure 15 : Rôle de BLM dans la recombinaison homologue
- Figure 16 : Caractéristiques des centromères ponctuels et régionaux
- Figure 17 : Modèle d'organisation de la chromatine centromérique
- Figure 18 : La transition G0/G1 : le point de restriction

Figure 19 : Représentation schématique du cycle de division cellulaire chez les eucaryotes

Figure 20 : Contrôle de la division cellulaire

Figure 21 : Activation des complexes Cdk1/Cycline B lors de la transition G2/M.

Figure 22 : Les différentes étapes de la mitose

Figure 23 : La composition du kinétochore

Figure 24 : Point de contrôle du fuseau mitotique

Figure 25 : Représentation schématique du passage en anaphase

Figure 26 : Modèle de « mesure » de tension au centromère

Figure 27 : Mécanisme de la voie de signalisation du point de contrôle du fuseau mitotique

Figure 28 : Le complexe cohésine

Figure 29 : Régulation du retrait de la cohésine chez les vertébrés

Figure 30 : Rôle de la Topo II lors de la réplication

Figure 31 : Substrats de la Topo II

Figure 32 : Cycle catalytique de la Topo II

Figure 33 : Mécanisme de cohésion entre deux chromatides sœurs

Figure 34 : Localisation préférentielle de la Topo II α aux centromères

Figure 35 : Localisation d'un UFB en anaphase

Figure 36 : Illustration des anomalies de mitoses observées sur des cellules dérivées de biopsie de peau de patients BS

Figure 37 : Modèle de fonction mitotique de BLM pendant la pré-métaphase

Figure 38 : Localisation de BLM sur les ponts anaphasiques

Figure 39 : Visualisation d'un UFB associé à FANCD2 en anaphase

Figure 40 : Modèle de formation et réparation des UFBs associés à FANCD2 et des UFBs centromériques

Figure 41 : Modèle de résolution des UFBs centromériques par BLM et PICH

Figure 42 : L'activité hélicase de BLM est nécessaire pour la transcription des centromères

Figure 43 : Analyse de la fréquence de cUFBs immunomarqués par la protéine RPA

Figure 44 : Analyse des marquages de RPA versus BLM sur les cUFBs

Figure 45 : Analyse des non-disjonctions des centromères du chromosome 8 dans les cellules BS en anaphase

Figure 46 : Détection de régions centromériques au niveau des anomalies mitotiques dans les cellules BS

LISTE DES ABREVIATIONS

8-MOP : psoralène photo-activé	CAF1 : Chromatin Assembly Factor 1
ADN : Acide Désoxyribonucléique	CDA : Cytidine Désaminase
ADNdb : ADN double-brins	CDB : Cassures Double-Brins
ADNc : ADN complémentaire	ChIP : Chromatin ImmunoPrecipitation
ADNsb : ADN simple-brin	Complexe BTP : complexe BLM/Topo III α /BLAP75
ALT : Alternative Lengthening of Telomeres	CSB : Cassure Simple-Brin
AML : Acute Myeloid Leukemia	DAPI : Di-Amidino-Phenyl-Indol
APC/C : Anaphase Promoting Complex/Cyclosome	DHJ : Double-Jonction de Holliday
APH : Aphidicoline	EBV : Epstein-Barr Virus
AraC : Cytidine arabinoside	FA : Anémie de Fanconi
ARN : Acide Ribonucléique	FISH : Fluorescent In Situ Hybridization
ARNm : ARN messenger	GFP : Green Fluorescent Protein
AT : Ataxie Telangiectasie	HEK : Human Embryonic Kidney
ATM : Ataxia Telangiectasia Mutated protein	HRDC : Helicase and RNase D C-terminal
ATR : ATM and Rad3 Related	HU : Hydroxyurée
BASC : BRCA1-Associated genome Surveillance Complex	IRT : Intermédiaire de Réplication Tardif non-répliqué
BIR : Break Induced Replication	JH : Jonction de Holliday
BLMr : BLM recombinante	kb : kilobase
BrdU : 5-bromodéoxyuridine	KBD : Kinetochore Binding Domain
BS : Bloom Syndrome	kDa : kilo Dalton
	KT : Kinétochore
	M : Moltaire

MMCT : Microcell-Mediated Chromosome Transfer
MMC : Mitomycine C
MRN : MRE11/RAD50/NBS1
MT : Microtubule
NEB : Nuclear Enveloppe Breakdown
NHEJ : Non Homologous End Joining
NLS : Nuclear Localization Signal
NMD : Nonsense-mediated mRNA Decay
OB-fold : Oligonucléotide/oligosaccharide Binding Fold
ORF : Open Reading Frame
pb : paires de bases
PCR : Polymerase Chain Reaction
PDP : Prophase Dissolution Pathway
PICH : Plk1-interacting Checkpoint Helicase
Plk1 : Polo-Like Kinase 1
PML : Promyelotic Leukemia protein
POL : Polymérase
PP1 : Protein Phosphatase 1
PTC : Premature Termination Codon
RecQ-Ct : RecQ C-terminal
RH : Recombinaison Homologue
RI : Radiation Ionisante

RNAi : Interférence par ARN
ROS : Reactive Oxygen Species
RPA : Replication Protein A
RT : Reverse Transcription
SAC : Spindle Assembly Checkpoint ou point de contrôle de l'assemblage du fuseau
SCE : Sister Chromatide Exchange
SOD : Superoxide Dismutase
shRNA : ARN "short hairpin"
siRNA : ARN "small-interfering"
SCC : Sister Chromatids Cohesion
SCP : Somatic Crossover Point
SMC : Structural Maintenance of Chromosome
SM-BLM : Sumo-mutated BLM
SNP : Single-Nucleotide Polymorphism
SSB : Single Strand Binding protein
SUMO : Small Ubiquitine-like Modifier
SV40 : Simian Virus 40
Topo III α : Topo III α
UFB : UltraFine anaphase Bridge
UV : Rayonnements ultraviolets
XP : Xeroderma Pigmentosum

AVANT-PROPOS

L'instabilité génétique, élément moteur de l'évolution des espèces, est également la principale caractéristique des cellules cancéreuses. Elle apparaît dès les stades précoces de la cancérogenèse et s'aggrave au cours de l'évolution tumorale. L'étude des mécanismes conduisant à l'instabilité génétique demeure un enjeu crucial pour la compréhension et le traitement du cancer. C'est dans cette optique que notre laboratoire s'est spécialisé dans l'étude d'une maladie génétique extrêmement rare, le syndrome de Bloom. En effet, cette maladie présente à ce jour la meilleure corrélation connue entre une forte instabilité génétique et une prédisposition au développement de cancers à un âge très précoce. L'origine de ce syndrome est due à l'altération de la protéine BLM, une 3'-5' ADN hélicase de type RecQ. Bien qu'étudiée depuis des années, cette hélicase reste encore mal caractérisée et une connaissance précise de ses fonctions pourrait être essentielle pour faire un pas de plus dans la recherche contre le cancer.

Lors de mon arrivée au laboratoire, un rôle potentiel de la protéine BLM pendant la mitose était fortement pressenti et cette hypothèse a immédiatement constitué le cœur de mon projet de recherche. Très rapidement, mes travaux préliminaires m'ont permis de montrer que la protéine BLM est recrutée aux centromères des chromosomes lors de la mitose. J'ai donc décidé d'orienter mes recherches sur la fonction précise de BLM au niveau de ce locus bien particulier.

L'introduction de ce manuscrit se compose de deux parties. Le premier chapitre présentera la protéine BLM et la maladie associée à sa déficience : le syndrome de Bloom. Le chapitre suivant présentera des données structurales concernant le centromère afin de mieux comprendre ses fonctions lors de la mitose et le métabolisme associé à son ADN.

Comme le montreront les résultats de mes travaux de recherche, la protéine BLM a de fait un rôle essentiel dans le métabolisme de l'ADN centromérique en mitose, mais également dès la phase G2.

INTRODUCTION

“On gagne plus à avoir aimé qu'à avoir compris.”

Jean Rostand

Extrait des *Inquiétudes d'un biologiste*

CHAPITRE I : LA PROTEINE BLM

La protéine BLM est une ADN hélicase dont les fonctions sont encore mal connues. La déficience de cette protéine chez l'Homme est à l'origine d'une maladie génétique : le syndrome de Bloom, qui fera l'objet de la première partie de ce chapitre. La seconde partie de ce chapitre sera consacrée à la description des caractéristiques de la protéine BLM et à la présentation de ses fonctions supposées pendant la phase S.

Le syndrome de Bloom

Le syndrome de Bloom (BS) est une maladie génétique autosomique récessive très rare. Elle a été décrite pour la première fois en 1954 par un dermatologue, le Docteur David Bloom. La principale caractéristique visible des patients est un retard staturo-pondéral associé le plus souvent à un érythème du visage. Le Docteur Bloom qualifia alors initialement ce syndrome d'« érythème télangiectasique congénital évoquant un lupus érythémateux chez des nains ». En 1960, un programme de recensement de patients (registre du syndrome de Bloom) a été mis en place afin de mieux caractériser ce syndrome et a permis de suivre 168 patients (93 hommes et 75 femmes) entre 1960 et 1991 (German, 1969; German *et al.*, 1977a, German *et al.*, 1984; German and Passarge, 1989; German, 1989).

CARACTERISTIQUES CLINIQUES

Les deux caractéristiques cliniques constantes du syndrome de Bloom sont une petite taille et une prédisposition au développement de cancers (German, 1995).

La petite taille des patients BS est due à un retard staturo-pondéral prénatal persistant tout au long de leur vie. Ainsi la taille moyenne des hommes est de 1m47 et celle des femmes est de 1m38. Les patients BS ne présentent aucune disproportion caractéristique du nanisme et leur rapport poids/taille reste proportionné. Par ailleurs, cette petite taille n'est dûe ni à un défaut d'absorption ni à un défaut hormonal (Diaz *et al.*, 2006).

Les patients BS présentent également une prédisposition au développement de tous les types de cancers à un âge très précoce, ce qui constitue la caractéristique majeure du syndrome de Bloom. Les cent premiers cancers développés par 71 des 168 patients du registre du syndrome de Bloom ont été répertoriés. La distribution des cancers développés est similaire à celle de la population générale, en revanche, l'âge moyen d'apparition de 24,7 ans est beaucoup plus précoce (**Table 1**) (German, 1997).

Type de Cancer	Nombre de Cancers	Age moyen (années)
Carcinomes (n=51)		
Peau	8	26,9
Œsophage	4	40,6
Estomac	2	28,5
Colon	13	32
Larynx, épiglotte	3	29,3
Poumon	1	38
Col de l'utérus	4	21,2
Sein	7	32,4
Métastases	1	30
Lymphome (n=23)		
Maladie de Hodgkin	2	17,5
Autres	21	19,1
Leucémie aigües (n=21)		
Lymphocytaires	6	13,0
Myélocytaires	6	19,8
Autres	9	21,2
Tumeurs rares (n=5)		
Médulloblastome	1	3
Tumeur de Wilms	2	5,5
Sarcomes	2	9,5

Tableau 1 : Tableau récapitulatif des 100 premiers cancers développés par les patients du registre du syndrome de Bloom

Ce tableau indique que la distribution des cancers chez les patients BS est similaire à celle de la population générale. L'âge moyen d'apparition des cancers chez les patients BS est de 24,7 ans.

En outre, il n'est pas rare de retrouver chez les patients BS d'autres caractéristiques comme une dolichocéphalie associée à une hypoplasie malaire (visage long et étroit), un érythème du visage qui se développe dès les premières années de la vie des patients et s'intensifie après exposition au soleil, des zones d'hyper et d'hypopigmentation appelées taches « café au lait » localisées sur le tronc et les extrémités, une voix aigüe et nasillarde appelée « Mickey mouse voice » et un déficit immunitaire modéré, parfois sévère, qui se manifeste par une sensibilité accrue aux infections des voies ORL et du tractus intestinal. Ce déficit, qui est souvent à l'origine de la consultation des

patients, se résorbe progressivement avec l'âge. Enfin, certains patients présentent un diabète de type non-insulino-dépendant apparaissant en moyenne à l'âge de 24,9 ans (20 patients sur 168), ainsi qu'une infertilité due à une azoospermie chez les hommes et une fertilité réduite chez les femmes associée à une ménopause précoce (German, 1969, German, 1995).

CARACTERISTIQUES CYTOGENETIQUES

Le syndrome de Bloom appartient au groupe des maladies dites « cassantes » qui incluent notamment l'ataxie télangiectasie (AT), xeroderma pigmentosum (XP) et l'anémie de Fanconi (FA), des maladies associant toutes instabilité génétique et prédisposition tumorale. Les maladies « cassantes » se caractérisent par une forte instabilité génétique associée à la présence de cassures chromosomiques induites ou spontanées (German, 1969; German *et al.*, 1974). En effet, des études cytogénétiques effectuées sur des cultures de cellules dérivées de patients BS ont montré la présence de cassures spontanées et de réarrangements chromosomiques dans 15% des cellules observées (German *et al.*, 1965). Les cellules BS présentent également des figures quadriradiales dues à des échanges entre chromosomes homologues dans 1 à 5% de cellules mettant en évidence pour la première fois l'existence de crossing over dans des cellules somatiques chez l'homme (Chaganti *et al.*, 1974; German, 1964). Cependant la plus grande caractéristique cytogénétique des cellules BS est de présenter une fréquence anormalement élevée d'échanges entre chromatides sœurs (SCEs) (Chaganti *et al.*, 1974).

La visualisation de ces SCEs est rendue possible par l'incorporation dans l'ADN d'un analogue de base, le 5-bromodéoxyuridine (BrdU), en combinaison avec un colorant de l'ADN (Latt, 1973) (**Figure 1**). Il a ainsi été observé que les cellules BS présentent une augmentation d'un facteur 10 du taux de SCEs (Chaganti *et al.*, 1974; Sakamoto Hojo *et al.*, 1995), ce qui confère aux chromosomes, après coloration différentielle, une structure typique dite en « arlequin » (**Figure 2**). Cette particularité constitue jusqu'à présent le seul critère de diagnostic objectif du syndrome de Bloom. Les SCEs sont la manifestation cytologique d'événements de recombinaison homologue (RH) pendant la phase S. Plusieurs données expérimentales suggèrent que dans les cellules BS, les SCEs reflètent le redémarrage de fourches de réplication bloquées par la voie de la RH (Rao *et al.*, 2007) ainsi que la réparation de cassures double-brin de l'ADN (CDBs). Par ailleurs, nous avons montré au laboratoire que la formation des SCEs est entièrement dépendante de la RH médiée par la recombinaise RAD51 (Lahkim Bennani-Belhaj *et al.*, 2010a).

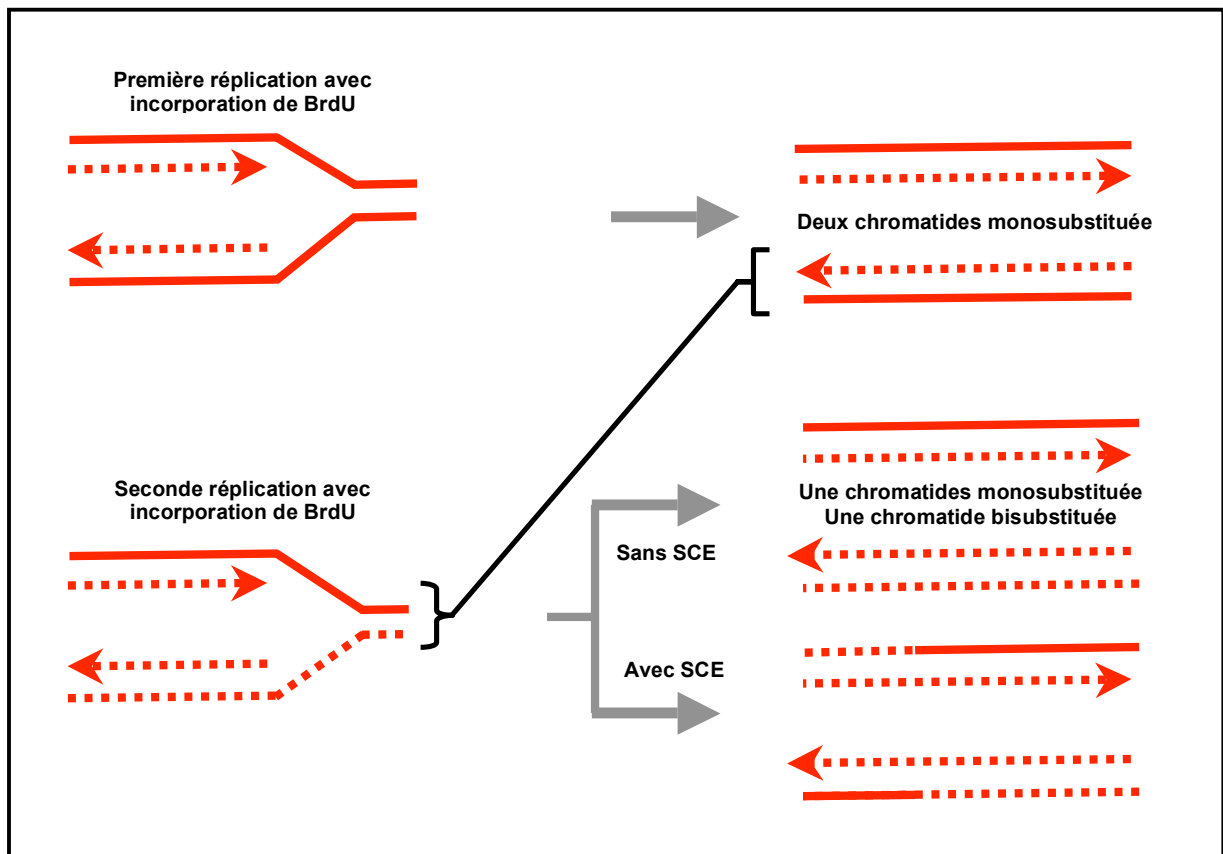


Figure 1 : Marquage différentiel des chromatides sœurs par incorporation de BrdU

Le BrdU est un analogue de la thymidine qui est efficacement incorporé dans l'ADN durant sa réplication. Cette réplication étant semi-conservative, le BrdU est incorporé dans les deux brins d'ADN nouvellement synthétisés conduisant ainsi à la formation de chromosomes comportant deux chromatides monosubstitués au BrdU (un seul brin sur les deux contient du BrdU). Après un deuxième cycle de réplication, la cellule comportera alors des chromosomes avec une chromatide sœur monosubstituée et une chromatide sœur bisubstituée (les deux brins d'ADN comportent du BrdU). Après coloration de l'ADN, les chromosomes apparaissent de manière sombre au microscope. Le BrdU ayant un effet « éclaircissant », les chromatides monosubstitués apparaissent alors plus sombres que les chromatides bisubstitués.

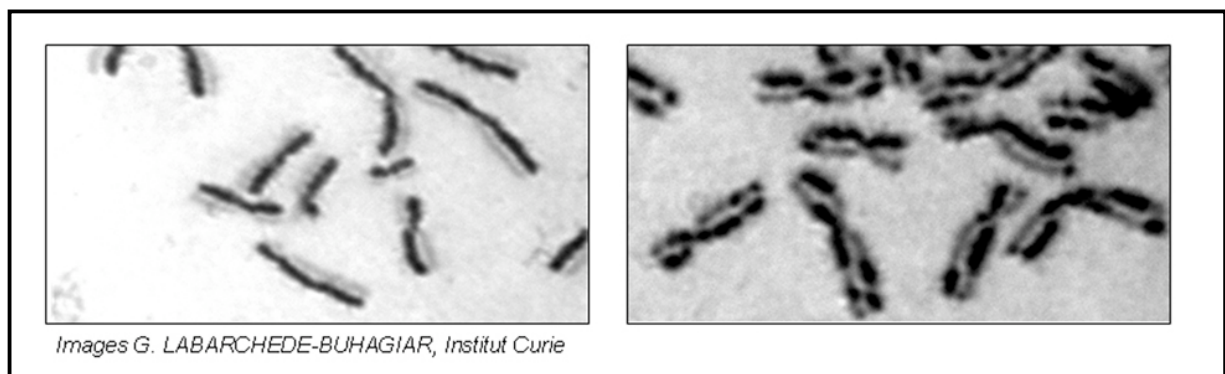


Figure 2 : Exemple de chromosomes métaphasiques d'une cellule normale (panneau de gauche) et d'une cellule BS (panneau de droite)

Dans le cas d'un échange entre chromatides sœurs au cours de la division cellulaire, il y aura alors alternance d'une zone claire et d'une zone sombre sur une même chromatide.

HYPOTHESES SUR L'ORIGINE DU SYNDROME DE BLOOM

Avant l'identification du gène *BLM*, deux hypothèses principales coexistaient pour tenter d'expliquer le phénotype BS (Nicotera, 1991; Sirover *et al.*, 1990).

Ainsi, il a été proposé que le syndrome de Bloom puisse être dû à un stress oxydant constitutif. En effet, il a été montré que des fibroblastes de patients BS secrètent un facteur clastogénique, qui, une fois concentré et purifié à partir de milieu de culture de cellules BS ou de sérum de patients BS, est capable d'induire des cassures chromosomiques dans des lymphocytes normaux. L'ajout de superoxyde dismutase (SOD) bovine qui est une enzyme importante du système de défense contre les radicaux libres au milieu de culture permet de supprimer en très grande partie son potentiel clastogène (Emerit and Cerutti, 1981). Par ailleurs, des études ont permis de montrer que les cellules BS (lignées fibroblastes et lymphoïdes issues de patients BS) présentent une augmentation constitutive d'un facteur 2, par rapport à des cellules contrôles, de l'activité de la SOD à cuivre, à zinc et à manganèse (Lee *et al.*, 1990; Nicotera *et al.*, 1989). Nicotera et ses collègues ont également mis en évidence une corrélation entre l'augmentation de la quantité d'espèces oxygénées réactives (ROS) par traitement avec des agents oxydants dans des cellules normales et une augmentation du taux de SCEs. Il a ainsi été montré que le traitement des cellules BS par un agent antioxydant (α -tocopherol) permet une réduction du taux de SCEs (17 à 30%). Enfin, cette même étude a montré que les cellules BS présentent effectivement une augmentation, d'un facteur 3 environ, d'intermédiaires oxygénés réactifs tels que l'anion superoxyde ou le peroxyde d'hydrogène (Nicotera *et al.*, 1993). L'ensemble de ces données démontrent l'existence d'un stress oxydant constitutif dans les cellules BS. En revanche, ce stress est l'origine de seulement une partie des SCEs car le taux de SCEs dans des cellules traitées par agents oxydants reste malgré tout très inférieur à celui des cellules BS (Nicotera *et al.*, 1989).

La seconde hypothèse proposait qu'une perturbation des mécanismes assurant l'intégrité de l'ADN soit à l'origine du syndrome de Bloom, hypothèse qui a largement été privilégiée avec la découverte du gène *BLM* dont les mutations sont à l'origine du syndrome de Bloom.

LA DECOUVERTE DU GENE *BLM*

Quinze ans après la découverte de cette maladie, James German montrait que le mode de transmission du syndrome de Bloom est autosomique récessif suite à une étude portant sur 21 familles comprenant 27 membres BS (German, 1969). Cependant la rareté de ce syndrome a

considérablement retardé la progression des recherches et notamment la découverte du gène impliqué dans la maladie.

Histoire de la localisation du gène *BLM*

En 1992, des expériences de « transfert de chromosome » par micro-injection (MMCT : Microcell-Mediated Chromosome Transfer) ont permis de localiser le locus *BLM* sur le chromosome 15 en montrant que le taux élevé de SCEs chez les cellules BS est corrigé par la région distale de ce chromosome (15q14-qter) (McDaniel and Schultz, 1992). Peu après, l'analyse moléculaire du chromosome 15 d'un patient atteint à la fois du syndrome du Bloom et du syndrome de Prader Willi, dont le gène est également situé sur ce chromosome, a permis d'affiner la localisation du gène *BLM*. Cette analyse a montré que le patient présentait une disomie uniparentale d'origine maternelle se caractérisant par la présence de deux chromosomes d'une même paire provenant de la mère, et qu'un événement de recombinaison méiotique avait induit une hétérodisomie de la région proximale 15q, disomie où les deux copies proviennent de chromosomes différents, ainsi qu'une isodisomie de la région distale 15q, disomie où les deux copies proviennent du même chromosome. Cet événement a provoqué une perte d'hétérozygotie au niveau de la région distale du locus 15q25 indiquant que le gène *BLM* était compris entre ce locus et le télomère (Woodage *et al.*, 1994).

Une étude basée sur la méthode de « cartographie par homozygotie » a finalement permis de localiser précisément le gène *BLM* (German *et al.*, 1994). Cette technique était basée sur la recherche de marqueurs polymorphes de la région 15q qui seraient plus fréquemment homozygotes chez les patients BS issus de parents consanguins que dans la population générale. L'existence d'un tel marqueur a ainsi été confirmée chez 25 des 26 patients analysés et le gène *BLM* a pu être localisé dans un intron du proto-oncogène *FES* situé en 15q26.1 (German *et al.*, 1994).

Identification du gène *BLM*

Une observation surprenante faite par James German et confirmée par la suite, a révélé que 20% des patients BS présente une population mineure de lymphocytes B et T dit « révertants », avec un taux de SCEs normal (Foucault *et al.*, 1997; German *et al.*, 1977b; Weksberg *et al.*, 1988; Willis *et al.*, 1989). Ces patients étant nés de parents non-consanguins, il en avait été déduit qu'ils étaient

hétérozygotes composites (présentant deux allèles du gène *BLM* portant des mutations différentes) et qu'une recombinaison somatique intragénique entre les allèles *BLM* paternel et maternel aurait permis de générer un allèle *BLM* sauvage sur le chromosome 15 dans ces cellules, expliquant ainsi le taux normal de SCEs. Cette hypothèse a été confirmée avec l'observation d'une perte d'hétérozygotie de la région distale au locus correspondant à l'oncogène FES en 15q26.1 dans certaines cellules révertantes (Ellis *et al.*, 1995b).

Sur la base de ces observations, Ellis et ses collègues ont utilisé une stratégie originale et unique de cartographie de point de recombinaison somatique (SCP : Somatic Crossover Point) pour le clonage du gène *BLM*. Cette stratégie repose sur l'analyse et la comparaison de l'homozygotie ou l'hétérozygotie des marqueurs polymorphes de type microsatellite de la région 15q26.1 de cellules présentant soit un phénotype BS soit un phénotype révertant et provenant d'un même patient. L'identification d'un locus proximal hétérozygote dans une cellule de phénotype BS devenu homozygote dans une cellule révertante ainsi que l'identification d'un locus distal resté hétérozygote dans les deux types cellulaires a permis de définir une région critique de 250 kb dans laquelle le gène *BLM* devait se situer (Ellis *et al.*, 1995b). À partir de cette région génomique un ADN complémentaire (ADNc) contenant une phase de lecture ouverte a été isolé. La présence de mutations non-sens sur ce gène ainsi que l'absence de transcrits spécifiques chez des patients BS suggéraient fortement qu'il s'agissait bien du gène *BLM*. L'analyse de séquence de cet ADNc a montré qu'il codait pour une protéine de 1417 acides aminés dont la masse moléculaire prédite est de 159 kilodalton (kDa). Cette protéine présente beaucoup d'homologies avec la sous-famille des hélicases de type RecQ. Les auteurs en ont alors conclu que cette protéine devait être très probablement une hélicase impliquée dans le métabolisme de l'ADN (Ellis *et al.*, 1995a).

Depuis, 77 mutations du gène *BLM* ont été identifiées (Amor-Guéret *et al.*, 2008; Barakat *et al.*, 2000; Calin *et al.*, 1998; Ellis *et al.*, 1995a; Foucault *et al.*, 1997; German *et al.*, 2007; Kaneko *et al.*, 1996) et sont répertoriées dans une base de données : « BLMbase : Mutation registry for Bloom syndrome » (<http://bioinf.uta.fi/BLMbase/>) (Rong *et al.*, 2000). La grande majorité de ces mutations aboutissent à la formation d'un codon stop prématuré soit par substitution de base (mutation non-sens) soit par décalage du cadre de lecture. La présence de ce codon stop prématuré conduit à la dégradation de l'ARN messager (ARNm) par le Nonsense-mediated mRNA decay (NMD) (Grigorieva, Amor-Guéret, communication personnelle), ce qui conduit à l'absence de protéine détectable dans les cellules BS. Les mutations précédemment citées sont retrouvées dans des populations d'origines ethniques différentes à l'exception d'une mutation particulière appelée *blmAsh* (délétion de 6 paires de bases et insertion de 7 paires de bases au

nucléotide 2207) retrouvée à l'état homozygote chez tous les patients BS d'origine juive ashkénaze, et retrouvée à l'état hétérozygote chez 1 individu d'origine juive ashkénaze sur 102 (soit 0.98%) indiquant un effet fondateur de la maladie dans cette population (Ellis *et al.*, 1998; Roa *et al.*, 1999).

LE GENE *BLM* CODE POUR UNE HELICASE DE TYPE RECQ

Les hélicases sont des moteurs moléculaires qui ont pour principale fonction de désappairer des molécules d'ADN double brin (ADNdb) en ADN simple brin (ADNsb). Cette fonction est essentielle aux processus dans lesquels l'accès à l'ADNsb est nécessaire comme la réplication, la réparation ou encore la transcription de l'ADN (van Brabant *et al.*, 2000a).

La sous-famille des hélicases de type RecQ

La sous-famille des hélicases de type RecQ est composée de protéines très conservées au-cours de l'évolution et à travers les espèces, on les retrouve aussi bien chez les eucaryotes que chez les procaryotes. Le premier membre cloné de cette famille est l'hélicase RecQ d'*E. coli* (Nakayama *et al.*, 1985) et depuis, tous les homologues de ce premier membre ayant été découverts sont rattachés à cette famille d'hélicases.

Les hélicases RecQ comptent de nombreux membres identifiés dans plusieurs espèces. Ainsi, on retrouve une hélicase de type RecQ chez la bactérie *E. coli* (RecQ) et la levure *S. cerevisiae* (Sgs1), deux membres de cette famille chez la levure *S. pombe* (Rqh1 et RQ2), le xénope (xBLM et FFA-1) et la drosophile (dmBLM et dmRecQ5) et quatre membres chez la souris (mBlm, mWRN, mRecQ4 et mRecQ5). Enfin, l'Homme en possède cinq : BLM, WRN, RecQL1, RecQL4 ainsi que RecQL5, qui présente elle-même trois isoformes issues de l'épissage alternatif de l'ARNm (Shimamoto *et al.*, 2000). En règle générale, il est considéré que le nombre, la taille et la complexité des homologues RecQ augmentent avec la complexité des organismes (Cogoni and Macino, 1999; Ellis *et al.*, 1995a; Hartung *et al.*, 2000). Cependant, des exceptions existent : par exemple, la plus grande hélicase connue à ce jour est exprimée par la levure *S. pombe* (Mandell *et al.*, 2005) et la plante *A. thaliana* présente 7 hélicases de type RecQ (Hartung and Puchta, 2006) (**Figure 3**).

Les domaines des hélicases de type RecQ

Comme toutes les hélicases, les hélicases de type RecQ sont caractérisées biochimiquement par leur activité hélicase et structurellement par la présence de huit motifs spécifiques d'acides aminés : 0, I, Ia, II, III, IV, V et VI (Bernstein et Keck, 2003; Gorbalenya *et al.*, 1989). Cette séquence est généralement désignée par la terminologie « core helicase » ou domaine hélicase (**Figure 3**). Les motifs I et II présentent notamment de fortes homologues avec les boîtes A et B du domaine de liaison aux nucléosides triphosphates (NTP) du motif Walker (Walker *et al.*, 1982). Ces boîtes sont impliquées dans la liaison et l'hydrolyse des NTPs. Ainsi les acides aminés GxGKS/T présents dans le motif I interagissent avec le carbone 6 du sucre et les phosphates des cofacteurs nucléotidiques. Le motif II contient un résidu aspartate hautement conservé qui lie l'ion Mg^{2+} et un résidu glutamine jouant tous les deux un rôle lors de la réaction de dégradation de l'ATP nécessaire au fonctionnement de l'enzyme. Le motif II contient également une séquence Asp-Glu-x-His (DExH) caractéristique de ces hélicases (Gorbalenya *et al.*, 1989).

Outre le domaine hélicase, les hélicases RecQ se caractérisent également par d'autres domaines et notamment les domaines RecQ-Ct et HRDC (**Figure 3**). La majorité des hélicases de type RecQ présente un domaine RecQ-Ct (pour RecQ carboxy-terminal) contenant 2 sous-domaines : le premier « plateforme d'interaction par le zinc » et le second « winged helix », formant une structure hélice-boucle-hélice très conservée. Par leur structure spécifique formant un large sillon à la surface de la protéine, il est probable que ces domaines servent de site de liaison à l'ADNdb (Bernstein *et al.*, 2003). Le domaine RecQ-Ct semble également important dans le maintien de l'intégrité structurale et dans la stabilité de l'hélicase (Guo *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2004) et serait impliqué dans la liaison à d'autres protéines (Vindigni and Hickson, 2009). D'autre part, ce domaine contient une séquence spécifique responsable d'une forte affinité pour les substrats d'ADN de type G4 quadruplexes ou pour les structures mimant des intermédiaires de réplication ou de recombinaison (Cf : Les substrats de la protéine BLM) (Huber *et al.*, 2006). Parmi les 77 mutations identifiées chez les patients BS, 14 sont faux-sens et se localisent toutes soit dans le domaine hélicase de la protéine, soit dans le domaine RecQ-Ct (Rong *et al.*, 2000). Ceci suggère que la perte de la fonction hélicase ou de la fonction de fixation à l'ADN aurait un rôle primordial dans le développement de la maladie.

Enfin les hélicases RecQ présentent une troisième région conservée : le domaine HRDC (Helicase and RNase-D like C-terminal domain). Il est le moins conservé des 3 principaux domaines caractérisant ces hélicases et a été défini par analogie avec le domaine C-terminal de la RNase D (Morozov *et al.*, 1997). Plusieurs études sont en faveur d'un rôle de ce domaine dans l'interaction avec l'ADN, soit pour apporter une spécificité dans l'interaction avec les substrats

(ADNsb ou ADNdb et structures secondaires de l'ADN), soit pour la processivité de l'hélicase sur son substrat (Vindigni et Hickson, 2009).

Certaines hélicases RecQ se différencient des autres par la présence d'autres domaines qui ne sont pas présents sur l'ensemble des hélicases de cette famille (**Figure 3**), mais conservés, en revanche, entre les orthologues indiquant qu'ils pourraient conférer des spécificités d'actions (Huber *et al.*, 2006).

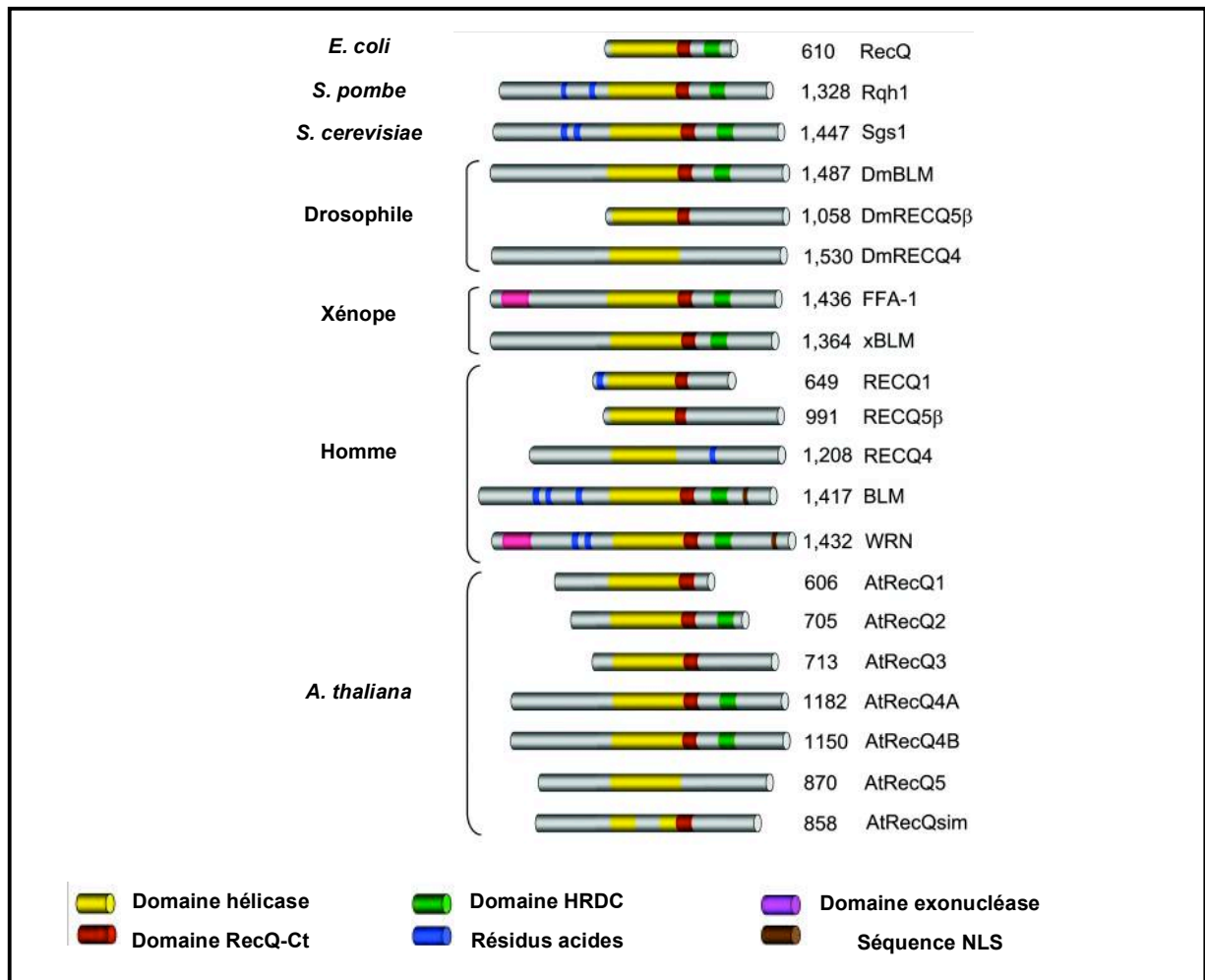


Figure 3: Représentation schématique de certains membres de la famille des hélicases RecQ

Les différents organismes auxquels appartiennent les hélicases sont indiqués à gauche et la taille (en acides aminés) ainsi que le nom de l'hélicase sont indiqués à droite. Toutes les protéines sont alignées selon leur domaine hélicase coloré en jaune. Les domaines conservés RQC et HRDC sont respectivement colorés en rouge et vert. Le domaine exonucléase de WRN et ses orthologues est coloré en rose. Les régions riches en acides aminés acides, caractéristiques de certains membres de la famille des hélicases de type RecQ dont BLM, sont colorées en bleu. Les séquences NLS identifiées chez certains membres sont colorées en marron. Les régions colorées en gris correspondent à des régions faiblement conservées entre les différentes protéines (d'après Alessandro Vindigni *et al.*, 2009).

Caractéristiques des hélicases de type RecQ

Les hélicases RecQ peuvent être classées en deux groupes en fonction de leur taille ainsi que de la présence ou non de domaines N- ou C-terminaux : le premier groupe de bas poids moléculaire contient les protéines RecQ, RecQL1 et RecQL5, dont les tailles varient de 410 à 649 acides aminés et le second groupe, de haut poids moléculaire, est constitué des protéines WRN, BLM, RecQL4, Sgs1 et Rqh1 dont les tailles varient de 1208 à 1432 acides aminés et qui possèdent au niveau de leurs régions N et C-terminales des domaines riches en acides aminés acides (**Figure 3**). L'activité hélicase a été testée dans la majorité des protéines : elles présentent toutes une activité de polarité 3'-5' dépendante de l'ATP (Bennett *et al.*, 1998; Chen *et al.*, 2001; Cui *et al.*, 2003; Garcia *et al.*, 2004; Gray *et al.*, 1997; Karow *et al.*, 1997; Ozsoy *et al.*, 2003; Umezumi et Nakayama, 1993; Xu et Liu, 2009)

Les absences (ou altérations) de BLM, WRN ou RecQL4 sont respectivement à l'origine du syndrome de Bloom (Ellis *et al.*, 1995a), du syndrome de Werner (Gray *et al.*, 1997) et du syndrome de Rothmund-Thomson (Kitao *et al.*, 1999). Des mutations du gène RecQL4 sont également associées à deux autres maladies : le syndrome RAPADILINO (Siitonen *et al.*, 2003) et le syndrome de Baller-Gerold (Kellermayer, 2006). Par ailleurs, toutes ces pathologies associent instabilité génétique et cancers, à l'exception du syndrome de Baller-Gerold. Ainsi la compréhension des processus de cancérogenèse passe en partie par la caractérisation des fonctions précises des hélicases de type RecQ.

La protéine BLM

En 1997, des études *in vitro* ont montré que la protéine BLM recombinante (BLMr) possède une activité d'hydrolyse de l'ATP qui dépend de la présence d'ADNsb ou d'ADNdb ainsi qu'une activité hélicase de polarité 3'-5' comme il l'avait été proposé 2 ans auparavant lors de sa découverte (Karow *et al.*, 1997). Ainsi, BLMr est capable de désappairer des duplexes d'ADN à extrémité 3' débordante et des bulles internes mais est incapable de désappairer des duplexes d'ADN à extrémité 5' débordante ou à bout franc (Mohaghegh *et al.*, 2001). Cette activité hélicase a depuis été démontrée à partir d'une protéine BLM endogène (Dutertre *et al.*, 2002).

LES CARACTERISTIQUES DE LA PROTEINE BLM

Les substrats de la protéine BLM

Les figures quadriradiales et l'augmentation du taux de SCEs observées dans les cellules BS reflètent un phénotype d'hyperrecombinaison (Lonn *et al.*, 1991) indiquant que la protéine BLM inhibe les événements de RH. Dans le but d'élucider les mécanismes sous-jacents, des études *in vitro* ont alors été entreprises afin de déterminer les substrats préférentiels de BLM (**Figure 4**).

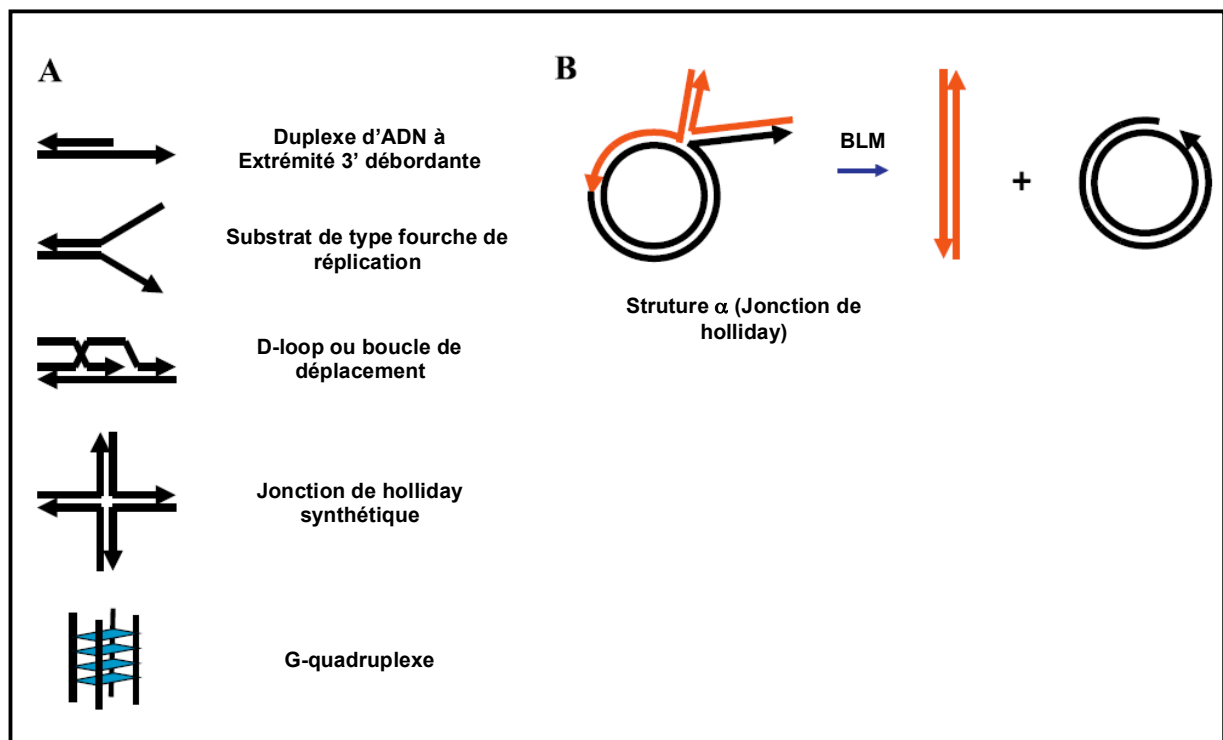


Figure 4: Les substrats de l'hélicase BLM

(A) BLMr est capable de désappairer des structures ADN mimant des fourches de réplication ou des intermédiaires de recombinaison

(B) BLMr est capable d'effectuer de la migration de branches sur des structures α (structure de type Jonction de Holliday) (d'après Chan *et al.*, 2011).

Il a ainsi été montré que BLMr dissocie des structures de type α , résultant de l'échange de brin médié par la protéine recombinante RecA de *E. coli* entre un oligonucléotide simple brin et un duplexe d'ADN circulaire (Karow *et al.*, 2000). De manière similaire, BLMr est également capable de se fixer et de promouvoir la migration de branche d'une jonction de Holliday (JH) synthétique (Karow *et al.*, 2000; Mohaghegh *et al.*, 2001). Il a alors été proposé pour la première fois un rôle de la protéine BLM *in vivo* permettant la migration de branche d'une fourche de réplication ayant

régressée (Cf: BLM et la réplication). La protéine BLMr peut également se fixer sur des structures de type boucle D (D-loop ou boucle de déplacement), structures d'ADN formées durant la RH, et dissocier le brin envahissant, qu'il soit de polarité 3' ou 5' (Bachrati *et al.*, 2006; van Brabant *et al.*, 2000b). Enfin, la protéine BLMr est également capable de dissocier des structures de type G-quadruplexe en ADNsb (Mohaghegh *et al.*, 2001; Sun *et al.*, 1998). Les G-quadruplexes résultent de l'appariement de 4 brins d'ADNsb par des liaisons de Hoogsteen entre les bases guanines et se retrouvent principalement au niveau de l'ADN télomérique et des promoteurs (Huppert et Balasubramanian, 2007; Mills *et al.*, 2002).

Toutes ces données ont permis de classer ces substrats par affinité de la protéine. Ainsi, BLMr présente une très forte affinité pour les G-quadruplexes ainsi que pour les boucles D (Bachrati *et al.*, 2006; Mohaghegh *et al.*, 2001; Sun *et al.*, 1998). Elle présente une affinité plus faible pour les JHs synthétiques (Karow *et al.*, 2000; van Brabant *et al.*, 2000b). Enfin, BLMr présente une faible affinité pour les duplexes d'ADN à extrémité 3' débordante comparée à tous les substrats cités précédemment.

Comme il vient de l'être indiqué, BLM, à l'instar de toutes les autres hélicases, présente une activité de désappariement de duplexes d'ADN, en revanche de manière plus surprenante BLMr présente également une activité d'appariement de brins d'ADN complémentaires (Cheok *et al.*, 2005). En effet, il a été remarqué qu'une importante concentration de protéines BLMr entraîne l'inhibition de son activité hélicase. L'activité d'appariement de brin est favorisée proportionnellement à la longueur du duplexe d'ADN et nécessite les domaines C-terminaux de la protéine impliqués dans la fixation de l'ADN. En revanche, cette activité est inhibée par une augmentation de la concentration en ATP ou en ADNsb et est abolie par la présence de la protéine RPA (Bartos *et al.*, 2006; Cheok *et al.*, 2005; Machwe *et al.*, 2006). Ces résultats sont en faveur d'un équilibre entre l'activité hélicase et l'activité d'appariement de brin de la protéine BLM, équilibre qui serait déplacé selon les conditions cellulaires. Par ailleurs, il a été montré qu'au moyen de son activité d'appariement de brins, BLMr est capable de promouvoir la régression d'une fourche de réplication synthétique (Machwe *et al.*, 2006). En effet, dans un premier temps l'activité hélicase de BLM permettrait la dissociation des brins néo-synthétisés des brins matrices, et dans un second temps, l'appariement des brins néo-synthétisés entre eux, formant ainsi une structure dite en « chicken foot », comportant une JH (**Figure 5**). De manière intéressante, la protéine hélicase WRN présente également cette activité (Machwe *et al.*, 2006).

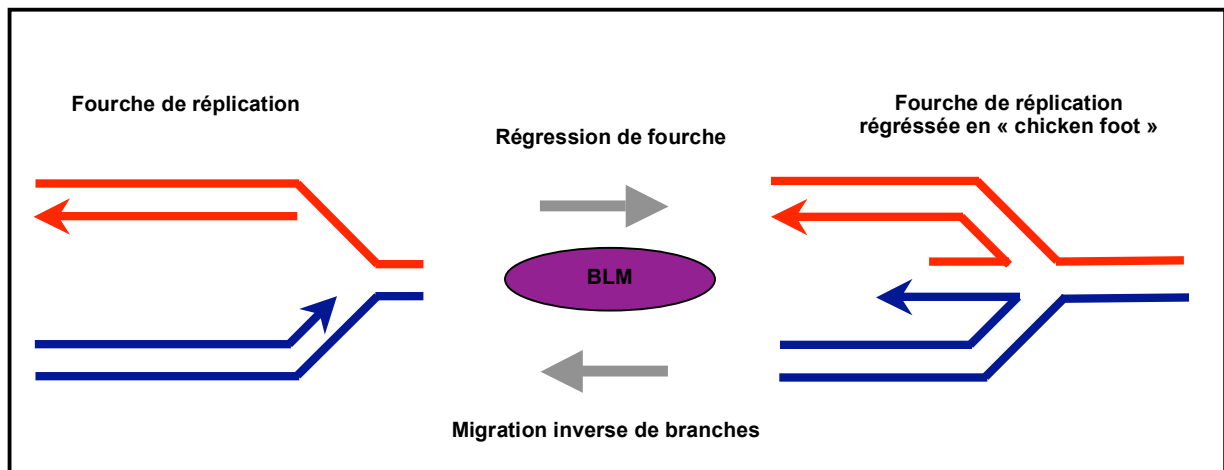


Figure 5 : Illustration des activités de régression de fourche et de migration inverse de branches de la protéine BLM

BLM est capable de coordonner son activité d'appariement et de désappariement des brins d'ADN permettant ainsi de faire de la régression de fourche de réplication et de la migration inverse de branches pour rétablir cette fourche.

Structure oligomérique de la protéine BLM

La plupart des hélicases présentent une structure oligomérique, et une même hélicase peut présenter plusieurs structures oligomériques différentes (Vindigni et Hickson, 2009). Karow et ses collègues ont réalisé des expériences de chromatographie d'exclusion avec la protéine BLM et ont montré que la majorité des molécules actives de BLM a une masse moléculaire apparente supérieure à 700 kDa, suggérant que la protéine BLM est active sous forme oligomérique. Par microscopie électronique, ils ont ensuite montré que la protéine BLM forme majoritairement des structures oligomériques symétriques et annulaires de type hexamère ou tétramère (Karow *et al.*, 1999), similaires aux structures oligomériques décrites pour l'hélicase RecQ d'*E. coli* (Harmon et Kowalczykowski, 2001). Toutefois, la signification biologique de l'état oligomérique de BLM reste à déterminer.

Expression de la protéine BLM

La protéine BLM est exprimée dans toutes les cellules en phase proliférative avec cependant une expression plus importante dans les testicules et le thymus. Dans les tissus tumoraux, il existe une forte corrélation entre le niveau d'expression de la protéine et le statut prolifératif de la tumeur (Turley *et al.*, 2001) ce qui est cohérent avec sa variation d'expression au cours du cycle cellulaire. En effet, BLM n'est pas détectable par western blot en phase G1, s'accumule en phase S et

persiste en phase G2 et pendant la mitose (Dutertre *et al.*, 2000; Gharibyan et Youssoufian, 1999; Sanz *et al.*, 2000).

Localisation de la protéine BLM

La protéine BLM est nucléaire. Cette localisation dépend d'un domaine de localisation nucléaire (NLS) puisque la perte de ce domaine conduit à une localisation uniquement cytoplasmique de la protéine (Gharibyan et Youssoufian, 1999; Hayakawa *et al.*, 2000; Kaneko *et al.*, 1997).

En conditions basales, outre une fraction du pool de protéines BLM qui localise au niveau des nucléoles en début de phase S (Sanz *et al.*, 2000; Yankiwski *et al.*, 2000; Yankiwski *et al.*, 2001), la majorité de ce pool réside dans deux types de structures nucléaires. La première est constituée de zones diffuses et finement granulaires appelées « microspeckles » dont la fonction et la composition sont à l'heure actuelle toujours inconnues (Yankiwski *et al.*, 2000; Zhong *et al.*, 1999). La seconde est constituée de foyers brillants et discrets dont le nombre et l'intensité varient au cours du cycle pour atteindre un maximum en fin de phase S et début de phase G2 (Bischof *et al.*, 2001; Gharibyan et Youssoufian, 1999; Sanz *et al.*, 2000; Yankiwski *et al.*, 2000; Zhong *et al.*, 1999). La majorité de ces foyers co-localisent avec les corps nucléaires ND10/PML (Promyoletic Leukemia Protein) qui servent probablement de lieu de stockage de la protéine BLM (Bachrati et Hickson, 2003; Yankiwski *et al.*, 2000; Yankiwski *et al.*, 2001; Zhong *et al.*, 1999). Il a également été rapporté que certains de ces foyers colocalisent avec des foyers de réplication, visualisés par immunomarquage de la protéine PCNA (Proliferating-Cell Nuclear Antigen) ou à l'aide d'un bref marquage de l'ADN au BrdU (Yankiwski *et al.*, 2000). Des expériences d'hybridation *in situ* en fluorescence (FISH, Fluorescence in-situ hybridization) ont montré qu'une faible partie de ces foyers localisait également avec des séquences télomériques (Yankiwski *et al.*, 2000).

L'analyse de BLM au cours du cycle cellulaire a également révélé que cette protéine est hyperphosphorylée pendant la mitose. De manière surprenante, BLM hyperphosphorylée est exclue de la fraction protéique insoluble correspondant principalement à la chromatine et au cytosquelette et se retrouve sous forme soluble dans la cellule (Dutertre *et al.*, 2000). Cependant, une fraction du pool de cette protéine BLM hyperphosphorylée est tout de même associée au fuseau mitotique (comprenant les centrosomes, microtubules et kinétochores) pendant la pré-métaphase comme cela a été révélé par des études du phosphoprotéome mitotique (Nousiainen *et al.*, 2006).

PARTENAIRES DE LA PROTEINE BLM

En parallèle de la recherche de substrats pour la protéine BLM, les recherches se sont également portées sur l'identification d'éventuels partenaires avec l'objectif commun d'identifier à terme les fonctions potentielles de BLM. En quelques années, de nombreuses protéines ont été décrites comme interagissant avec la protéine BLM, cependant la plupart d'entre elles n'interagit avec BLM que de manière transitoire ou indirecte. Ainsi, il est proposé que seules la Topoisomérase III α (Topo III α), RMI1, RMI2 et RPA composent le cœur du complexe protéique associé à BLM également désigné « BLM core complex » (Figure 6) (Liu et West, 2008).

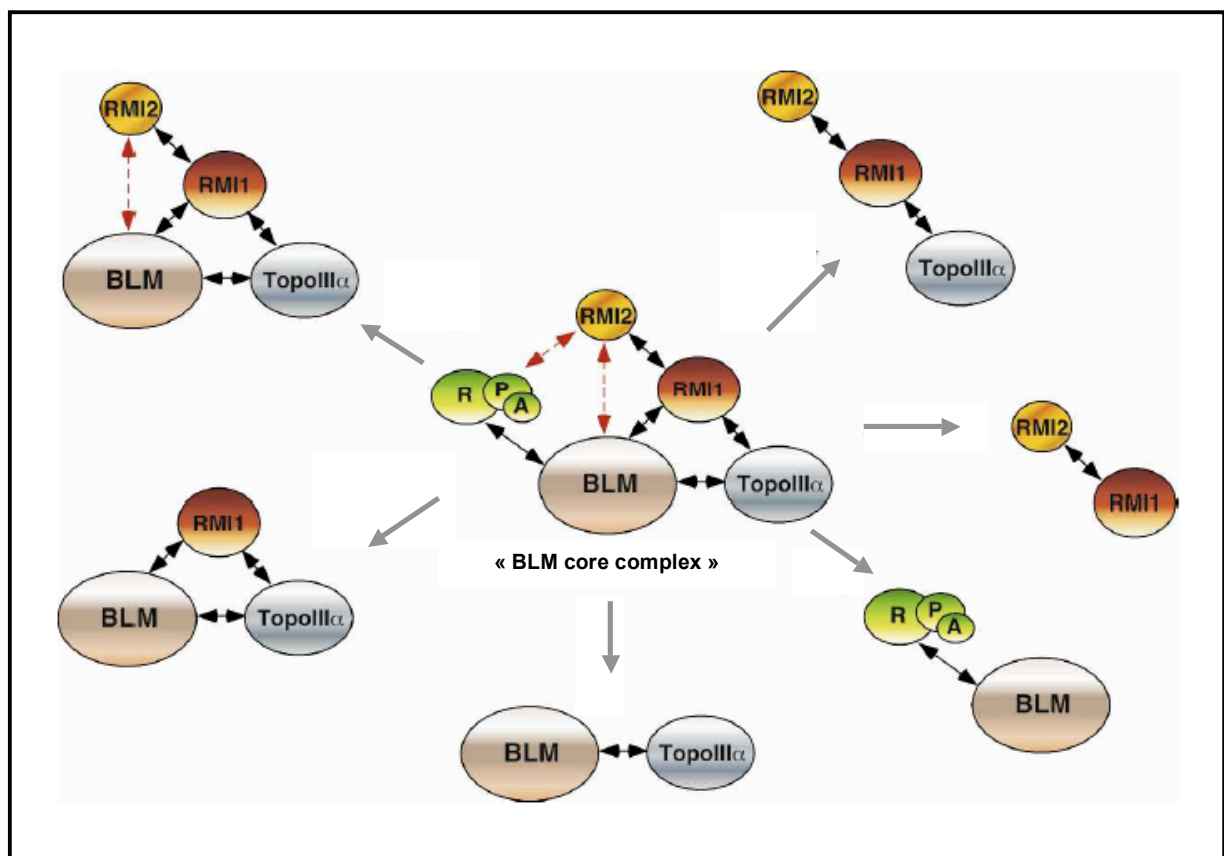


Figure 6 : Le «BLM core complex»

Représentation schématique du «BLM core complex» et des différents sous-complexes existant dans les cellules humaines. Les interactions directes et potentielles entre protéines sont représentées par des flèches noires et rouges respectivement (d'après Li *et al.*, 2007).

Le « BLM core complex »

L'existence de ce « BLM core complex » a été identifiée en 2003 suite à l'analyse par spectrométrie de masse d'immunoprécipitats de la protéine BLM (les protéines RMI1 et RMI2 ayant été identifiées mais caractérisées par la suite) (Meetei *et al.*, 2003).

La topoisomerase III α

La réplication conduit à la formation de tensions topologiques comme des super-enroulements de l'ADN ainsi que des entremêlements, également appelées caténations de l'ADN (Cf: La décaténation des centromères). La suppression de ces contraintes est vitale pour la cellule notamment afin d'achever la réplication de son ADN et de permettre la séparation des chromatides sœurs durant la mitose. Pour y parvenir, tous les organismes disposent d'enzymes spécialisées appelées topoisomérases capables de cliver et relier des brins d'ADN. Au moyen d'une réaction de transestérification, un seul brin d'ADN ou une hélice d'ADN peuvent passer les uns à travers les autres libérant ainsi les contraintes associées à ces molécules d'ADN (**Figure 7**) (Wang, 2002).

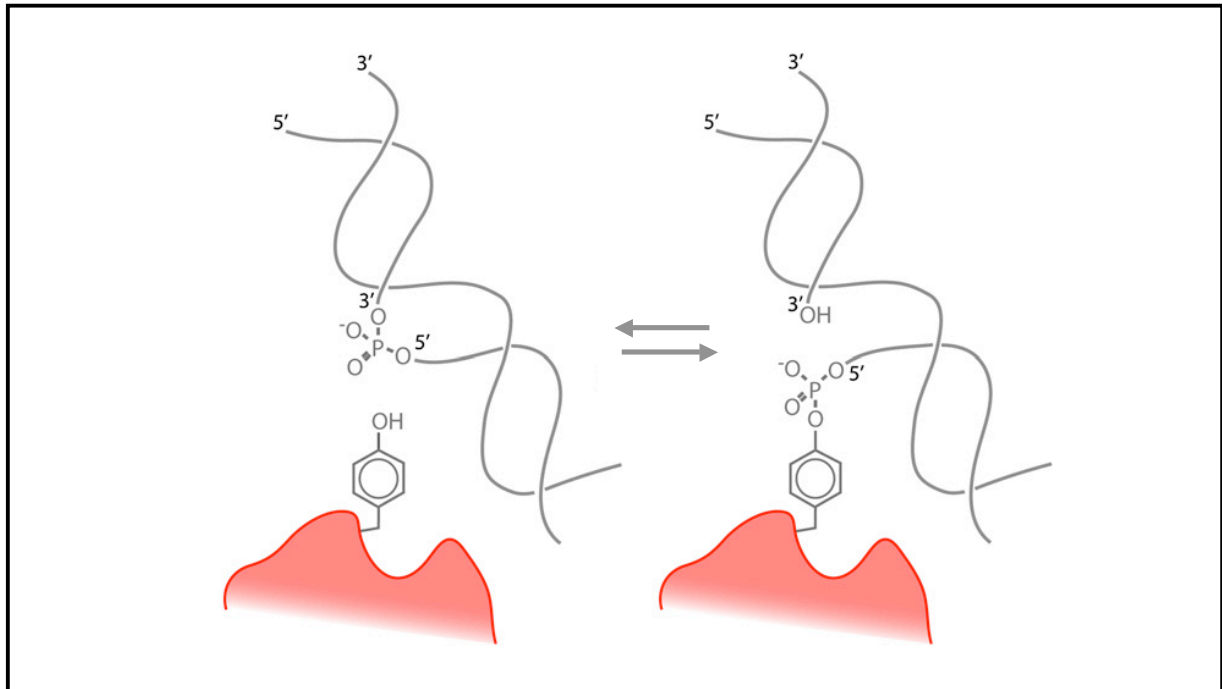


Figure 7 : Mécanisme de clivage de molécules d'ADN par les topoisomérases de type IA et de type II

Les topoisomérases utilisent un résidu tyrosine pour cliver la liaison phosphodiester de l'ADN par transestérification. Dans la réaction catalysée par les topoisomérases de type IA ou de type II, le site actif tyrosine se lie de façon covalente avec l'extrémité 5' du brin d'ADN clivé comme indiqué sur la figure (dans la réaction catalysée par les topoisomérases de type IB, le site actif tyrosine se lie de façon covalente avec l'extrémité 3' du brin d'ADN clivé). La religation de l'ADN se fait par réaction inverse (Viard *et al.*, 2007).

Ces enzymes peuvent être de deux types : les topoisomérase de type IA et IB, capables de cliver un seul brin d'ADN (**Figure 8**), et les topoisomérase de type II, capables de cliver un duplexe d'ADN (Cf : La décaténation des centromères).

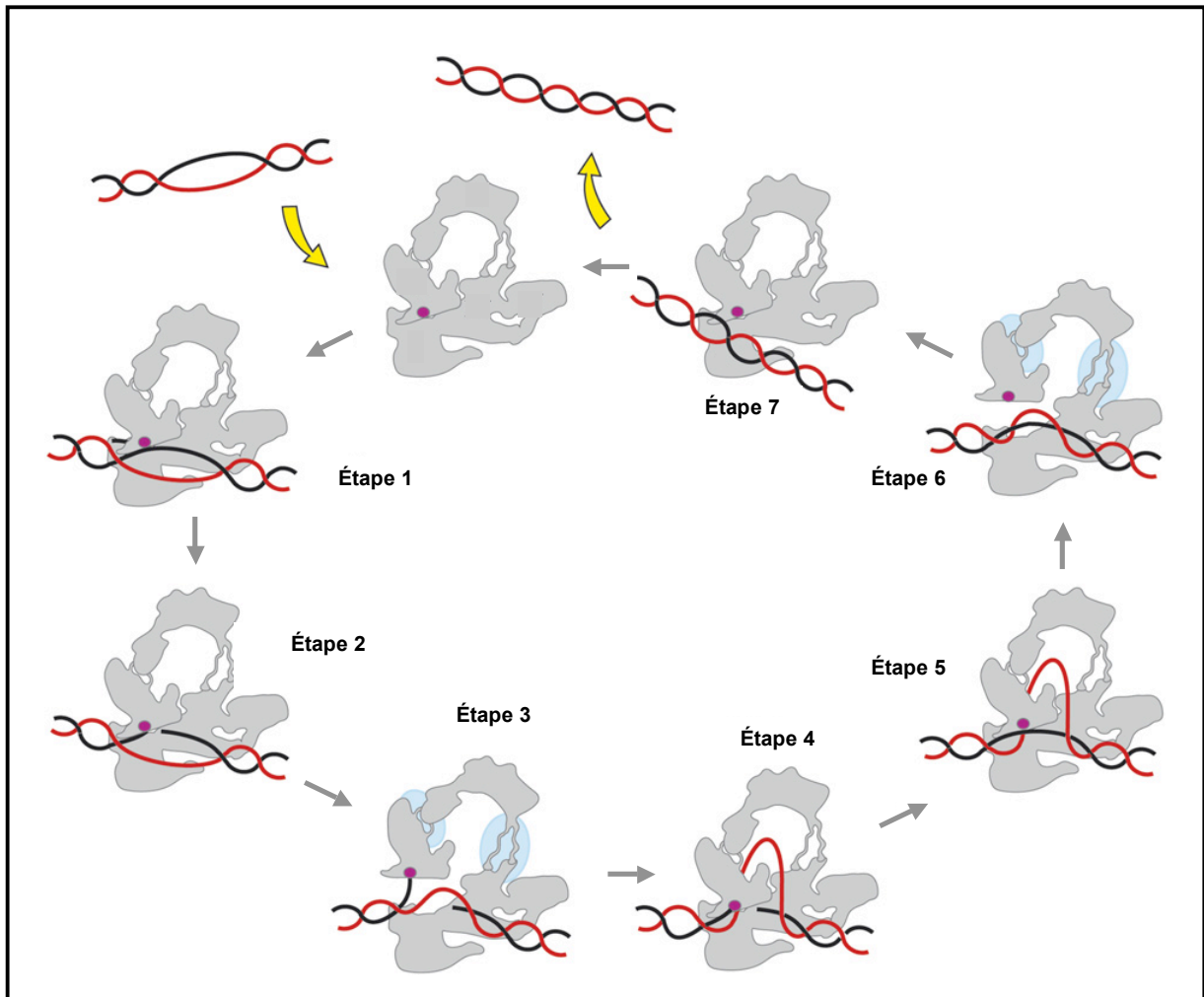


Figure 8 : Mécanisme d'action des topoisomérase de type IA

Les deux brins d'une molécule d'ADN sont représentés en rouge (segment T pour Transport) et noir (segment G pour Gate). L'enzyme est représentée en gris et contient un résidu tyrosine coloré en violet. L'enzyme oscillerait entre une position fermée (étapes 1, 2, 4, 5 et 7) et une position ouverte (étapes 3 et 6) permettant le passage du segment T dans sa cavité centrale. La position ouverte est rendue possible par le changement de conformation de certaines régions de l'enzyme (sur fond bleu) (Viard *et al.*, 2006).

Chez l'Homme, il existe une enzyme de type IA appelée Topo III, et de manière intéressante, tous les organismes étudiés possèdent au moins une topoisomérase de type IA suggérant le rôle fondamental de ce type de protéine. La Topo III se décline sous 2 isoformes : α et β . La Topo III α a comme particularité, contrairement aux autres topoisomérase, d'être très peu efficace

pour la relaxation des superenroulements d'ADNdb mais de présenter en revanche une forte affinité pour les substrats d'ADNsb conférant vraisemblablement à cette enzyme une « spécialisation » dans la résolution d'hémicaténanes (caténation d'ADNsb) (Yang, 2010). Ces substrats d'ADNsb étant générés entre autres par les hélicases de type RecQ, il n'est donc pas étonnant d'observer une interaction entre ces hélicases et la Topo III α . Ainsi, deux études menées indépendamment en 2000 ont montré l'interaction physique entre Topo III α et BLM aussi bien *in vivo* qu'*in vitro*, cette interaction étant particulièrement renforcée en présence d'ADN (Johnson *et al.*, 2000; Wu *et al.*, 2000). Cette interaction est très conservée au cours de l'évolution et a été montrée dans différents organismes (Gangloff *et al.*, 1999; Gangloff *et al.*, 1994; Laursen *et al.*, 2003). De façon remarquable, l'expression d'une protéine BLM ne pouvant pas interagir avec Topo III α mais présentant une activité hélicase supérieure à la protéine BLM sauvage ne suffit pas à corriger complètement l'augmentation du taux de SCEs (Hu *et al.*, 2001). Ces données indiquent que les deux protéines coopèrent pour limiter la formation de SCEs probablement en supprimant certains événements de RH. Depuis, cette hypothèse a été nettement confortée par des études *in vitro* démontrant que BLMr en association avec Topo III α est capable de dissoudre sans échange des régions flanquantes des structures mimant des double-jonctions de Holliday (dJHs), structures intermédiaires formées lors d'événements de RH (**Figure 9**) (Cf : BLM et le recombinaison homologue) (Wu et Hickson, 2003).

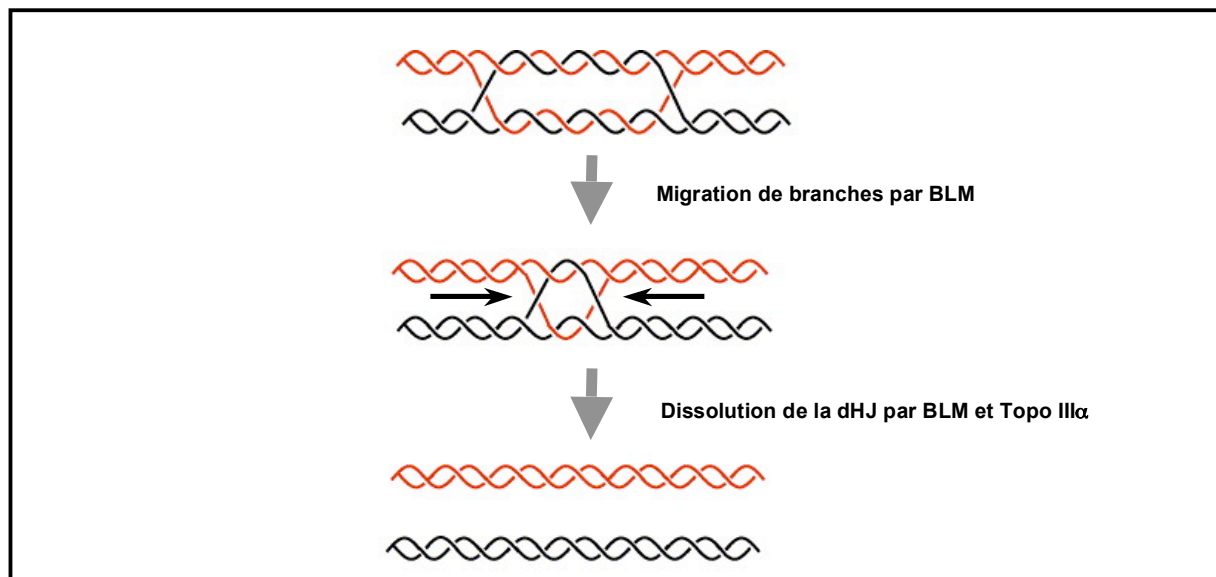


Figure 9 : Dissolution des doubles jonctions de Holliday par BLM et Topo III α

Le modèle proposé de dissolution des dJHs est composé de deux étapes. L'activité hélicase de BLM catalyserait la migration de branches de chacune des JHs simple l'une vers l'autre conduisant à leur rencontre et à la formation de deux duplexes d'ADN liés entre eux par une caténation d'ADNsb. Cette structure, qui est appelée hémicaténane, est ensuite décaténée par Topo III α terminant ainsi la dissolution de la dJHs.

D'autre part, il a été montré que la Topo III α est une protéine nucléaire localisée sous forme de foyers brillants et discrets dont la majorité co-localisent avec BLM au niveau des foyers PML (Hu *et al.*, 2001; Johnson *et al.*, 2000; Wu *et al.*, 2000). Cette localisation étant dépendante de la présence de BLM (Hu *et al.*, 2001), ces données confortent l'hypothèse d'une action commune entre BLM et Topo III α .

RMI1 et RMI2

Les protéines RMI1 et RMI2 (pour RecQ-mediated genome instability 1 ou 2), également appelées respectivement BLAP75 et BLAP18 (pour BLM-associated polypeptides) sont également des composants du « BLM core complex ». Ces protéines possèdent respectivement deux et un domaine oligonucleotide/oligosaccharide binding-fold (OB-fold) leur conférant une capacité de liaison à l'ADN bien qu'à ce jour aucune activité catalytique n'ait été démontrée pour ces protéines.

RMI1 a été identifié en 2005 comme étant un nouveau composant du « BLM core complex » interagissant physiquement et indirectement avec Topo III α et BLM. Cette protéine est capable de se lier à l'ADNsb, à l'ADNdb et à des structures d'ADN plus complexes comme des dJHs (Raynard *et al.*, 2008; Wu *et al.*, 2006). *In vivo*, cette protéine est essentielle à la stabilité du complexe BLM/Topo III α et, *in vitro*, elle stimule spécifiquement et très fortement son activité de dissolution des dJHs ainsi que le recrutement de Topo III α sur ces structures (Raynard *et al.*, 2008; Wu *et al.*, 2006; Yin *et al.*, 2005). Pour cette raison, le complexe BLM/Topo III α /BLAP75 (BTB) a alors été nommé « Double Holliday Junction dissolvosome » (Mankouri et Hickson, 2007; Raynard *et al.*, 2006; Wu *et al.*, 2006). Cette activité « dissolvosome » accrue en présence de RMI1 s'explique probablement par le fait que la formation du complexe BTB stimule fortement l'activité de migration de branche de BLM (Bussen *et al.*, 2007) et l'activité de décaténation d'ADNsb de Topo III α (Yang *et al.*, 2010). Des cellules déplétée en RMI1 par siRNA présentent une augmentation du taux de SCE (Yin *et al.*, 2005).

Par la suite, deux équipes indépendantes ont découvert RMI2. Cette protéine n'a pas été identifiée avant du fait de son poids moléculaire très proche de celui des chaînes légères des immunoglobulines utilisées pour immunoprécipiter BLM. RMI2 forme un complexe stable avec RMI1 *in vitro*, mais ne semble avoir qu'une faible incidence sur la stimulation de la dissolution des dJHs par BLM/Topo III α (Singh *et al.*, 2008; Xu *et al.*, 2008). En outre, cette faible stimulation

pourrait être dû à une meilleure stabilité du complexe BTB en présence de RMI2. En effet, *in vivo*, la déplétion par siRNA de Topo III α , RMI1 ou RMI2 affecte le niveau protéique des deux autres et par la même la stabilité du complexe BTB, bien que leur absence n'affecte pas BLM et l'absence de BLM n'affecte pas la stabilité du complexe (Singh *et al.*, 2008; Xu *et al.*, 2008).

L'inactivation du gène *RMI2* dans des cellules DT-40 conduit à une augmentation du taux de SCEs. En outre, l'inactivation conjuguée des gènes *RMI2* et *BLM* conduit à un taux de SCEs équivalent à celui de cellules uniquement invalidées pour le gène *BLM* : ceci indique une interaction épistatique entre ces 2 gènes (Singh *et al.*, 2008; Xu *et al.*, 2008).

La protéine RPA

La protéine RPA est impliquée dans les voies majeures du métabolisme et de la réparation de l'ADN (Richard *et al.*, 2009; Zou *et al.*, 2006). Elle possède 6 motifs OB-fold dont 2 principalement impliqués dans sa capacité de liaison à l'ADNsb. Elle est l'équivalent de la protéine SSB (Single Strand Binding protein) procaryote. Cependant, la protéine SSB est mono-peptidique alors que RPA est composée de trois sous-unités peptidiques de 70, 32 et 14 kDa. Des travaux effectués en 2000 ont montré que BLM et RPA ont une interaction physique via la sous-unité de 70 kDa de RPA (Brosh *et al.*, 2000). Contrairement à la Topo III α , il a été montré que RPA interagit avec plusieurs membres de la famille RecQ (Bachrati et Hickson, 2008). L'interaction de BLM avec RPA conduit, *in vitro*, à une forte stimulation de son activité de désappariement des duplexes d'ADN (Brosh *et al.*, 2000; Doherty *et al.*, 2005). Ceci peut s'expliquer, d'une part, par la capacité de RPA à stabiliser l'ADNsb suite au désappariement et, d'autre part, il a été montré que l'activité d'appariement de brin de BLM était inhibée par la présence de RPA favorisant ainsi l'activité hélicase de la protéine (Machwe *et al.*, 2006).

Autres partenaires de BLM

De nombreux autres partenaires de la protéine ont été identifiés et sont quasiment tous impliqués dans le métabolisme de l'ADN (Amor-Gueret, 2006). Parmi ces partenaires, certains ont une importance particulière dans le cadre de mon projet et sont présentés ci-après.

La protéine RAD51

Après les premières observations de la fréquence accrue de SCEs chez les patients BS (Chaganti *et al.*, 1974), il a été proposé que cette fréquence soit le reflet d'événements de RH anormalement élevés (Cleaver, 1981; Painter, 1980; Sonoda *et al.*, 1999). Les études se sont alors portées vers le lien potentiel entre BLM et les protéines impliquées dans la RH. Des études chez la levure ont identifié un groupe de gènes épistatiques, conservés des levures à l'Homme, appelé groupe de gènes Rad52 et qui sont les constituants majeurs de la voie de réparation des CDBs par RH (Symington, 2002). Parmi ces principaux constituants se trouve le gène *rad51* dont les mutations induisent une réduction des événements de recombinaison mitotique.

La protéine RAD51, l'homologue de la protéine *rad51* chez l'Homme, est une recombinase capable de s'assembler sur l'ADNsb ou ADNdb pour former un polymère appelé nucléofilament. RAD51 a un rôle central dans le processus de RH dans les cellules somatiques des eucaryotes supérieurs. En effet, la formation du nucléofilament RAD51 sur de l'ADNsb est essentielle dans le processus de recherche d'homologie, d'appariement homologue et d'échange de brin lors du processus de RH (Valerie et Povirk, 2003) (Cf : BLM et la recombinaison homologue).

En condition basale dans des cellules asynchrones, une co-localisation entre BLM et RAD51 existe mais de manière peu fréquente suggérant une interaction transitoire durant le cycle cellulaire. La synchronisation de cellules a permis de déterminer qu'une colocalisation partielle entre les deux protéines avec lieu en fin de phase S ainsi qu'en phase G2 et qu'une interaction physique *in vivo* et *in vitro* entre BLM et RAD51 a lieu durant ces mêmes phases (Bischof *et al.*, 2001; Wu *et al.*, 2001). De manière intéressante, la co-localisation entre BLM et RAD51 augmente après des dommages à l'ADN (Ouyang *et al.*, 2009; Wu *et al.*, 2001).

Enfin, une étude a été effectuée au laboratoire dans le but de caractériser l'interaction de BLM et RAD51 *in vivo* (Lahkim Bennani-Belhaj *et al.*, 2010a). Ce travail, auquel j'ai participé, a permis de montrer que la formation des SCEs dans les cellules BS est entièrement dépendante de la RH médiée par RAD51. Ces travaux ont également permis de proposer un modèle d'interaction fonctionnelle entre les deux protéines. Cet article est présenté en annexe 1.

La protéine RAD54

Parmi les principaux constituants du groupe de gènes épistatiques Rad52 se trouve également le gène *rad54* (Symington, 2002). La protéine RAD54, l'homologue de la protéine *rad54* chez l'Homme, est un membre de la famille des protéines SNF2 impliquées dans le remodelage de la chromatine. Elle présente une activité de translocation de l'ADNdb dépendante de l'ATP. La

grande majorité des données génétiques, cytologiques, biochimiques et structurales indique que RAD54 est une protéine majeure de la RH agissant au niveau de quasiment toutes les étapes de ce processus en coopération avec de nombreuses protéines dont principalement RAD51 (Cf : BLM et la recombinaison homologue).

De récents travaux ont montré et que BLM et RAD54 interagissent physiquement *in vivo* et *in vitro* (Srivastava *et al.*, 2009). Cette même étude indique également que la déplétion de RAD54 par siRNA dans des cellules humaines BS inhibe la formation des SCEs ce qui est en accord avec de précédents travaux montrant que dans des cellules DT40 l'augmentation du taux de SCEs observée dans des cellules BLM (-/-) est complètement abolie dans des cellules BLM (-/-) RAD54 (-/-) (Wang *et al.*, 2000). En outre, ces mêmes cellules BLM (-/-) RAD54 (-/-) présentent également une croissance ralentie ainsi qu'une augmentation de cassures et de « gap » chromosomiques. Il en a alors été conclu que la formation des SCEs pourrait être nécessaire pour ne pas aggraver l'instabilité génétique des cellules BS (Wang *et al.*, 2000).

La protéine 53BP1

La protéine 53BP1 a initialement été identifiée comme interagissant avec la protéine p53 (p53 Binding Protein-1) (Iwabuchi *et al.*, 1994). Il s'agit d'une protéine médiatrice/adaptatrice de la voie de réponse aux dommages que peut subir l'ADN. Une fois activée, cette voie initie des processus comme l'apoptose, l'arrêt du cycle cellulaire, la réparation mais aussi la transcription et la réplication de l'ADN dans l'objectif de protéger l'intégrité du génome (FitzGerald *et al.*, 2009). Aussi, en réponse à différents types de dommages à l'ADN, l'expression de 53BP1 est induite et la protéine est recrutée au niveau de foci nucléaires correspondant aux foyers de réparation (Schultz *et al.*, 2000), où cette protéine semble notamment avoir une fonction anti-recombinogène (Tripathi *et al.*, 2007).

La protéine BLM interagit avec 53BP1 *in vitro* mais également *in vivo* en réponse à un traitement provoquant un blocage de la fourche de réplication. La phosphorylation de 53BP1 dans son domaine KBD (Kinetochores Binding Domain) par Chk1 ainsi que celle de BLM sur la Thr99 par ATR sont nécessaires à leur interaction et leur co-localisation (Tripathi *et al.*, 2008).

Les protéines FANC

Les expériences d'immunoprécipitation de la protéine BLM ayant abouti à l'identification du « BLM core complex » ont également révélé l'existence du même complexe protéique associé à BLM mais incluant 5 protéines du groupe de complémentation de l'anémie de Fanconi (FA)

(FANCA, C, E, F et G). Ce complexe est appelé BRAFT (BLM, RPA, FA, Topo III α) (Meetei *et al.*, 2003). L'anémie de Fanconi est une maladie génétique autosomique récessive rare caractérisée par des anomalies congénitales, une insuffisance médullaire, une forte instabilité génétique et une prédisposition au développement de certains cancers (notamment des leucémies). Le nombre de gènes dont les mutations sont à l'origine de cette maladie est en constante augmentation. Actuellement, treize gènes ont été identifiés et codent pour les protéines suivantes : FANCA, B, C, D1, D2, E, F, G, I, J, L, M et N. En réponse à des dommages à l'ADN ou pendant la phase S, l'interaction de huit d'entre elles (FANCA, B, C, E, F, G, L et M) forme un complexe appelé « FA core complex » qui catalyse l'ubiquitination de FANCD2 et FANCI. Une fois ubiquitinées, ces protéines orchestrent la mise en place de structures impliquées dans la réparation de l'ADN (Moldovan et D'Andrea, 2009). À ce jour, la fonction de BLM au sein de ce complexe n'est pas définie.

Indépendamment du complexe BRAFT, des interactions ont été décrites entre BLM et d'autres protéines du groupe de complémentation de l'anémie de Fanconi et notamment FANCD2 et FANCC. Ainsi, BLM et FANCD2 mono-ubiquitinée co-localisent et co-immunoprécipitent en réponse à des agents alkylants, agents générant des liaisons covalentes particulièrement mutagènes entre les deux brins d'ADN, et à des drogues provoquant un blocage de la fourche de réplication (Pichiéri *et al.*, 2004). L'absence du gène *FANCC* provoque une augmentation d'un facteur deux du taux de SCEs (Hirano *et al.*, 2005). De manière intéressante, l'inactivation conjuguée des gènes *BLM* et *FANCC* ne provoque pas d'augmentation supplémentaire du taux de SCEs comparée à l'inactivation du gène *BLM* seul indiquant une épistasie entre ces deux protéines. L'ensemble de ces résultats indiquent un lien fonctionnel entre BLM/FANCD2 et BLM/FANCC.

D'autre part, la déplétion de BLM ou de Topo III α dans des fibroblastes normaux, suivie d'un traitement à la mitomycine C (MMC); provoquant des dommages à l'ADN, conduit à une augmentation de la formation de radicaux. Ces radicaux sont également observés dans des cellules FA (FANCC $^{-/-}$ ou FANCD2 $^{-/-}$) traitées. En revanche, la déplétion de BLM ou de Topo III α dans les cellules FA, ainsi que la déplétion de FANCA dans des cellules BS ne provoque pas d'augmentation supplémentaire du nombre de radicaux observés après traitement à la MMC. Ainsi, il existe une relation épistasique entre BLM, Topo III α et la voie Fanconi suggérant que les protéines agissent ensemble dans l'inhibition de la formation de radicaux MMC-dépendants (Hemphill *et al.*, 2009).

Durant l'anaphase, BLM et FANCD2 semblent également nécessaires pour la résolution de structures d'ADN appelées UltraFine anaphase Bridges comme nous le verrons dans la suite de ce manuscrit.

La protéine topoisomérase II

La topoisomérase II (Topo II) est une topoisomérase de type II (Cf: La décaténation des centromères). En 1995, il a été montré que Sgs1, l'homologue de BLM chez la levure, interagit physiquement avec Top2, l'homologue de Topo II chez la levure (Watt *et al.*, 1995). Depuis, il a été montré qu'une interaction physique directe ainsi qu'une colocalisation entre les protéines BLM et Topo II existent dans différentes lignées humaines et cela principalement durant les phases G2 et M (Bhattacharyya *et al.*, 2009; Russell *et al.*, 2011). De manière intéressante, l'interaction de ces deux protéines est nécessaire pour empêcher la formation de cassures chromosomiques fréquemment observées dans les cellules BS ou dans des cellules déficientes en Topo II (Russell *et al.*, 2011). D'autre part, l'inhibition de la Topo II dans une cellule conduit à une augmentation des SCEs mais de manière beaucoup plus importante que dans les cellules BS (Dillehay *et al.*, 1989; Ishii and Bender, 1980; Pommier *et al.*, 1985). Cette augmentation pourrait être dû au fait que, *in vitro*, la Topo II augmente l'activité de désappariement de duplexe d'ADN de BLM sur des substrats représentant des intermédiaires précoces de RH (Cf: BLM et la recombinaison homologue) (Russell *et al.*, 2011). En revanche, *in vitro*, BLM ne semble pas influencer l'activité de décaténation de la Topo II sur des caténanes d'ADN de séquences non spécifiques (Russell *et al.*, 2011).

Durant l'anaphase, ces deux protéines sont également nécessaires pour la résolution de certains UltraFine anaphase Bridges comme nous le verrons dans la suite de ce manuscrit.

Fonctions potentielles de la protéine BLM en phase S

L'étude des caractéristiques des cellules BS ainsi que les différents travaux menés *in vitro* et *in vivo* dans l'objectif de trouver des substrats et des partenaires pour la protéine BLM, ont progressivement permis de proposer des fonctions potentielles pour cette protéine à l'interface entre la réplication et la réparation de l'ADN.

BLM ET LA REPLICATION

Dès 1975, des défauts de réplication de l'ADN dans les cellules BS ont été identifiés. Ainsi, il a été montré que les cellules BS se caractérisent par un ralentissement de la progression des fourches de réplication comparées aux cellules normales (Hand et German, 1975; Lonon *et al.*, 1990; Rao *et al.*, 2007). Ce ralentissement est associé à une augmentation du nombre d'origines de réplication activées qui pourrait permettre de compenser en partie le ralentissement de la progression des fourches (Rao *et al.*, 2007). Les cellules BS sont également caractérisées par une fréquence plus élevée de bulles de réplication asymétriques qui sont le reflet d'un blocage anormal de fourches de réplication (Rao *et al.*, 2007). Par ailleurs, dans des cellules normales, les foci nucléaires correspondant à de l'ADNsb, visualisés par marquage de la protéine RPA, disparaissent en fin de phase S alors que dans les cellules BS ces foci, plus nombreux, persistent jusqu'en phase G2 (Rassool *et al.*, 2003). Des analyses par dénaturation alcaline partielle ont confirmé l'existence de l'accumulation anormale d'intermédiaires de réplication tardifs dans les cellules BS contrairement aux cellules contrôles (Lonon *et al.*, 1990). Ces intermédiaires pourraient être dus au blocage et/ou au ralentissement des fourches de réplication observés dans les cellules BS. Enfin, il a récemment été montré au laboratoire que l'absence de BLM est associée à une diminution drastique de l'expression d'une protéine-clé de la synthèse des nucléotides : la cytidine déaminase (CDA). Cette diminution engendre un déséquilibre du pool de nucléotides dans les cellules BS. Ce déséquilibre est à l'origine du ralentissement de la progression des fourches de réplication, d'une partie de l'augmentation des SCEs, mais n'est pas en lien avec la fréquence élevée de fourches de réplication asymétriques observées dans les cellules BS, suggérant une activité directe de BLM au niveau des fourches de réplication bloquées pour assurer leur redémarrage (Chabosseau *et al.*, 2011). L'ensemble de ces données indique que l'activité de la protéine BLM est nécessaire à la progression des fourches de réplication à une vitesse normale.

BLM est mobilisée en réponse à un stress de réplication

La réplication complète et correcte des chromosomes est essentielle pour la cellule. Or il est fréquent que celle-ci soit perturbée, la cellule subit alors un stress de réplication et va réagir en activant un point de contrôle de réplication (Branzei et Foiani, 2009). Ce stress va provoquer le ralentissement des fourches de réplication pouvant d'aboutir au blocage de cette fourche et même à son effondrement à défaut de sa stabilisation. Une fourche de réplication bloquée et stabilisée est capable de redémarrer la réplication une fois la source de l'inhibition levée, alors que la fourche de réplication effondrée est inactivée par dissociation de la machinerie de réplication et aboutit souvent à la génération de CDBs (Petermann et Helleday, 2010).

De manière intéressante, le traitement de cellules avec des inhibiteurs de la réplication de l'ADN comme l'hydroxyurée (HU), inhibiteur de la ribonucléotide réductase, et l'aphidicoline (APH), mycotoxine inhibant l'ADN polymérase α , permet de créer un stress de réplication. Le retrait de ces inhibiteurs induit la reprise de la réplication, il est donc possible d'utiliser avantageusement ces drogues pour étudier les mécanismes, encore mal compris, mis en jeu dans le ralentissement, le blocage et l'effondrement ainsi que dans le redémarrage et la restauration des fourches de réplication.

Le traitement des cellules à l'HU provoque un ralentissement sévère de la fourche de réplication aboutissant à son blocage voir même à des CDBs en cas de traitement de longue durée (Saintigny *et al.*, 2001). Il s'avère être un traitement de choix pour l'étude du comportement de la protéine BLM en présence d'un stress de réplication. En réponse à un traitement à l'HU, la protéine BLM s'accumule (Ababou *et al.*, 2002a) et est phosphorylée au niveau des thréonines 99 et 122 par la kinase ATR, kinase activée en réponse à des dommages à l'ADN et des stress de réplication et activatrice d'un grand nombre de substrats impliqués dans la réparation de l'ADN (Cimprich et Cortez, 2008). Cette phosphorylation est essentielle à la reprise du cycle cellulaire des cellules post-traitement et est nécessaire pour la relocalisation de BLM des foyers PML vers des foyers nucléaires beaucoup plus nombreux localisés au niveau des fourches de réplication endommagées (Davalos *et al.*, 2004; Davies *et al.*, 2004). Ces foyers contiennent également de nombreuses protéines impliquées dans la réparation de l'ADN et notamment les protéines RAD51, p53 ainsi que 53BP1, elles-même nécessaires au recrutement de BLM au niveau de ces foyers (Sengupta *et al.*, 2004). Le recrutement de BLM est ensuite essentiel pour la coopération entre ces trois protéines. BLM permet notamment le recrutement de p53 et 53BP1 et renforce l'interaction de 53BP1 avec p53 et RAD51 (Bischof *et al.*, 2001; Ouyang *et al.*, 2009; Sengupta *et al.*, 2003; Sengupta *et al.*, 2004; Tripathi *et al.*, 2008; Wu *et al.*, 2001). BLM est également nécessaire pour le recrutement à certains de ces foyers du complexe MNR (MRE11/NBS1/RAD50), élément clé de

la réponse à des CDBs agissant comme senseur dans les phases précoces de la réparation de l'ADN (Franchitto et Pichierri, 2002; Lamarche *et al.*; Lee et Paull, 2007). De manière intéressante, la proportion de fourches de réplication bloquées ne redémarrant pas à la suite d'un traitement à l'HU est plus importante dans des cellules BS que dans des cellules exprimant BLM. Ces anomalies de redémarrage peuvent également être observées en réponse à un traitement à l'APH (Davies *et al.*, 2007).

Ces données confirment l'implication de BLM dans le processus de réplication. Plus précisément le recrutement de BLM au niveau des fourches de réplication bloquées semble essentiel pour assurer une réponse effective de la part de la cellule et assurer le redémarrage des fourches de réplication une fois la source d'inhibition levée.

BLM serait nécessaire à la progression et au redémarrage de fourches de réplication

Les organismes cellulaires subissent quotidiennement des stress de réplication. Il a ainsi été estimé qu'environ 15 à 20% des fourches de réplication se bloquent ou s'effondrent durant une division cellulaire chez *E. coli* (Cox *et al.*, 2000). Ceci peut notamment être dû à la présence de structures secondaires de l'ADN comme des G-quadruplexes ou des épingles à cheveux sur la matrice d'ADN. Ces structures empêchent la progression de la fourche de réplication car, outre les ADN polymérases translésionnelles présentant un fort risque mutateur (Friedberg, 2005), la majorité des ADN polymérases sont incapables de répliquer l'ADN à partir d'une matrice ADN inhabituelles provoquant ainsi un blocage de la fourche de réplication. Or ces structures secondaires sont des substrats que BLM peut résoudre (Mohaghegh *et al.*, 2001; Sun *et al.*, 1998). Sur la base de l'ensemble des observations précédemment citées, il a été proposé que BLM facilite la progression de la fourche de réplication en résolvant les structures secondaires avant son passage (Hickson, 2003) (**Figure 10**).

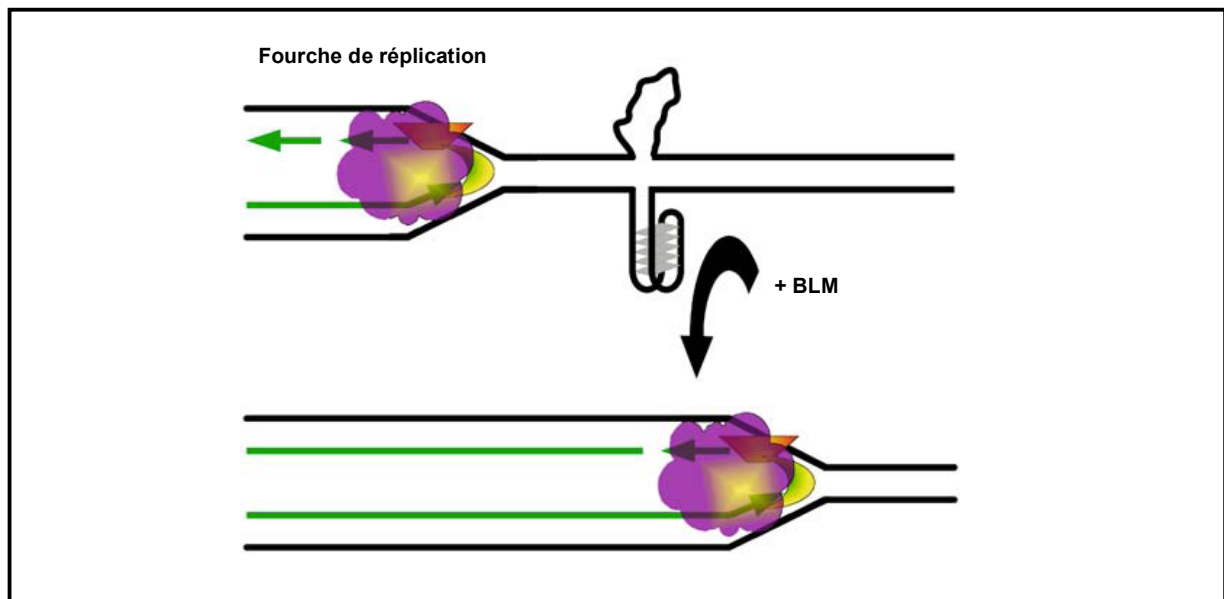


Figure 10 : La résolution de structures secondaires de l'ADN par BLM faciliterait la progression des fourches de réplication

La progression des fourches de réplication pourrait être inhibée par des structures d'ADN secondaires. BLM serait alors recrutée pour résoudre ces structures permettant ainsi le passage de la fourche (d'après Bachtrati *et al.*, 2008).

En dehors des structures secondaires de l'ADN, certains obstacles normalement enlevés avant le passage de la fourche de réplication peuvent échapper aux mécanismes de surveillance de la cellule et interférer avec le processus de réplication (Kostriken *et al.*, 1983). Ces obstacles, qui peuvent être des dommages de l'ADN non réparés ou des protéines liées anormalement à l'ADN, conduisent au blocage de la fourche s'ils se situent sur la matrice du brin avancé (les obstacles se situant sur la matrice du brin retardé ne conduisent pas nécessairement au blocage de la fourche du fait de la synthèse discontinue de ce brin qui peut potentiellement permettre l'outrepassement de l'obstacle et conduire ainsi à sa réparation post-réplivative par différentes voies de réparation). Afin d'éviter l'effondrement de cette fourche qui pourrait provoquer alors la génération de CDBs dangereuses et parfois létales pour la cellule, celle-ci doit être stabilisée. Dans le but de répondre à cette contrainte, il a été proposé que BLM puisse catalyser la formation d'une structure « chicken foot » au moyen de ses activités observées *in vitro* de régression de fourche de réplication synthétique (Machwe *et al.*, 2006) et de migration inverse de branche (Karow *et al.*, 2000). Cette structure « chicken foot » permettrait de stabiliser la fourche assez longtemps pour réparer la lésion. Dans le cas où cette réparation ne pourrait avoir lieu, la synthèse du brin d'ADN avancé continuerait en se servant du brin retardé comme matrice permettant ainsi d'outrepasser la lésion (**Figure 11**) (Amor-Guéret, 2006; Bugreev *et al.*, 2007; Hickson, 2003). Cette voie de redémarrage

de fourche permet ainsi d'éviter la voie de la RH potentiellement dangereuse pour la cellule (Cf : BLM et la recombinaison homologe). Cependant, la principale faiblesse de ce modèle réside dans le fait que la machinerie de réplication a besoin de se dissocier de la fourche pour permettre sa régression et actuellement sa « re-mise » en place n'est pas très claire (Bugreev *et al.*, 2011; Petermann et Helleday, 2010).

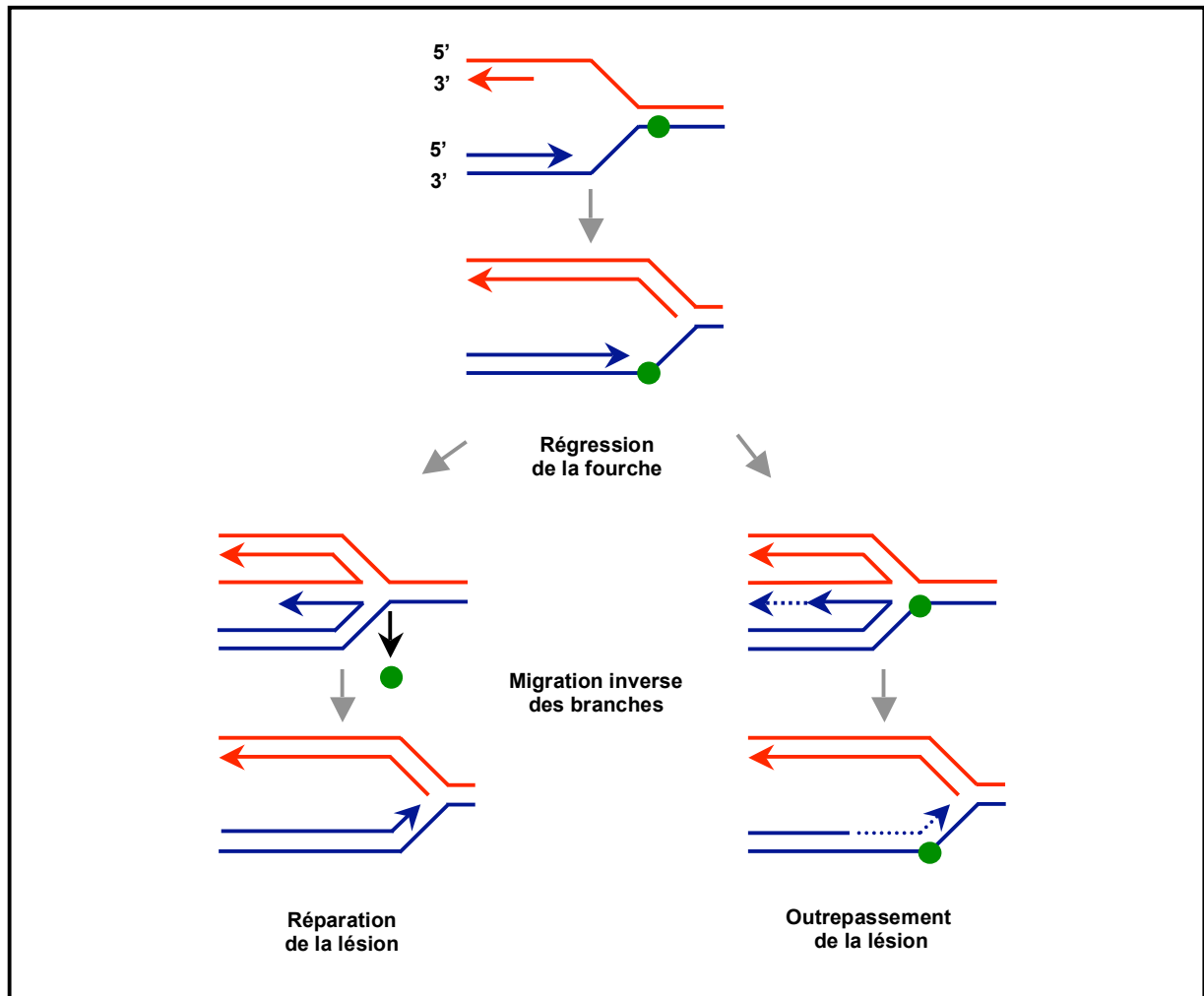


Figure 11 : Modèle de redémarrage par BLM d'une fourche de réplication bloquée

La régression de la fourche de réplication permet de stabiliser la fourche et donner ainsi un délai suffisant à la cellule pour soit réparer la lésion (voie de gauche) soit l'outrepasser après avoir continué la synthèse du brin avancé en se servant du brin retardé comme matrice (voie de droite).

BLM ET LA RECOMBINAISON HOMOLOGUE

Les cellules BS présentent un phénotype hyper-recombinogène se manifestant par la présence de figures quadriradiales, d'une augmentation d'un facteur 5 du taux de réparation de l'ADN médiée par la RH (Onclercq-Delic *et al.*, 2003) ainsi que d'une fréquence élevée de SCEs (10 fois supérieure à la normale) (Chaganti *et al.*, 1974; German, 1964) et d'un nombre plus élevé d'événements de recombinaison somatique (Ben-Sasson *et al.*, 1985; Kusunoki *et al.*, 1994). L'ensemble de ces observations est clairement en faveur d'un rôle essentiel de la protéine BLM dans la régulation de la RH.

La recombinaison homologue

Une cellule diploïde humaine typique a besoin de maintenir 6×10^9 paires de bases dans un ordre précis tout en respectant une organisation chromosomique et ce malgré de nombreuses menaces pour l'intégrité du génome. Cela se révèle être une incroyable tâche qui est normalement parfaitement réalisée d'une génération de cellules somatiques à une autre (Drake *et al.*, 1998). Pour y parvenir, la RH est un processus essentiel participant au maintien de l'intégrité génomique entre les différentes générations ainsi que pendant le développement d'un organisme. Ce processus est nécessaire pour le redémarrage ou la restauration de fourches de réplication et la réparation des CDBs de l'ADN (Li et Heyer, 2008). Cependant la RH est également un processus potentiellement dangereux pour la cellule notamment du fait de la présence de nombreuses séquences répétées dans les cellules humaines. La RH peut ainsi conduire à des crossing-overs induisant des réarrangements chromosomiques dont des délétions, des inversions et des translocations ainsi qu'à des intermédiaires de recombinaisons létaux (Kolodner *et al.*, 2002; Weinstock *et al.*, 2006). De plus, la surexpression de RAD51 a été démontrée dans de nombreuses cellules dérivant de tumeurs et mise en corrélation avec un taux élevé d'événements de RH (Vispe *et al.*, 1998). Il est donc vital pour la cellule de pouvoir contrôler finement ce processus.

Schématiquement sur le plan moléculaire, le RH débute par la dégradation nucléotidique de l'extrémité 5' vers l'extrémité 3' au niveau de la CDB créant ainsi une extrémité 3' débordante simple-brin. La protéine RAD51 se lie à cette extrémité 3' et initie alors l'appariement et l'invasion de cette extrémité au niveau d'un duplexe d'ADN contenant une région homologue pouvant être le chromosome homologue ou préférentiellement la chromatide sœur certainement du fait de leur proximité (Kadyk et Hartwell, 1992; Nasmyth et Haering, 2009). Cette invasion va

provoquer le déplacement du brin complémentaire au brin envahit, formant une structure D-Loop (**Figure 12**). L'extrémité 3' va alors servir d'amorce pour la synthèse d'ADN en se servant du brin envahit comme matrice ce qui va permettre la migration du brin déplacé. Cette migration s'achève lorsque le brin déplacé s'apparie à l'autre extrémité 3' simple-brin générée par résection. Le processus de RH se termine alors avec la formation d'une dJH qui sera soit dissolue par BLM et Topo III α (**Figure 8**) soit résolue par conversion génique au moyen de l'activité de résolvas, présentant le risque élevé d'introduire des crossing overs et donc des SCEs (Cf : Partie suivante). Dans ce mécanisme d'action, RAD54 joue un rôle majeur en permettant le remodelage de la chromatine favorisant ainsi la formation du nucléofilament RAD51 sur de l'ADNsb, la recherche de séquence homologue par le nucléofilament RAD51, et la formation de la boucle D, essentielle à l'initiation de la RH (Bugreev *et al.*, 2006; Heyer *et al.*, 2006; Mazin *et al.*; Tan *et al.*, 2003).

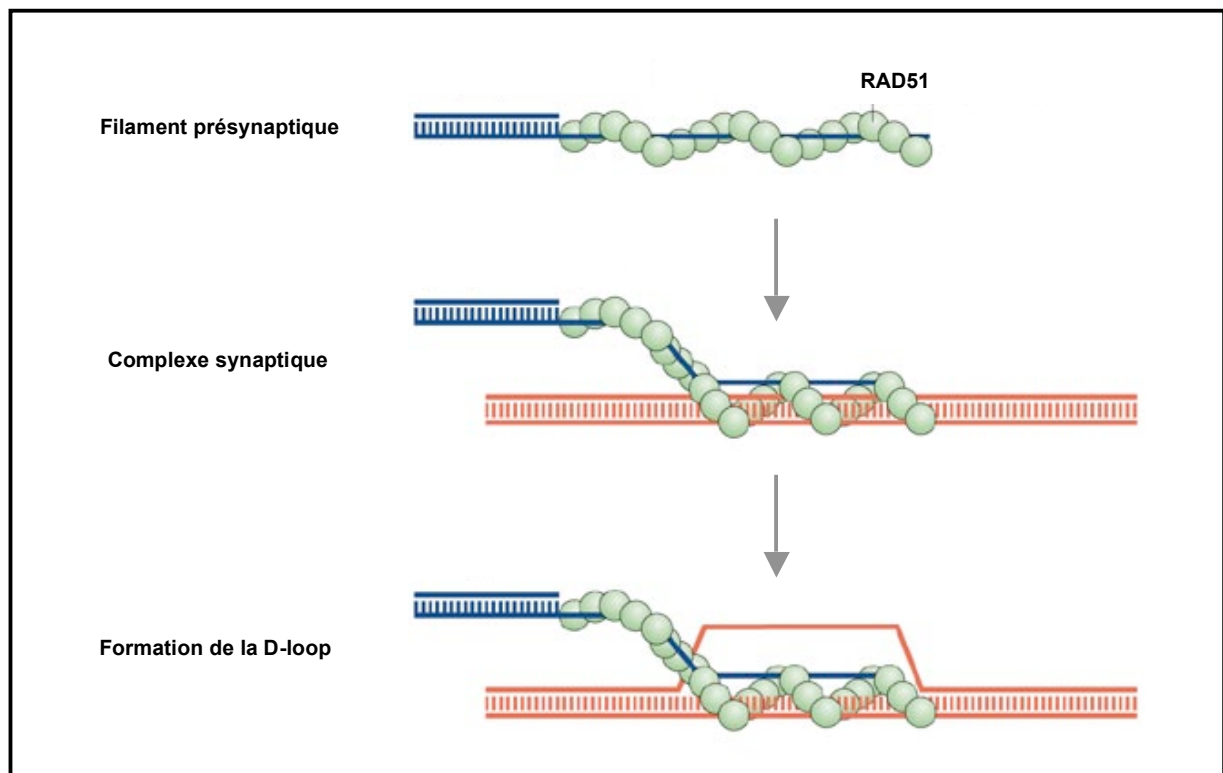


Figure 12 : Mécanisme d'envahissement de brin par RAD51

La protéine RAD51 s'assemble sur l'extrémité simple-brin débordante issue de la nucléolyse d'un bout franc provenant d'une CDB. La protéine forme un filament appelé filament présynaptique. Celui-ci se lie à un duplexe d'ADN et forme un complexe synaptique permettant de chercher une région d'homologie dans ce duplexe. Le cas échéant, l'ADNsb envahit cette région homologue, se lie au brin complémentaire et forme ainsi une structure ADN appelée D-loop.

Le redémarrage de fourches de réplication bloquées ou effondrées dépendant de RAD51

Le traitement de cellules avec des inhibiteurs de la réplication active la RH (Lundin *et al.*, 2002; Saintigny *et al.*, 2001). En effet, RAD51 est nécessaire aussi bien au redémarrage de certaines fourches de réplication bloquées qu'à la restauration de fourches effondrées ayant abouti à la formation d'une CDB (Hanada *et al.*, 2007; Petermann *et al.*, 2010).

Il a ainsi été proposé que RAD51 favorise le redémarrage d'une fourche bloquée, sans présence de CDB, à partir d'une structure « chicken foot » lorsque la migration inverse de branches ne peut se faire ou lorsque la « re-mise » en place de la machinerie de réplication est compromise. En effet, la formation d'une D-loop chez *E. Coli* permet de remettre en place cette machinerie (Liu et Marians, 1999). Dans ce modèle, RAD51 agirait au niveau de l'extrémité double-brins libre de la structure « chicken foot ». Son activité aboutirait alors à la formation d'une D-loop puis à une dJH et enfin à la reprise de la réplication. La dJH serait alors soit dissolue en présence de BLM, soit résolue par des résolvases pouvant introduire un crossing over conduisant ainsi à l'apparition d'une SCE (**Figure 13**) (Wu, 2007) (Petermann et Helleday, 2010). Cependant, le redémarrage de fourches bloquées par RAD51 ne semble pas recombino-gène (Petermann *et al.*, 2010), ceci suggère que, dans ce cas de figure la dHJ est toujours dissolue ou que le mécanisme de recombinaison est différent de celui habituellement mis en place en réponse aux CDBs.

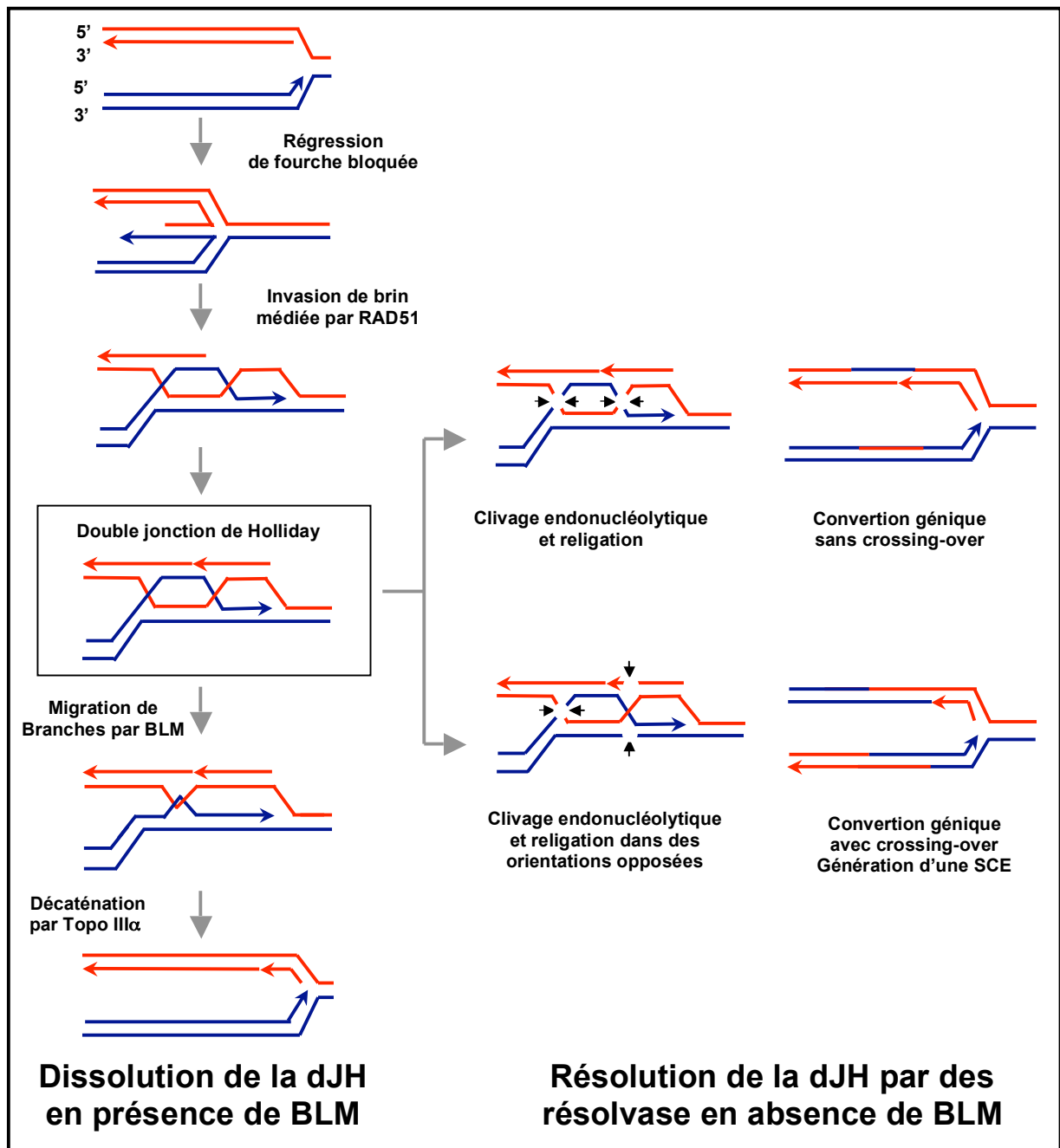


Figure 13 : Modèle de redémarrage par la recombinaison homologue d'une fourche de réplication bloquée

Dans certains cas, le redémarrage de fourches de réplication ayant regressées peut être difficile du fait du démantèlement de la machinerie de réplication. Dans ce cas, l'extrémité libre double-brins de la structure « chicken foot » pourrait envahir l'ADN parental intact via l'activité de RAD51, formant ainsi une D-loop. La formation de D-loop permet chez *E. Coli* de remettre en place la machinerie de réplication (Liu *et al.*, 1999). Ce mécanisme pourrait également avoir lieu chez les eucaryotes supérieures. La dJH serait alors soit dissoute en présence de BLM et Topo III α , évitant ainsi l'apparition d'une SCE, soit résolue en leur absence par clivage endonucléolytique pouvant introduire un crossing-over conduisant alors à l'apparition d'une SCE, principale caractéristique des cellules BS.

Une fourche bloquée non-stabilisée ou bloquée pendant une longue durée peut aboutir à son effondrement et à la génération d'une CDB via l'activité endonucléase de Mus81 ou Gen1 (Hanada *et al.*, 2007; Saintigny *et al.*, 2001; Wechsler *et al.*, 2011). Il est possible que ces CDBs ainsi

généérées fassent partie intégrante du mécanisme de restauration de la fourche de réplication (Hanada *et al.*, 2007; Osman et Whitby, 2007; Shimura *et al.*, 2008). La génération d'une CDB au niveau d'une fourche de réplication peut également avoir lieu quand la fourche rencontre une cassure simple-brin au moment de son passage. La progression de la fourche conduit alors inéluctablement à son effondrement et à la formation d'une CDB sur une seule des chromatides sœurs. Dans ce cas, la réparation de cette CDB s'effectue principalement, voir uniquement, par la voie de la RH (Rothstein *et al.*, 2000). Plus précisément, cette réparation s'effectue par la voie de réplication induite par les cassures (BIR pour Break Induced Replication), un des trois mécanismes mis en place dans le processus de RH (**Figure 14**).

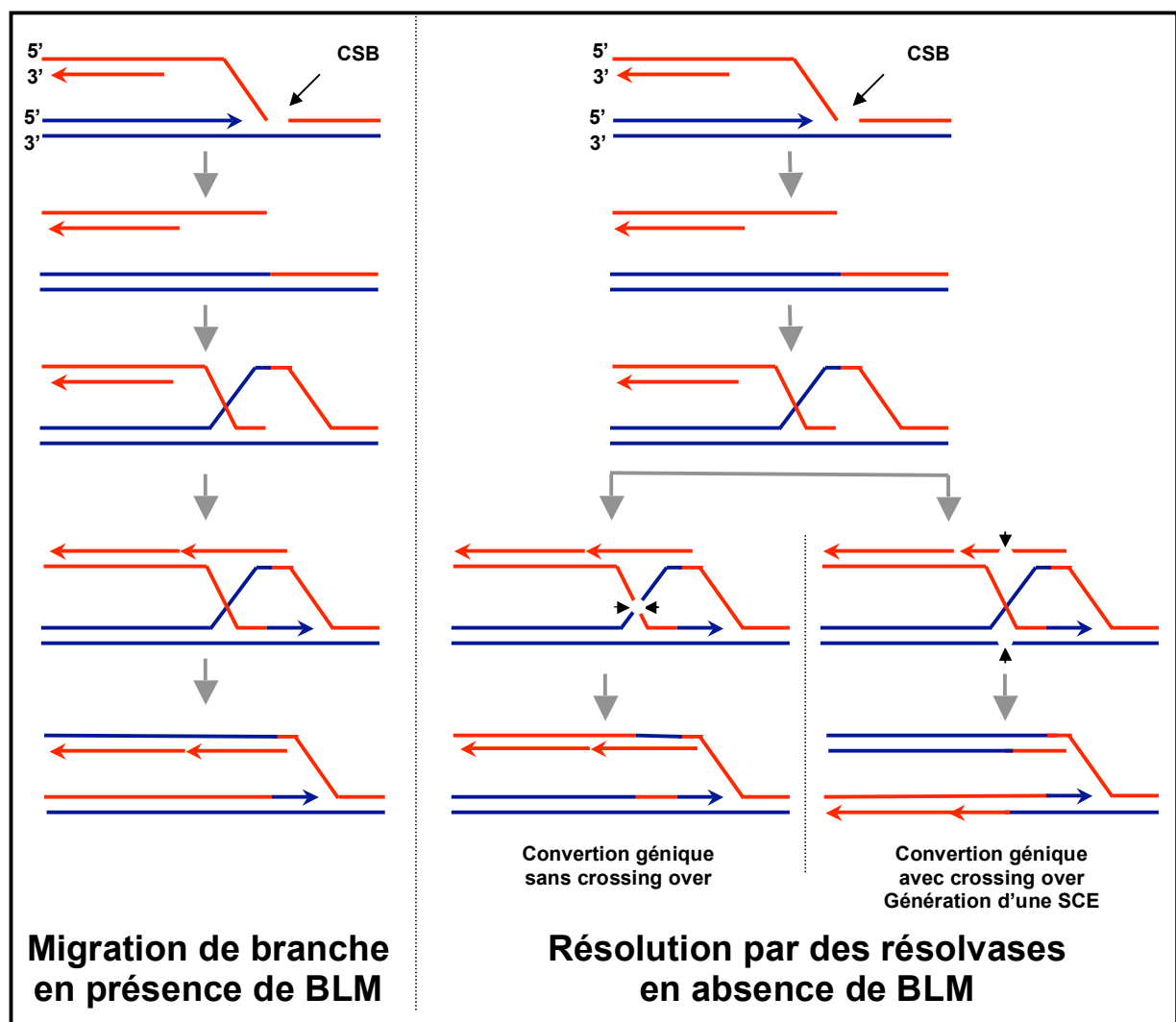


Figure 14 : Restauration d'une fourche de réplication après cassure double-brins par la voie de réparation BIR

La restauration de la fourche se fait par la voie de réplication induite par les cassures ou BIR (Break Induced Replication). L'extrémité double-brin envahit la chromatide soeur intacte et forme une JH. L'activité de migration de branche de BLM restaurerait la fourche de réplication sans générer de SCE. En absence de BLM, la JH sera résolue par des résolvases pouvant introduire des SCEs. Ceci expliquerait la formation des SCEs, principale caractéristique des cellules BS.

Le BIR forme alors une structure comportant une JH permettant de restaurer la fourche de réplication. Cette JH générée serait alors soit résolue par BLM via son activité de migration de branche (Amor-Guéret, 2006; Karow *et al.*, 2000), soit par clivage endonucléolytique pouvant introduire, comme dans le cas des dJHs, des crossing over et conduire ainsi à la formation d'une SCE.

BLM : fonctions anti- mais aussi pro-recombinogènes

Comme nous venons de la voir, BLM pourrait donc jouer un rôle anti-recombinogène dans le processus de réparation des CDBs dues à l'effondrement d'une fourche de réplication. Cependant, ces CDBs présentent la particularité de n'être composée que d'une extrémité libre. Or les CDBs peuvent également aboutir à l'apparition de deux extrémités libres comme cela est le cas en réponse à des agents exogènes comme les radiations ionisantes (RIs). Après traitement de cellules aux RIs, BLM s'accumule et est recrutée au niveau de potentiels foyers de réparation (Bischof *et al.*, 2001; Wu *et al.*, 2001). D'autre part, les cellules BS sont particulièrement sensibles aux RIs. Après irradiation, les cellules présentent notamment une augmentation significative de cassures chromosomiques, ainsi qu'une augmentation du nombre de SCEs et de translocations chromosomiques. Les cellules BS présentent également 2 à 2,5 fois plus de foyers RAD51 que les cellules contrôles après irradiations (Aurias *et al.*, 1985; Bischof *et al.*, 2001; Kuhn, 1980). Il est donc probable que la protéine BLM est un rôle anti-recombinogène dans le processus de réparation de tous types de CDBs.

De nombreuses études basées sur des approches biochimiques confortent le rôle anti-recombinogène de BLM. Ainsi BLM catalyse *in vitro* la régression d'une fourche de réplication ainsi que la migration de branche d'une JH (Karow *et al.*, 2000; Machwe *et al.*, 2006), facilitant probablement le redémarrage de fourches bloquées indépendamment de la RH (Cf: Partie précédente). BLM résout *in vitro*, sans crossing-over, les dJHs (Wu et Hickson, 2003). BLM dissocie également des D-loops ainsi que le nucléofilament de RAD51 considéré comme le point de contrôle majeur de la RH (Bugreev *et al.*, 2007; van Brabant *et al.*, 2000a; Wu et Hickson, 2003). BLM serait donc capable d'agir en inhibant la formation de tous les types d'intermédiaires médiés par la RH et de favoriser des voies de réparation alternatives comme la réparation des CDBs par ligature d'extrémités non homologues de l'ADN (Non-Homologous End-Joining ou NHEJ).

Cependant, des études génétiques indiquent que BLM pourrait également promouvoir la RH (Adams *et al.*, 2003; McVey *et al.*, 2004). Ainsi, *in vitro*, BLM participe à la dégradation

nucléolytique de l'extrémité 5' d'une CDB, générant des extrémités 3' débordante constituant un substrat pour la fixation de RAD51 (Nimonkar *et al.*, 2008). BLM favorise également l'activité d'échange de brins du nucléofilament de RAD51 lorsque celui-ci est sous forme active lié à l'ATP ainsi que la dissociation de la D-loop une fois la synthèse de l'ADN sur le brin homologue terminée (Bugreev *et al.*, 2009). D'autre part, BLM stimule l'activité ATPase de RAD54 ainsi que son activité de remodelage de la chromatine pouvant ainsi favoriser le processus de RH (Srivastava *et al.*, 2009).

La RH étant vitale pour la cellule, BLM présenterait donc une activité régulatrice à la fois anti-mais aussi pro-recombinogène. Cette activité serait probablement modulée par l'état conformationnel de la protéine RAD51 (active lié à l'ATP ou inactive lié à l'ADP) et la présence ou non de facteurs de stimulation de la RH (Bugreev *et al.*, 2009). La sumoylation de BLM semble également impliquée dans cette modulation d'activité car RAD51 interagit, *in vitro*, avec BLMr sumoylée de façon plus affine qu'avec sa forme non sumoylée (Ouyang *et al.*, 2009).

Quelle que soit la nature de l'équilibre existant entre les potentielles fonctions anti- ou pro-recombinogènes de BLM, il semblerait que cette protéine favorise majoritairement des voies ne menant pas à des crossing-overs et à la formation de SCEs ce qui expliquerait, au moins en partie, le phénotype hyperrecombinogène des cellules BS (**Figure 15**).

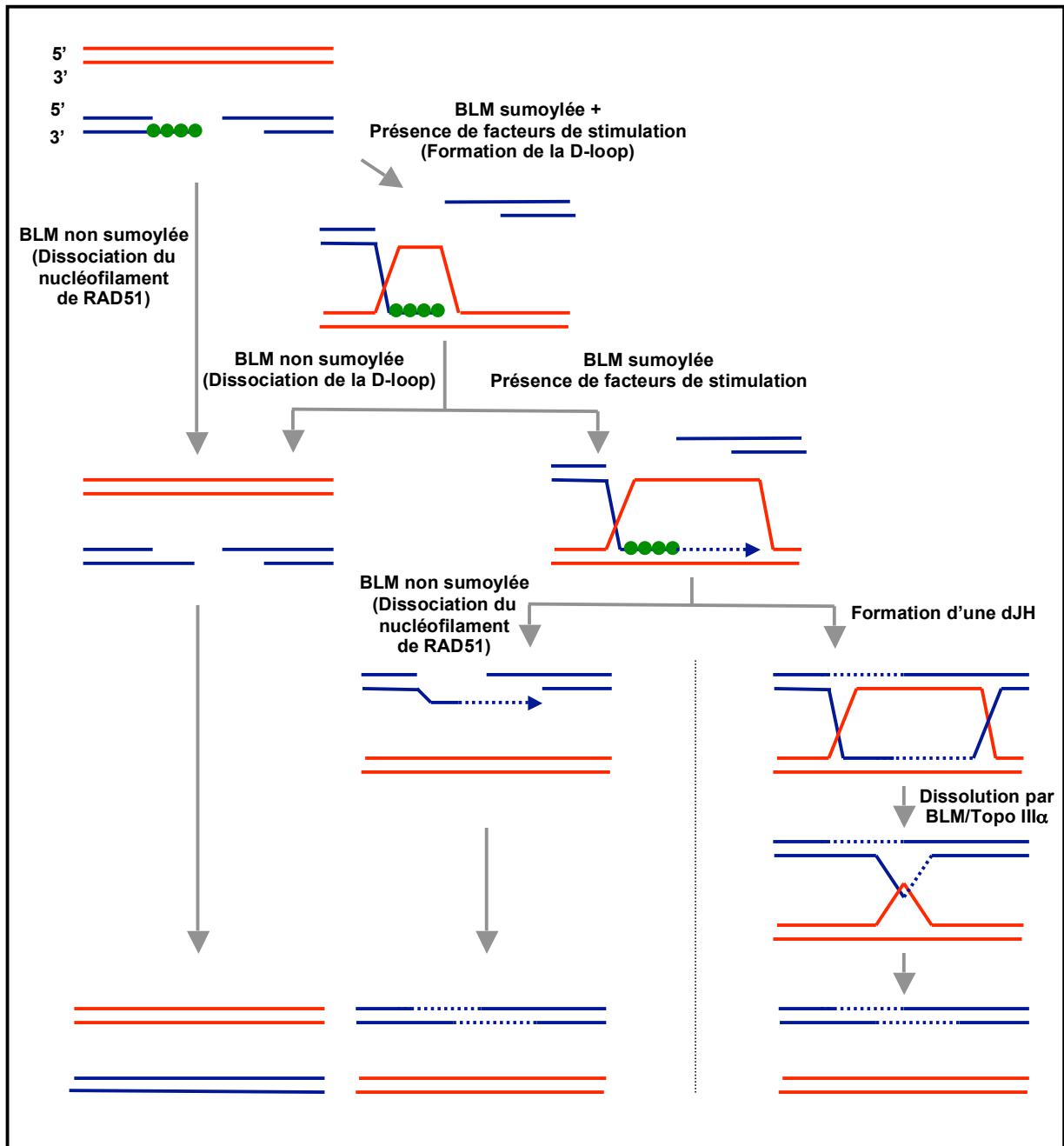


Figure 15 : Rôle de BLM dans la recombinaison homologue

Ce modèle reprend les fonctions pro- et anti-recombinogènes connues de BLM. L'équilibre entre ces deux fonctions pourrait être modulé au moyen de la sumoylation de BLM ou de la présence de facteurs de stimulation de la RH. Ce modèle montre également comment BLM pourrait favoriser les voies ne menant pas à des crossing-overs évitant ainsi la formation de SCEs.

NB: En absence de BLM, la DJH ne peut être dissolue : sa résolution nécessiterait l'action de résolvases, pouvant générer des SCEs (voir Figure 12).

CHAPITRE II : LE CENTROMERE

Le centromère est un locus chromosomique bien particulier qui joue un rôle essentiel pendant la mitose. Ce second chapitre est consacré à sa présentation. La structure et la composition du centromère seront abordées afin de mieux comprendre ses fonctions. Le métabolisme particulier associé à l'ADN du centromère fera l'objet de la fin de chapitre.

Le but de ce second chapitre est de montrer l'importance du centromère au cours de la division cellulaire et la nécessité du maintien de son intégrité pour la cellule.

La structure du centromère

Identifié il y a de nombreuses années comme étant la constriction primaire du chromosome, le centromère fait toujours l'objet de nombreuses études allant de la levure à l'Homme. Ces études, principalement basées sur l'étude de chromosomes artificiels ou dicentriques, visent en particulier à déterminer les caractéristiques de la chromatine du centromère nécessaires à son établissement et à son maintien.

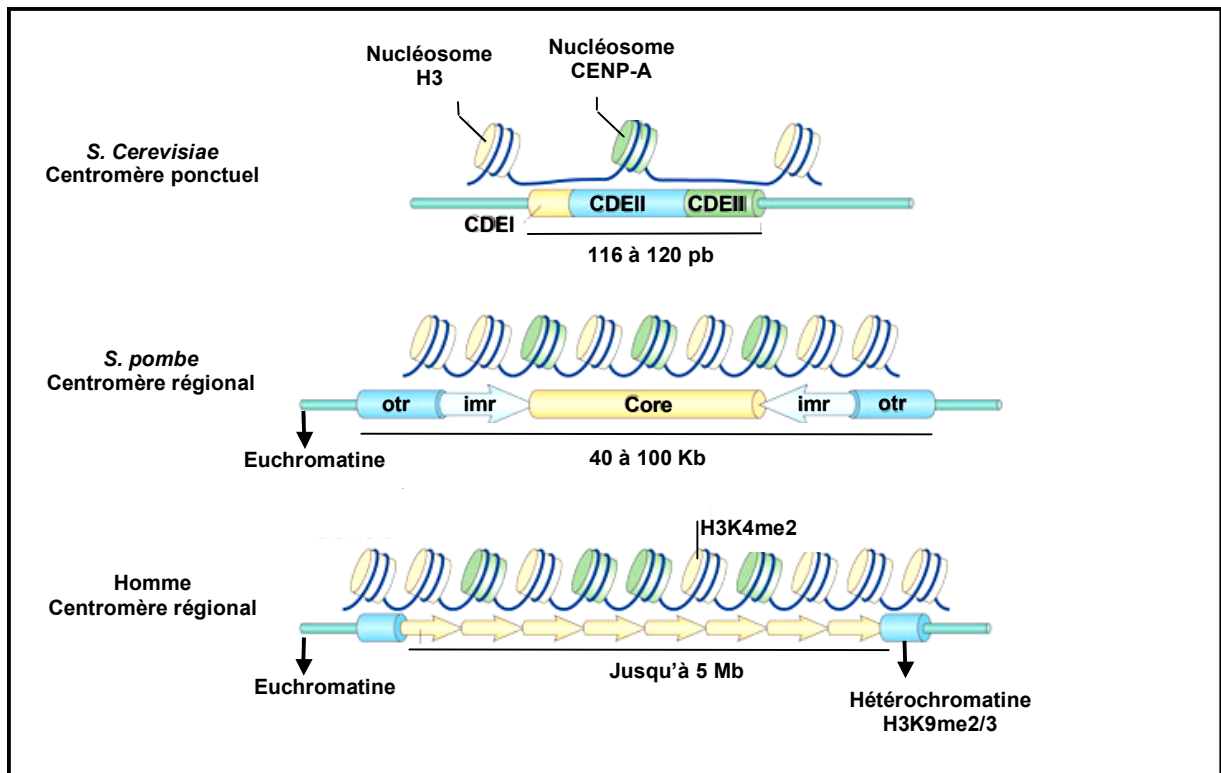


Figure 16 : Caractéristiques des centromères ponctuels et régionaux

Le centromère de *S. cerevisiae* ne permet l'ancrage que d'un seul microtubule alors que les centromères régionaux, plus larges, forment un site multi-ancrage pour les microtubules.

Le centromère de *S. cerevisiae* est composé d'éléments conservés (centromere DNA element), CDEI, CDEII et CDEIII. Les centromères régionaux ne contiennent pas de séquences d'ADN spécifiques mais se caractérisent en revanche par la présence de CENP-A conservée au fil de l'évolution. imr, inverted repeat sequence; otr, outer repeat (d'après Verdaasdonk et Bloom, 2011).

LES SEQUENCES GENOMIQUES

La chromatine du centromère permet la mise en place d'une structure protéique indispensable à la ségrégation des chromosomes : le kinétochore (Cf: L'assemblage du kinétochore). Cette caractéristique conservée au cours de l'évolution a longtemps laissé croire en l'existence au sein du centromère d'une séquence génomique spécifique. Cependant, l'ADN centromérique est très variable d'une espèce à l'autre (**Figure 16**). Ainsi, les eucaryotes les plus simples, comme *S. cerevisiae*, ont un centromère très restreint et défini par une séquence ADN unique sur tous les chromosomes, alors que chez les eucaryotes supérieurs, les centromères sont beaucoup plus étendus et constitués essentiellement de différentes séquences d'ADN répétées, appelées séquences satellites, pouvant s'étendre sur plusieurs mégabases.

Le centromère de *S. cerevisiae* a été le premier isolé (Clarke et Carbon, 1980). Il est composé de trois éléments fonctionnels CDE I, II et III (Centromere DNA Element) (Clarke et Carbon, 1983) qui ensemble forment une séquence de 116 à 120 bp qui est suffisante pour conférer une stabilité mitotique à un plasmide qui la contient (Fitzgerald-Hayes *et al.*, 1982; Hieter *et al.*, 1985). Les éléments I et III sont conservés sur les seize chromosomes alors que l'élément II a une séquence variable, unique sur chaque chromosome (Cleveland *et al.*, 2003). Chacun de ces trois éléments est indispensable pour la ségrégation correcte des chromosomes pendant la mitose (McGrew *et al.*, 1986). Parce qu'il est restreint, de séquence ADN simple et ne permet l'ancrage qu'à un seul microtubule (MT), le centromère de *S. cerevisiae* est appelé centromère ponctuel. Ce type de centromère n'a été observé chez aucun autre organisme étudié.

Chez *S. pombe*, les centromères ont une taille plus importante, allant d'environ 35 kb sur le chromosome 1 à 110 kilobases sur le chromosome 3 (Pidoux et Allshire, 2004), et permettent l'ancrage de plusieurs MTs (Joglekar *et al.*, 2008). Ces centromères sont appelés centromères régionaux (**Figure 16**). Chaque centromère est composé d'un domaine central flanqué de deux domaines externes. Le domaine central est lui-même composé d'éléments centraux cnt1, 2 et 3 constitués de séquences d'ADN non-répétées et entouré de deux séquences d'ADN répétées inversées, les éléments imrL et imrR (innermost repeats). Les domaines externes appelés otr (outer repeats), sont essentiellement composés d'un nombre variable de copies de deux éléments d'ADN répété, dg et dh. La séquence de chaque centromère est unique, seule l'organisation du domaine central est conservée d'un chromosome à l'autre (Chikashige *et al.*, 1989; Clarke *et al.*, 1986; Baum *et al.*, 1994).

Les eucaryotes supérieurs possèdent eux aussi des centromères régionaux dont les régions correspondantes ont été identifiées chez *C. albicans* (Sanyal *et al.*, 2004), *N. crassa* (Centola and

Carbon, 1994), *A. thaliana* (Copenhaver *et al.*, 1999), *D. melanogaster* (Sun *et al.*, 2003) et chez l'Homme (Schueler *et al.*, 2001). Chez ces organismes, l'ADN centromérique est constitué essentiellement de différentes formes de séquences d'ADN répétées pouvant s'étendre sur plusieurs mégabases. Cette composition constitue un obstacle à leur analyse détaillée, le séquençage et l'assemblage de longues régions d'ADN répétées étant difficile.

Chez l'Homme, les séquences d'ADN répétées au centromère sont appelées séquences α -satellite dont le motif unitaire fait 171 pb (Choo, 2001; Schueler et Sullivan, 2006). Ces motifs unitaires sont organisés en motifs répétés d'ordre supérieur (higher order repeat ou HOR), alignés de manière ininterrompue dans la même orientation sur des distances allant de 200 kb à 5 Mb. Au sein d'un même chromosome, les HORs sont quasiment identiques, alors que les motifs unitaires au sein d'un même HOR ne partagent qu'entre 60 et 80 % d'identité.

L'absence de conservation des ADN centromériques au cours de l'évolution semble indiquer que la fonction du centromère et sa position sur le chromosome ne sont pas déterminées par la séquence nucléotidique (Cleveland *et al.*, 2003). De plus, à l'exception de *S. cerevisiae* où les éléments CDE sus-mentionnés suffisent à former un centromère fonctionnel, l'ADN centromérique chez les autres eucaryotes n'apparaît ni suffisant ni nécessaire pour la fonction du centromère. Ni suffisant, car la seule présence de séquences de type centromériques ne conduit pas systématiquement à un centromère fonctionnel (Earnshaw *et al.*, 1985, Sullivan *et al.*, 1995), et non nécessaire car un centromère fonctionnel peut se former sur des régions n'offrant aucune similitude avec des séquences centromériques (les néocentromères) (Depinet *et al.*, 1997, Warbuton *et al.*, 1997, Choo, 2001). En revanche, ces régions se caractérisent toujours par des séquences riches en AT (du Sart *et al.*, 1997). La richesse des centromères en séquences AT est donc un trait commun à toutes les espèces. En effet, si le centromère de *S. cerevisiae* n'est pas composé de séquences répétées, les trois éléments CDE qui forment son centromère sont enrichis en AT (Clarke et Carbon, 1985).

CHROMATINE ET MODIFICATIONS EPIGENETIQUES

Devant la difficulté à déterminer clairement une séquence d'ADN centromérique spécifique, les regards se sont alors tournés vers l'implication possible de mécanismes épigénétiques. Il a alors été découvert un variant d'histone spécifique des centromères appelé CENP-A (centromeric histone H3) (Schueler et Sullivan, 2006). Ce variant de l'histone H3, également appelé Cse4p chez *S. cerevisiae*, Cnp1p chez *S. pombe* et CENP-A chez la plupart des mammifères, est spécifiquement et exclusivement localisé dans la chromatine centromérique. En dépit de grandes divergences

dans la composition de l'ADN centromérique observés de la levure à l'Homme, CENP-A a été très bien conservé au fil de l'évolution et représente certainement la caractéristique la plus importante du centromère. Cette histone s'associe à d'autres histones conventionnelles et permet la formation d'un nucléosome variant dont la structure exacte n'est pas encore clairement établie mais est, dans tous les cas, suffisamment différente de celle d'un nucléosome conventionnel pour conférer à la chromatine centromérique des propriétés distinctes (Black et Bassett, 2008; Palmer *et al.*, 1987). Si CENP-A est la marque épigénétique majeure du centromère, la chromatine centromérique est caractérisée par plusieurs autres marques épigénétiques. La combinaison de ces marques permet de définir plusieurs domaines au sein de la chromatine centromérique. Elle est ainsi constituée d'une alternance de blocs de nucléosomes contenant le variant CENP-A et de blocs de nucléosomes contenant l'histone H3 conventionnelle, dont l'extrémité N-terminale est diméthylée sur la lysine 4 (H3K4me2), une marque fréquemment associée aux régions promotrices des gènes (**Figure 17A**) (Blower *et al.*, 2002; Schueler et Sullivan, 2006). La chromatine centromérique se distingue également par l'hypo-acétylation de ses histones, une caractéristique fréquemment associée à l'hétérochromatine, et la présence unique pendant la mitose de l'histone H3 phosphorylé sur la thréonine 3 (H3T3Ph) (Dai *et al.*, 2006; Dai *et al.*, 2005). Les régions péri-centromériques sont composées de séquences répétées différentes de celles présentes au niveau du centromère et appelées satellite 1, 2 ou 3 chez l'Homme. Elles portent les marques typiques de l'hétérochromatine, notamment la di- et tri-méthylation de l'histone H3 sur la lysine-9 (H3K9me2/3) ainsi que la tri-méthylation de l'histone H4 (H4K20me3) et la présence de la protéine HP1 (Guenatri *et al.*, 2004; Martens *et al.*, 2005; Peters *et al.*, 2003; Schueler et Sullivan, 2006).

La fonction essentielle du centromère est de servir de plate-forme d'assemblage pour le KT lors de la mitose. La protéine CENP-A est l'une des composantes clés de cette fonction. Son absence empêche toute formation du KT ainsi que des anomalies de ségrégation des chromosomes, et sa surexpression ou sa localisation ectopique entraînent une mauvaise localisation d'une partie au moins des protéines du KT (Cheeseman et Desai, 2008). Il a été proposé qu'au sein des chromosomes, la chromatine centromérique formerait des boucles permettant de présenter les nucléosomes contenant CENP-A alignés à la surface du centromère et ainsi faciliter l'assemblage du KT en mitose (**Figure 17B**) (Blower *et al.*, 2002; Schueler et Sullivan, 2006). CENP-A permet l'assemblage du KT par l'intermédiaire des protéines du complexe CCAN (constitutive centromere-associated network) (Cheeseman et Desai, 2008) qui reconnaissent la structure particulière des nucléosomes contenant CENP-A (CENP-C, CENP-H, CENP-I, CENP-K, CENP-L,

CENPM, CENP-N, CENP-O, CENP-P, CENP-Q, CENP-R, CENPU(50), CENP-T, CENP-W, CENP-S et CENP-X) (Perpelescu et Fukagawa, 2011). Le CCAN constitue la partie interne du KT et représente l'interface entre la chromatine centromérique et le reste du KT. En début de mitose, il permet le recrutement des différents complexes composant la partie externe du KT et la corona (Cf: Le kinétochore). Les protéines du CCAN sont généralement divisées en deux sous-complexes : le complexe CENP-A^{NAC} (CENP-A nucleosome associated complex), qui comme son nom l'indique est directement en contact avec le nucléosome CENP-A ; et le complexe CENP-A^{CAD} (CENP-A distal complex), qui interagit non pas directement avec CENP-A mais avec les protéines du complexe CENP-A^{NAC} (Cheeseman et Desai, 2008). Chez *S. cerevisiae* et *S. pombe*, les homologues fonctionnels du CCAN humain sont, respectivement, les complexes Ctf19 et Sim4 (Santaguida et Musacchio, 2009). Les orthologues du CCAN chez les autres organismes étudiés n'ont pas encore été identifiés.

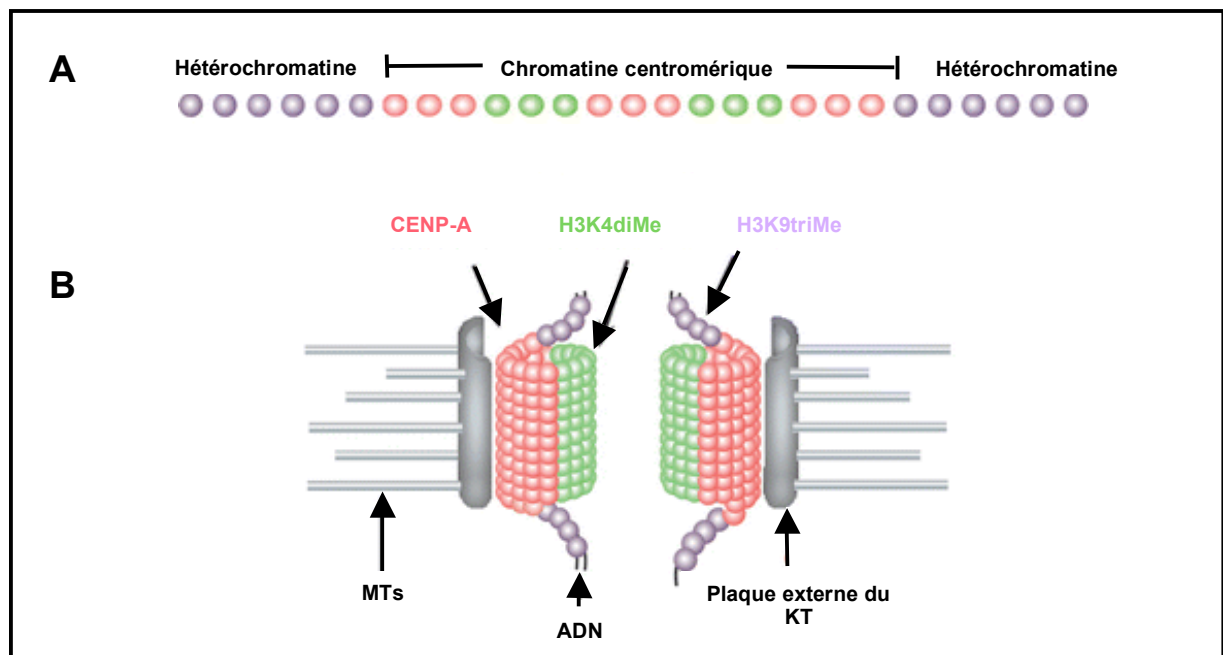


Figure 17 : Modèle d'organisation de la chromatine centromérique

(A) Représentation linéaire de la chromatine centromérique montrant les différents domaines caractérisés par leurs marques épigénétiques.

(B) En mitose, la chromatine centromérique adopte une conformation spatiale conduisant à la présentation des nucléosomes CENP-A à la surface du centromère (d'après Schueler et Sullivan, 2006).

Les fonctions du centromère

Le centromère est une région du chromosome permettant d'assurer la délivrance d'une copie de chaque chromosome aux cellules filles pendant la mitose. Le centromère est donc essentiel pour la transmission correcte de l'information génétique d'une génération de cellules à une autre.

LA MITOSE : L'ETAPE DU CYCLE CELLULAIRE OU LE CENTROMERE JOUE UN ROLE MAJEUR

Les premières observations de la division cellulaire datent d'un siècle et demi avec la célèbre proposition de Rudolf Virchow en 1858 « omnis cellula e cellula » : toute cellule provient d'une cellule. Un siècle plus tard, Howard et Pelc aboutissent au concept de « cycle cellulaire » suite à leurs travaux qui montrent notamment que l'ADN est synthétisé durant une période réduite de la vie de la cellule et que les processus de mitose et de duplication des chromosomes sont deux processus temporellement dissociés (Howard, 1953).

Dynamique du cycle cellulaire

La plupart des cellules de l'organisme ne se divisent pas, elles sont en quiescence ou en phase G0 du cycle cellulaire (G0 pour Gap 0 car les premiers histologistes n'observaient aucun phénomène visible durant ce laps de temps). Ces cellules en quiescence vont entrer en phase proliférative en présence de signaux mitogènes. L'intégration cellulaire de ces signaux induit la stimulation de la transcription de certains gènes essentiels pour entrer en phase de prolifération. La cellule va alors passer par une étape spécifique, le point de restriction, désignée comme étant le moment où la cellule n'a plus besoin de stimuli mitogènes pour progresser dans le cycle (**Figure 18**). Une fois ce seuil dépassé, la cellule va entamer irréversiblement un cycle de division cellulaire. La cellule va alors dupliquer son matériel génétique et partager de manière équitable chaque copie dans deux cellules filles via un processus très ordonné. Ce cycle est composé de deux parties : l'interphase et la phase M (**Figure 19**).

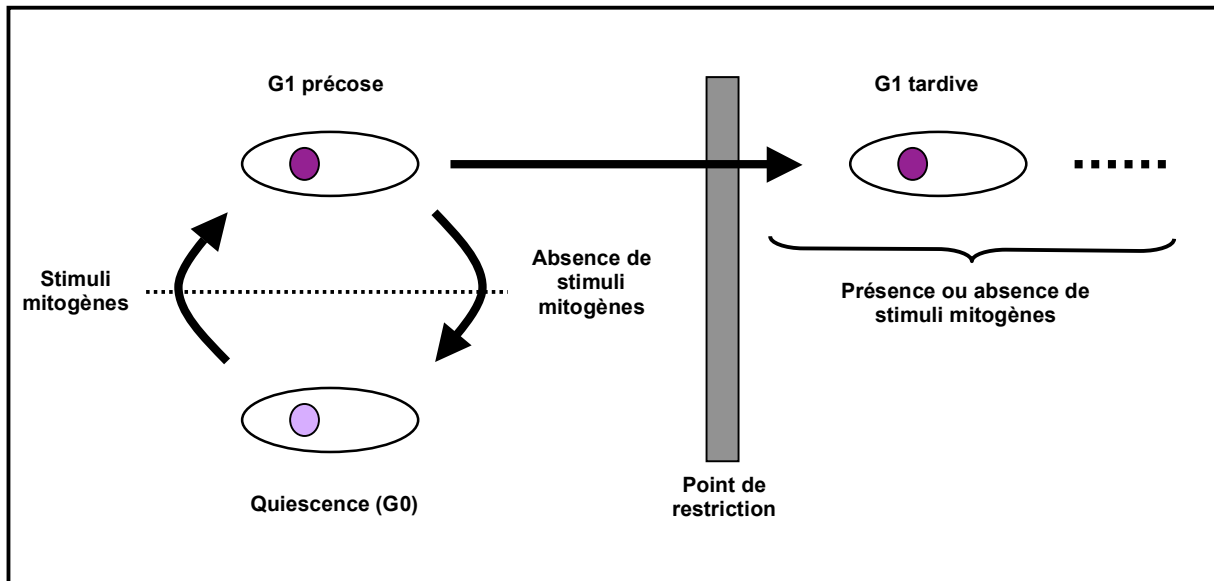


Figure 18 : La transition G0/G1 : le point de restriction

Le point de restriction désigne le moment où la cellule n'a plus besoin de stimuli mitogènes pour progresser dans le cycle cellulaire.

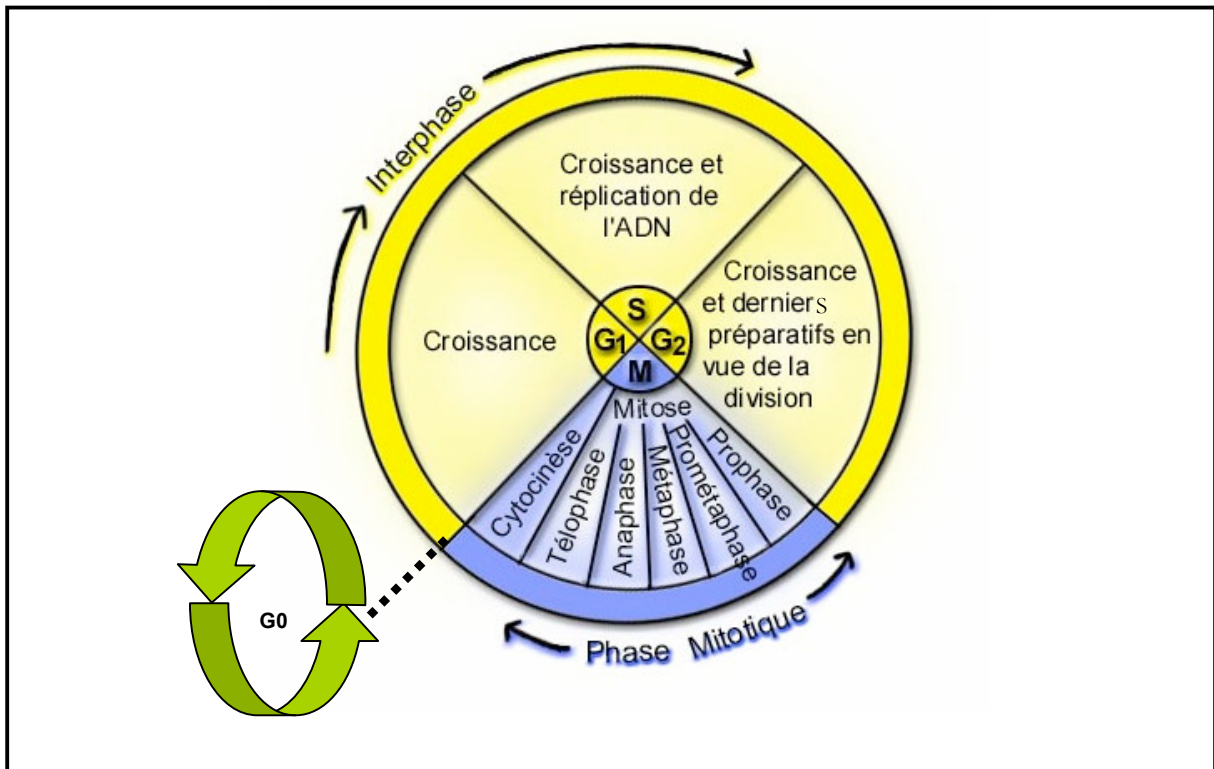


Figure 19 : Représentation schématique du cycle de division cellulaire chez les eucaryotes

Le cycle de division cellulaire se décompose en deux parties: l'interphase, qui comprend les phases G1, S et G2, et la phase M, qui comprend la mitose et la cytokinèse. Lorsque les cellules ne se divisent pas, elle sont en phase de quiescence, la phase G0 (d'après <http://www.ustboniface.mb.ca/cusb/abernier/Biologie/Cellule/Images/etapede>).

L'interphase

L'interphase se décompose en trois phases : la phase G1 (Gap 1), S (Synthèse) et G2 (Gap 2). La phase G1 est la phase la plus longue de la division cellulaire au cours de laquelle la cellule est en pleine croissance. La cellule reçoit les signaux mitogènes qui l'autorisent à passer le point de restriction. Elle synthétise alors essentiellement les constituants qui lui seront nécessaires pour la réplication de l'ADN. La phase S correspond à la phase de synthèse d'ADN, qui se déroule selon un mécanisme de réplication semi-conservatif et permet la duplication de la totalité de l'information génétique. À la fin de la phase S, tous les chromosomes possèdent deux chromatides soeurs qui sont physiquement attachés l'une à l'autre par des complexes protéiques appelés cohésines (Cf: La cohésion des chromatides soeurs). La cellule entame également la duplication de son centrosome au cours de cette phase. La phase G2 correspond à la période de croissance finale, la cellule synthétise la plupart des protéines nécessaires pour entrer en mitose.

La phase M

La transmission fidèle du patrimoine génétique est assurée durant la dernière étape de la division cellulaire : la phase M. Dans un cycle cellulaire typique de cellule somatique, la phase M comprend la mitose, aboutissant au partage des chromatides soeurs, et la cytokinèse, aboutissant à l'individualisation des cellules filles. La mitose est un processus complexe et extrêmement régulé par lequel une cellule partage en deux parties égales son matériel génétique préalablement dupliqué. Ainsi, la mitose permet de ségréger une copie de chaque chromosome de la cellule mère dans deux cellules filles naissantes de manière à ce que chaque cellule fille hérite de l'ensemble des chromosomes (Nigg, 2001). Durant la mitose, une ségrégation incorrecte des chromosomes peut entraîner de l'aneuploïdie (nombre incorrect de chromosomes) dans les cellules filles conduisant ainsi à de l'instabilité génétique, une étape clé dans le développement de cancers chez l'homme (Draviam *et al.*, 2004). La mitose est donc une étape cruciale de la division cellulaire.

Le cycle cellulaire est orchestré par un ballet de cyclines et de kinases

La division cellulaire fait appel à une mécanique complexe qui est régulée par un grand nombre de protéines permettant la succession des différentes phases et le contrôle de l'intégrité du patrimoine génétique.

L'une des découvertes majeures dans le domaine du cycle cellulaire a été l'identification d'une famille de protéines kinases, les kinases cycline-dépendantes (« cyclin- dependent kinase », cdk).

Ces protéines kinases jouent en effet un rôle essentiel dans le déclenchement, le contrôle et la succession harmonieuse des différentes phases du cycle (Norbury et Nurse, 1990). Ces kinases agissent en association avec de petites protéines activatrices : les cyclines (Murray, 2004; Pines, 1995). Le modèle général de régulation de l'activité des cdk/cycline repose sur les variations périodiques du niveau des cyclines par des cycles de transcription, transport et dégradation, ainsi que sur la régulation du niveau de phosphorylation des cdk. Plus récemment, d'autres familles de protéines kinases ont été décrites dans la régulation du cycle cellulaire. Ainsi les Plks (Polo-like kinases), les Neks (NIMA-related kinases) et les kinases Aurora sont impliquées dans le cycle de division du centrosome en interphase et dans la condensation et la ségrégation des chromosomes en mitose (Nigg, 2001). La **Figure 20** illustre les différentes combinaisons de couples cdk/cycline qui assurent le contrôle et les transitions correctes des différentes phases du cycle cellulaire. En particulier, le couple Cdk1/cycline B régule la transition G2/M et la progression mitotique.

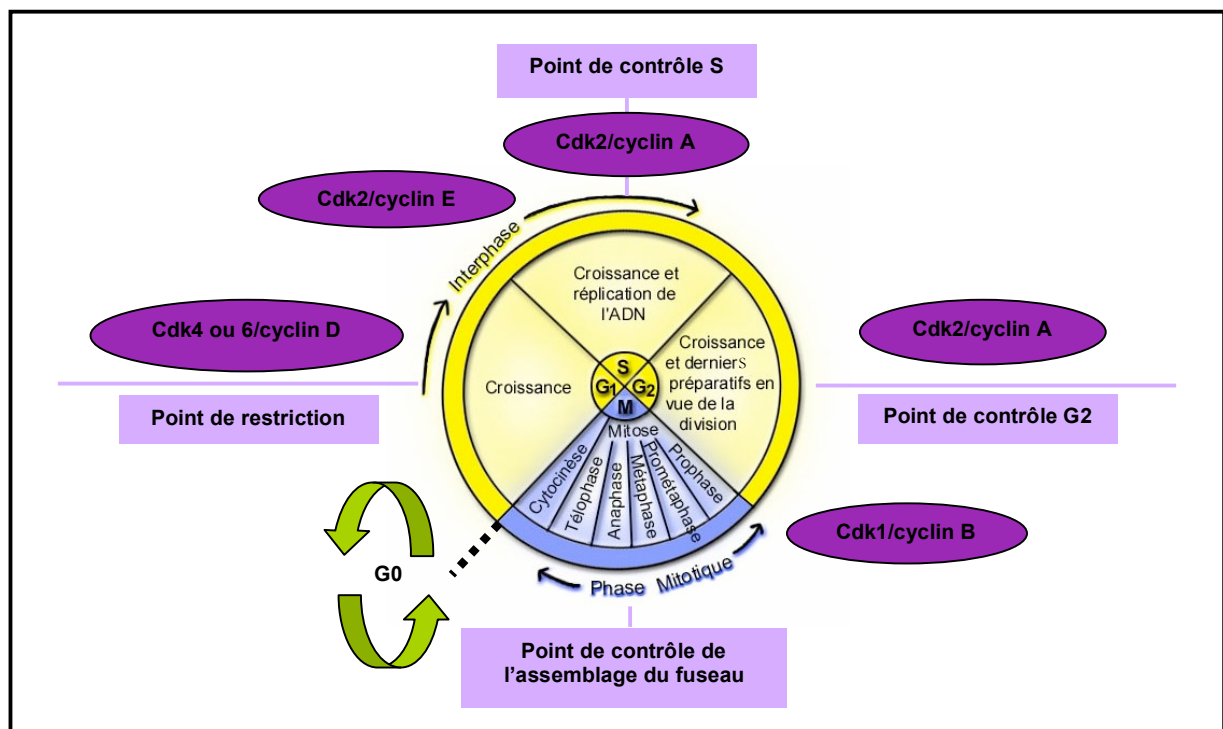


Figure 20 : Contrôle de la division cellulaire

Plusieurs points de contrôle, à différentes étapes du cycle cellulaire, permettent à la cellule de vérifier l'intégrité du patrimoine génétique et sa répartition équitable entre les deux cellules filles. Différentes combinaisons de couples cdk/cycline assurent le contrôle et la transition correcte entre les différentes phases du cycle cellulaire. Ainsi cdk4 et cdk6, associées à des cyclines de type D, régulent le déroulement de la phase G1. Puis cdk2/cycline E prend le relais pour assurer la transition G1/S, suivie par cdk2/cycline A qui assure le contrôle de la phase S. Cdk1/cycline A intervient en G2, cdk1/cycline B régule la transition G2/M et la progression mitotique (d'après <http://www.ustboniface.mb.ca/cusb/abernier/Biologie/Cellule/Images/etapede>).

Régulation de l'entrée en mitose : la transition G2/M

Tout au long de la phase G2, la cellule se prépare à l'entrée en mitose. Il y a formation progressive des complexes Cdk1/cycline B, également appelé MPF (Mitosis Promoting Factor), qui seront subitement activés juste avant l'entrée en mitose de la cellule. La cycline B s'accumule ainsi progressivement pendant les phases S et G2, ce qui conduit à l'accumulation là aussi progressive de complexes MPF qui restent, dans un premier temps, sous forme inactive. Afin d'être fonctionnelle, Cdk1 est phosphorylée par CAK (CDK-activating kinase) sur le résidu thréonine 161, mais le complexe MPF reste néanmoins inactif du fait de la présence inhibitrice de Wee-1 qui phosphoryle les deux résidus Tyr15 et Thr14. Juste avant l'entrée en mitose, l'activation des phosphatases cdc25 va permettre la déphosphorylation des résidus Tyr15 et Thr14 de Cdk1. L'activation complète des complexes MPF met en jeu un mécanisme d'auto-amplification car ils sont capables d'activer par phosphorylation leurs propres activateurs, les cdc25, ainsi que d'inhiber leurs inhibiteurs, Wee-1. Ce mécanisme de rétrocontrôle positif permet d'obtenir très rapidement un niveau protéique important de complexes Cdk1/cycline B actifs qui déclenche alors l'entrée en mitose (**Figure 21**) (Lindqvist *et al.*, 2009).

Le complexe MPF, une fois activé, va permettre le déclenchement de nombreux évènements lors de la mitose en phosphorylant différentes protéines, telles que :

- La condensine et l'histone H1, impliquées dans la condensation des chromosomes
- Les lamines, qui permettent la désorganisation de l'enveloppe nucléaire
- Les protéines associées aux MTs, qui permettent l'assemblage du fuseau mitotique
- L'Anaphase Promoting Complex/Cyclosome (APC/C) dont l'activité est nécessaire à la séparation des chromatides sœurs et la sortie de mitose.

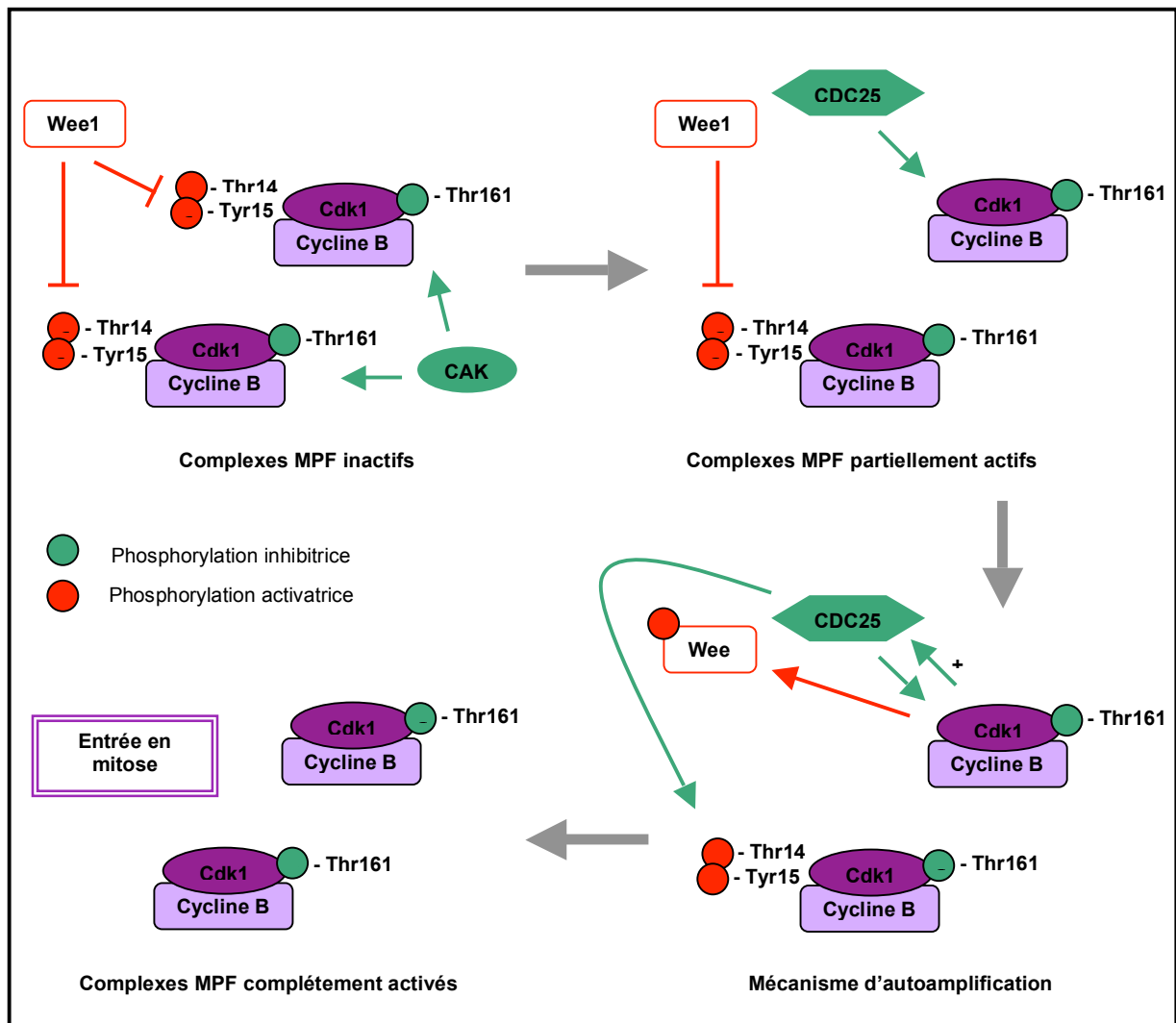


Figure 21 : Activation des complexes Cdk1/Cycline B lors de la transition G2/M.

L'activité du complexe Cdk1/cycline B est principalement régulée par une suite de phosphorylation/déphosphorylation couplé à un mécanisme d'autoamplification.

Observation et caractérisation des différentes étapes de la mitose

La mitose est subdivisée en 5 étapes : prophase, pré-métaphase, métaphase, anaphase et télophase (**Figure 22**).

Prophase : Au cours de la prophase, la chromatine commence à se condenser afin de faciliter la distribution de son matériel génétique. Une structure protéique appelée kinétochore (KT) s'assemble progressivement sur chaque chromatide sœur au niveau des centromères. Ils se positionnent de manière symétrique et opposée sur les chromosomes. De nombreux changements ont lieu dans le cytoplasme. Les centrosomes, dupliqués en interphase, se séparent et entament leur migration à deux pôles diamétralement opposés dans le noyau. Cette réorganisation des composants du cytosquelette interphasique conduit, en périphérie de l'enveloppe nucléaire, à la formation du fuseau mitotique à partir des centrosomes, dont l'activité de nucléation des MTs (microtubules) augmente. Ces MTs sont des polymères de tubuline α et β qui alternent des phases de croissance et de rétrécissement connues sous le nom d'instabilité dynamique (Mitchison et Kirschner, 1984). La cohésine, mise en place au cours de la phase S pour maintenir les chromatides sœurs ensemble, est progressivement retirée au niveau des bras des chromosomes (chez les eucaryotes supérieurs). L'enveloppe nucléaire commence à se désagréger sous forme de petites vésicules membranaires, il s'agit de la NEB (Nuclear Enveloppe Breakdown) : la cellule est en pré-métaphase.

Pré-métaphase : La condensation des chromosomes continue. Les chromatides sœurs sont alors physiquement liées l'une à l'autre uniquement par le centromère pour donner ainsi au chromosome son apparence caractéristique en forme de X. Le fuseau mitotique s'organise dans toute la cellule, il est constitué de MTs polaires et asexiaux permettant sa mise en place et de MTs capturés à leur extrémité +, extrémité la plus dynamique, par les KTs : les MTs kinétochoriens. Le chromosome capture latéralement un MT via son KT et initie un mouvement rapide vers le pôle par dépolymérisation du MT au niveau du KT. D'autres MTs vont s'insérer au niveau de ce KT pour renforcer l'interaction tandis que des MTs issus du pôle opposé contactent son KT frère. Les chromosomes ainsi bi-orientés entreprennent des mouvements de congression puis les forces opposées s'équilibrent, et les chromosomes s'alignent progressivement selon l'axe équatorial du fuseau mitotique sur un même plan appelé plaque métaphasique. Le point de contrôle de l'assemblage du fuseau s'inactive : la cellule est en métaphase.

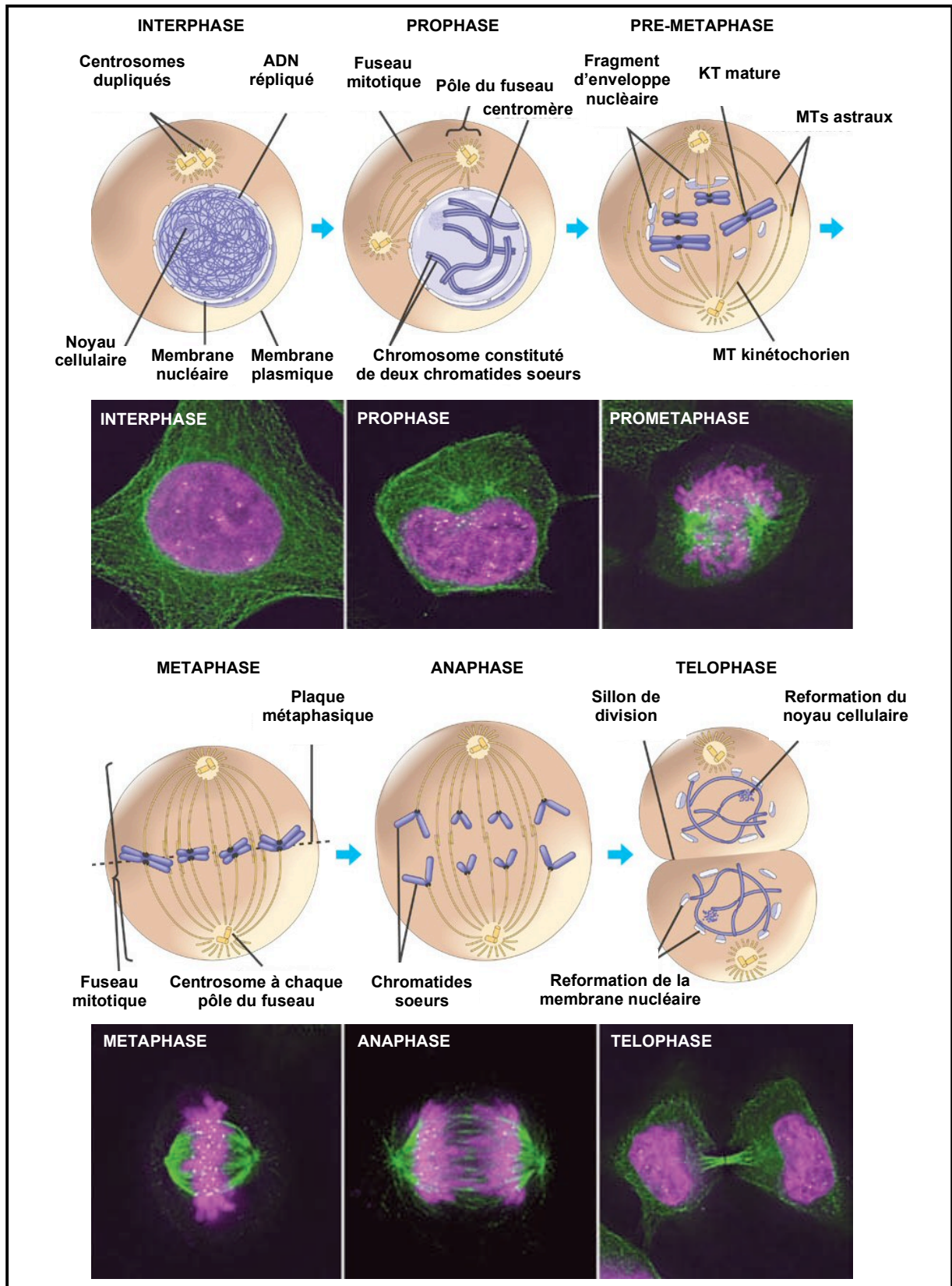


Figure 22 : Les différentes étapes de la mitose

La mitose est composée de la prophase, la pré-métaphase, la métaphase, l'anaphase et la télophase. Ces différentes étapes ont été observées par (immuno)marquage fluorescent: l'ADN est en violet, les MTs en vert et les KTs en jaune (d'après Jackson *et al.* 2007).

Métaphase : La métaphase est caractérisée par une condensation maximale des chromosomes. À ce stade, les chromosomes sont parfaitement alignés et sont soumis à deux forces antagonistes : la cohésion des chromatides sœurs au centromère et la traction exercée par les MTs.

Anaphase : L'anaphase est déclenchée par un événement irréversible : la perte de cohésion aux centromères. La cohésine liant les chromatides sœurs ensemble est clivée, leur permettant ainsi de se séparer. Chacune des deux chromatides sœurs issues d'un même chromosome est alors tirée vers un pôle opposé de la cellule à mesure de la dépolymérisation des MTs kinétochoriens (anaphase A). Puis, les MTs polaires vont s'allonger pour préparer la future séparation des deux cellules filles (anaphase B).

Télophase : Les chromosomes commencent à se décondenser. Les enveloppes nucléaires des cellules filles se reconstituent à partir des fragments de membrane nucléaire de la cellule mère. Le fuseau mitotique se désassemble progressivement. La dynamique des MTs ralentit jusqu'à ce que le cytosquelette retrouve sa configuration interphasique.

Les observations des différentes étapes de la mitose montrent l'importance du centromère qui sert de véritable plate-forme pour l'assemblage d'un complexe protéique majeur : le KT.

L'ASSEMBLAGE DU KINETOCHORE ET POINT DE CONTROLE DE L'ASSEMBLAGE DU FUSEAU

Les KTs assurent plusieurs fonctions essentielles durant la ségrégation des chromosomes : ils assurent une liaison dynamique entre les chromosomes et les extrémités + des MTs kinétochoriens, ils permettent la génération de tension au niveau des centromères, et sont responsables du point de contrôle d'assemblage du fuseau (SAC, Spindle Assembly Checkpoint) (Cimini, 2008; Inoue et Salmon, 1995; Musacchio et Salmon, 2007; Pearson *et al.*, 2001; Skibbens *et al.*, 1993; Tirnauer, 2002).

La structure du kinétochore

Unique sur chaque chromatide, le KT est une structure multiprotéique organisée de manière complexe (**Figure 23**). Lorsqu'il est visualisé par microscopie électronique, il apparaît constitué de quatre domaines, que l'on peut différencier par leur différence d'opacité aux électrons. Le

domaine du KT immédiatement associée à la chromatine est nommée plaque interne. Elle est dense aux électrons et présente une épaisseur de 20 à 40 nm. La plaque externe est également dense aux électrons et présente une épaisseur de 35 à 40 nm. Ces 2 plaques sont séparées par la plaque intermédiaire de 15 à 35 nm d'épaisseur, qui apparaît translucide aux électrons. Le terme de corona désigne l'extension filamenteuse de 100 à 300 nm émanant de la plaque externe. Suivant les organismes considérés, le KT apparaît sous la forme d'une structure multi-laminaire discoïde, dont le diamètre varie entre 100 et 500 nm, capable d'interagir avec 10 à 45 MTs (Rieder, 1982).

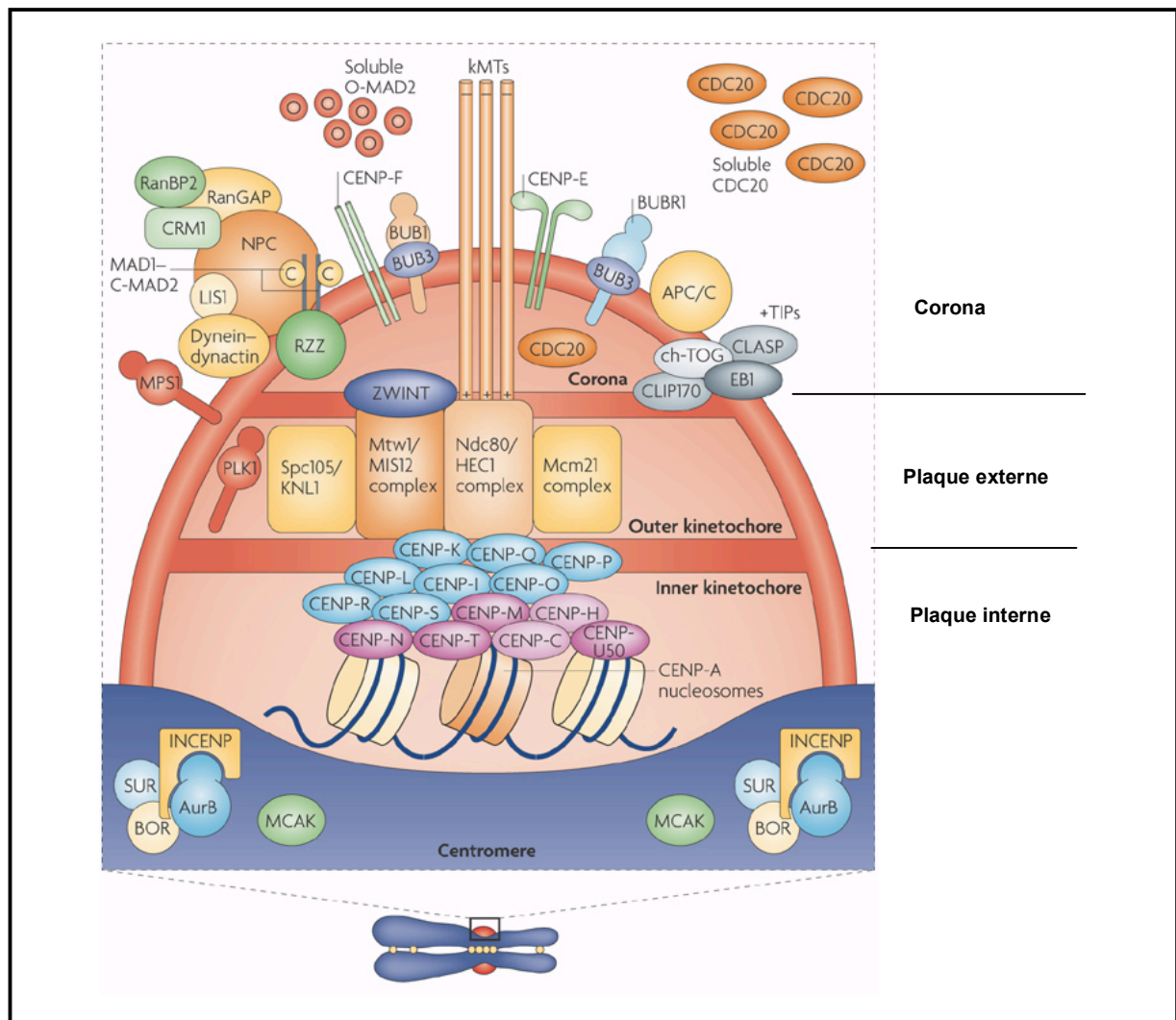


Figure 23 : La composition du kinétochore

Au cœur du KT se trouve des nucléosomes contenant le variant d'histone CENP-A. Un réseau de protéines appelé CCAN, composé de différentes protéines de type CENP, est associé avec CENP-A tout au long du cycle cellulaire formant ainsi la plaque interne du KT. En début de mitose, de nombreuses protéines sont recrutées pour former la plaque externe du KT. Parmi ces protéines se trouve le complexe MKN qui permet notamment l'ancrage des MTs au reste du KT (d'après Musacchio et Salmon, 2007).

La plaque interne du KT est constitutivement composée de nucléosomes contenant la protéine CENP-A. Lors de la prophase, CENP-A va permettre l'assemblage de la plaque externe du KT par l'intermédiaire du complexe CCAN, au sein duquel la protéine CENP-C semble jouer un rôle prépondérant (Carroll *et al.*, 2010; Screpanti *et al.*, 2011). De nombreuses protéines vont alors être recrutées dont les composants du réseau KMN qui comprend les complexes protéiques Knl1, Mis12 et Ndc80. Ce réseau au cœur du KT joue un rôle fondamental. En effet, il représente le lien direct entre les MTs et le chromosome (Kotwaliwale et Biggins, 2006), et permet par ailleurs également la mise en place des protéines responsables du SAC au niveau de la corona.

Le point de contrôle de l'assemblage du fuseau (SAC)

Chez les eucaryotes supérieurs, la formation de la plaque métaphasique est le point crucial du processus mitotique et son bon déroulement est sous la surveillance du SAC dont le KT est la pièce maîtresse.

Principe

L'anaphase ne peut se déclencher qu'après l'alignement du dernier chromosome sur la plaque métaphasique. Si cela n'était pas le cas, les risques de ségrégation aberrante de chromosomes et par conséquent d'aneuploïdies seraient très importants. Afin de vérifier si cet alignement est complet, la transition métaphase-anaphase est finement régulée par le SAC (Musacchio et Salmon, 2007). Le SAC est un centre intégrateur de signaux multiples qui autorise ou non la progression dans le cycle en permettant la transition métaphase-anaphase. Un seul KT ne répondant pas aux critères d'inactivation du SAC est suffisant pour maintenir ce point de contrôle actif et provoquer ainsi un arrêt mitotique. Par conséquent, ce même arrêt peut être également déclenché en réponse à un traitement des cellules par des inhibiteurs de la dynamique des MTs comme le taxol ou le nocodazole (Nicklas, 1997; Straight et Murray, 1997). Le passage en anaphase ne peut donc être franchi que lorsque tous les KTs sont ancrés à des MTs mais également quand une tension suffisante est appliquée au niveau de l'ADN centromérique entre les deux KTs frères d'un même chromosome (Musacchio et Hardwick, 2002) (**Figure 24A**). Cette tension assure à la cellule l'attachement bipolaire et donc correct des chromosomes (attachement amphitélétique). En effet, il y a absence de tension dans le cas où les deux chromatides soeurs sont anormalement attachées au même pôle (attachement syntélétique ou

mérotélique) (**Figure 24B**). Des mécanismes de contrôle présents au niveau des centromères sont alors chargés de corriger ces « mauvais » attachements.

Le SAC a donc pour unique objectif de donner un délai suffisant à la cellule pour l'action de systèmes de correction avant la séparation des chromatides sœurs.

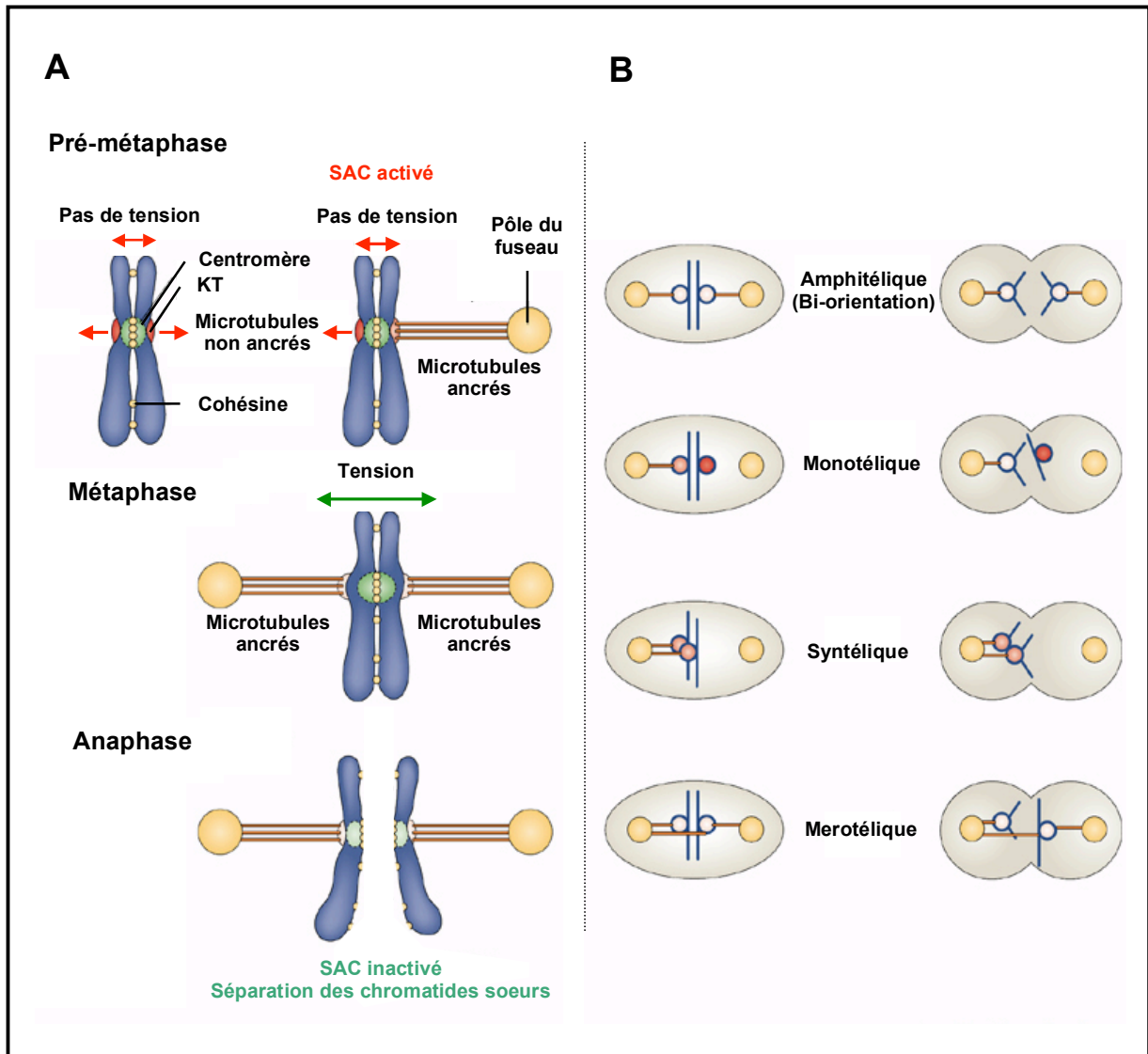


Figure 24 : Point de contrôle du fuseau mitotique (SAC)

(A) Dans la cellule, le moindre KT non-attaché prolonge l'activité du SAC. Il faut donc que les deux KT des chromosomes soient attachés aux MTs. Dans ce cas, une tension s'établit alors peu à peu au niveau de leur centromère. Lorsque cette tension est établie au niveau de chacun des chromosomes, le SAC est inactivé, les chromatides sœurs se séparent et la cellule passe en anaphase.

(B) Les MTs peuvent s'attacher aux KT de manière correcte (amphitélétique) mais également de manière incorrectes (syntélétique et mérotélétique). Des mécanismes de contrôle sont présents dans la cellule et sont chargés de corriger ces attachements incorrects. Par ailleurs, l'attachement monotélétique est une situation normale durant la pré-métaphase avant la bi-orientation du chromosome (d'après Musacchio et Salmon, 2007).

La transition métaphase-anaphase

Pendant la métaphase, les chromatides sœurs sont reliées par des complexes protéiques de cohésines uniquement au niveau de leur centromère. Le clivage de cette cohésine, et par conséquent la séparation des chromatides sœurs, est le point culminant de la mitose, elle définit le passage en anaphase.

Ce passage est étroitement lié à l'activation d'un large complexe appelé APC/C (Anaphase Promoting Complex/Cyclosome) (Passmore, 2004). Il s'agit d'un complexe ubiquitine-ligase qui permet la dégradation séquentielle de protéines régulatrices de la mitose. Lors de ce processus, la protéine substrat est marquée par conjugaison covalente de chaînes d'ubiquitine pour être ainsi reconnue et dégradée par un complexe protéolytique, le protéasome 26S (Coux, 2002). Pour être actif, le complexe APC/C doit être préalablement phosphorylé en entrée de mitose (Kotani *et al.*, 1998; Rudner et Murray, 2000). Cette phosphorylation dépend du complexe cdc2/cyclin B1 (Sudakin *et al.*, 1995) ainsi que de la kinase Plk1 (Descombes et Nigg, 1998). APC/C doit également s'associer à une protéine appelée cdc20, une protéine responsable de la reconnaissance de ses substrats (Sorensen *et al.*, 2000). Une fois le SAC inactivé, le complexe APC/C/cdc20 est activé et va ubiquitinyler la sécurine et induire sa dégradation par le protéasome. Or, la sécurine était auparavant liée à la séparase, une protéase de la famille des caspases, afin de l'inhiber. La destruction de la sécurine permet donc de lever cette inhibition. La séparase peut alors cliver la sous-unité RAD21 du complexe cohésine (Cf : La cohésion des centromères), ce qui provoque son ouverture et donc la séparation des chromatides sœurs qui vont alors migrer vers les pôles opposés de la cellule, tractées par les MTs kinétochoriens : la cellule rentre en anaphase (**Figure 25**).

Une fois activé, le complexe APC/C provoque également la dégradation de la cycline B1 (Glotzer *et al.*, 1991) (**Figure 25**). Cette dégradation débute en métaphase et se prolonge jusqu'à la fin de la mitose (Clute et Pines, 1999). Cette dégradation induit différents mécanismes dont le désassemblage du fuseau mitotique, la décondensation des chromosomes, la cytokinèse et la reformation de l'enveloppe nucléaire permettant ainsi à la cellule de sortir de mitose (Gallant et Nigg, 1992; Holloway *et al.*, 1993; Luca *et al.*, 1991; Murray *et al.*, 1989; Surana *et al.*, 1993).

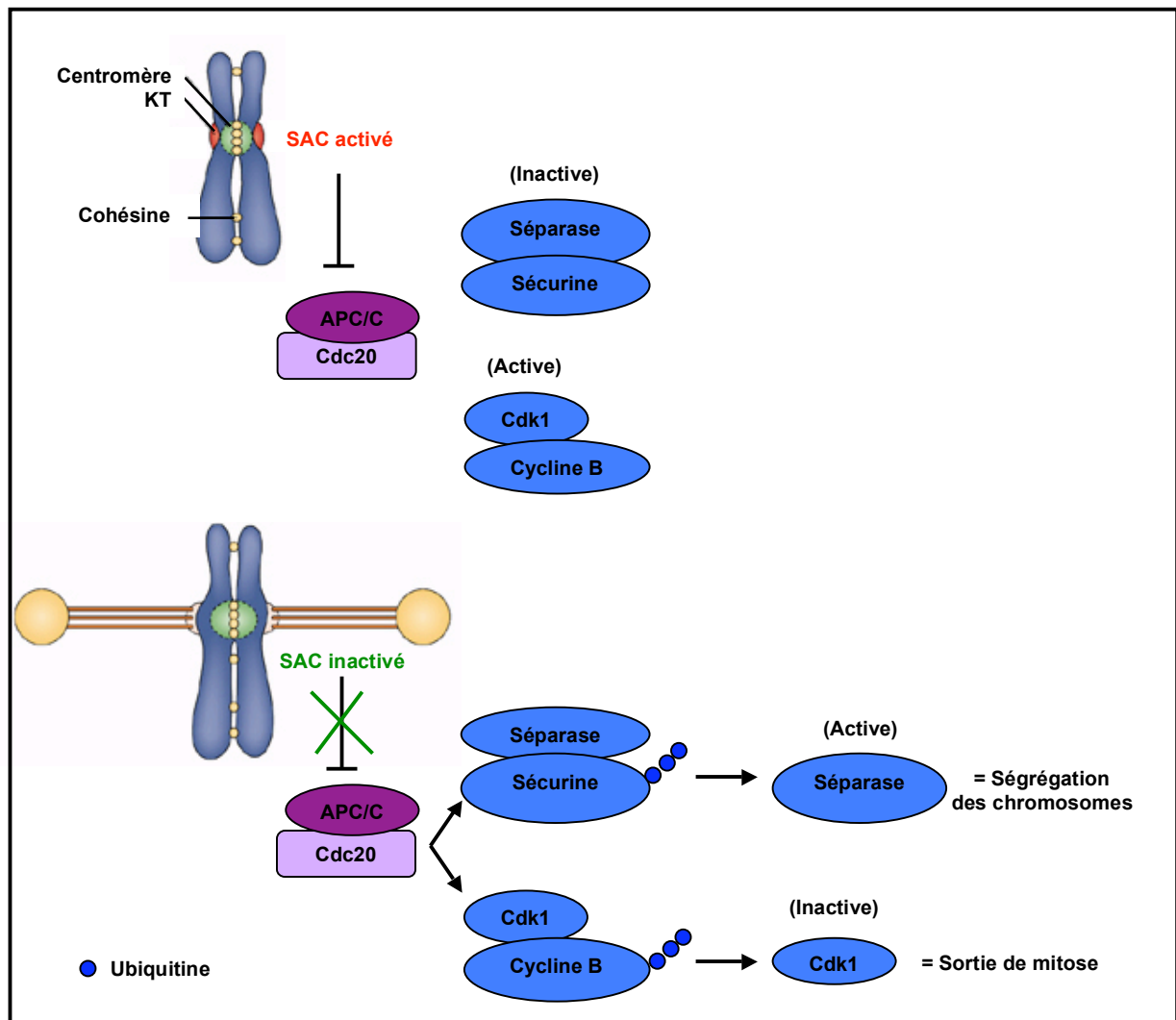


Figure 25 : Représentation schématique du passage en anaphase

Une fois le SAC inactivé, le complexe APC/C/cdc20 est activé et peut alors ubiquitiner ses cibles: la cycline B et la sécurine. Les chromatides sœurs se séparent et la cellule sort progressivement de mitose (d'après Musacchio et Salmon, 2007).

Comment fonctionne le SAC ?

En 1991, deux études indépendantes menées chez la levure *S. cerevisiae* ont identifié divers gènes dont la mutation empêche l'arrêt en mitose des cellules, normalement observé après traitement par des inhibiteurs de la dynamique des MTs (Hoyt *et al.*, 1991; Li et Murray, 1991). Les gènes identifiés dans ces études sont les gènes Mad (mitotic-arrest deficient) : Mad1, Mad2 et Mad3 (BubR1 chez l'Homme) et les gènes Bub (budding uninhibited by benzimidazole) : Bub1 et Bub3. Ces gènes sont conservés chez tous les eucaryotes, et ils sont collectivement impliqués dans une

voie active dès la pré-métaphase empêchant la séparation précoce des chromatides sœurs (Musacchio et Hardwick, 2002). Cette voie constitue le SAC.

A partir de la NEB, les protéines de signalisation du SAC sont recrutées à la surface de tous les KTs : le point de contrôle est alors activé (Malmanche *et al.*, 2006). Ces protéines vont former un complexe inhibiteur de la protéine cdc20, qui, normalement, interagit avec la protéine APC/C (Fang, 2002; Fang *et al.*, 1998a, b; Hwang *et al.*, 1998; Kim *et al.*, 1998; Wassmann et Benezra, 1998). L'entrée en anaphase est donc retardée au moyen de l'inhibition du complexe APC/C/cdc20 empêchant ainsi l'ubiquitinylation de la cyclin B1 (Raff *et al.*, 2002) et de la sécurine (Zur et Brandeis, 2001) par ce complexe. Ceci sous-entend l'existence d'un système senseur capable d'une part de vérifier que l'attachement MT-KT est correct et d'autre part de jouer un rôle d'intermédiaire avec le point de contrôle. Actuellement, il est proposé que le point de contrôle mitotique est composé de 2 voies d'activation complémentaires : l'une reposant sur Aurora B, une protéine localisée dans la partie interne des centromères et faisant partie du Chromosomal Passenger Proteins (CPP), et l'autre sur les protéines Bub et Mad (Musacchio et Salmon, 2007). Ainsi les protéines Bub et Mad surveillent l'attachement du KT aux MTs du fuseau mitotique, tandis qu'Aurora B est chargée de vérifier la bi-orientation de cet attachement. Aurora B est capable de détecter une mauvaise configuration dans l'interaction chromosome-fuseau mitotique ou une tension insuffisante dans l'attachement au fuseau, et intervient pour rétablir la situation. En absence de tension suffisante ou lorsque la liaison est anormale comme dans le cadre d'une liaison syntélique, Aurora B phosphoryle les composants du réseau KMN (Cheeseman *et al.*, 2002; Cheeseman *et al.*, 2006; Ciferri *et al.*, 2008; DeLuca *et al.*, 2006; Gestaut *et al.*, 2008). Ces phosphorylations déstabilisent les interactions MT/KT : elles provoquent une rupture de l'interaction entre les MTs et le KTs : cela génère des KTs libres qui, via le recrutement de protéines Bub et Mad, vont prolonger le signal inhibiteur du point de contrôle du fuseau mitotique. Un modèle propose que la mise sous-tension des KTs provoque leur étirement, ce qui aurait pour effet de séparer physiquement la kinase Aurora B (localisée dans la zone chromatiniennne située sous les KTs) de ses substrats (protéines du KT). Il en résulterait leur déphosphorylation par PP1 (Protéine Phosphatase 1) et la stabilisation de l'attachement (Liu *et al.*, 2010; Maresca *et al.*, 2009; Maresca et Salmon, 2010; Nezi et Musacchio, 2009) (**Figure 26**). Ceci constituerait un premier signal d'activation du SAC. Par conséquent, Aurora B serait en amont du SAC. A noter, que dans cette activité de bi-orientation du chromosome, la cohésine semble également jouer un rôle très important (Sakuno *et al.*, 2009).

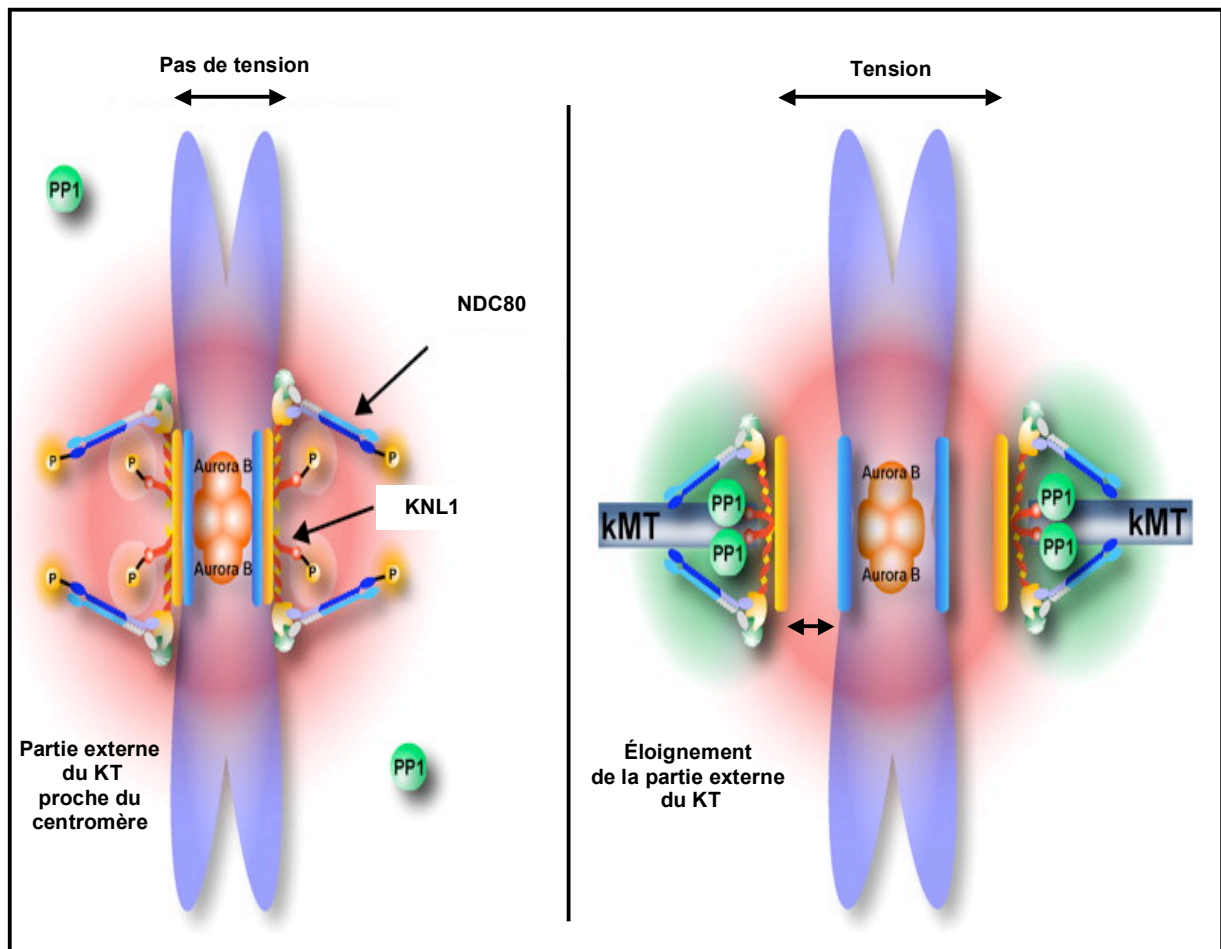


Figure 26 : Modèle de « mesure » de tension au centromère

Dans le cas d'une tension faible entre les deux KT's (schéma de gauche), Aurora B peut phosphoryler KNL1 et NDC80 réduisant ainsi l'interaction avec PP1 et l'interaction MT/KT.

Dans le cas d'une tension élevée entre les deux KT's (schéma de droite), l'élasticité du centromère permettrait l'éloignement physique entre Aurora B et ses substrats. Ainsi, la liaison MT/KT se consoliderait progressivement à mesure que KNL1 et NDC80 se déphosphoryleraient (d'après Liu *et al.*, 2010).

Au niveau de KT's libres, les protéines du SAC s'assemblent dans un ordre bien défini, indiquant l'importance des interactions entre ces différents partenaires. Afin de mettre en place ces protéines, le complexe Ndc80 du KT a été proposé comme la source du signal du point de contrôle : il serait le point de recrutement des différents facteurs. Par la suite, la kinase MPS1, elle aussi localisée au niveau des KT's, va favoriser la formation de deux complexes en permettant la dissociation des protéines Mad1 et Mad2 : d'une part Mad1-Bub1-Bub3 et d'autre part le complexe inhibiteur Mitotic Checkpoint Complex (MCC) comprenant BubR1-Bub3-Mad2 qui séquestre la protéine cdc20. Au final, Cdc20 ne peut pas activer l'APC/C, la sécurine n'est pas ubiquitinylée et la séparase reste donc inactive. En revanche, le recrutement des protéines du SAC au niveau d'un KT cesse dès que celui-ci s'associe de façon stable avec les MT's du fuseau

(Figure 27). Ainsi, lorsque l'attachement amphitélétique de tous les chromosomes est achevé, le SAC n'est plus actif, l'inhibition de l'APC/C est levée et l'anaphase est déclenchée.

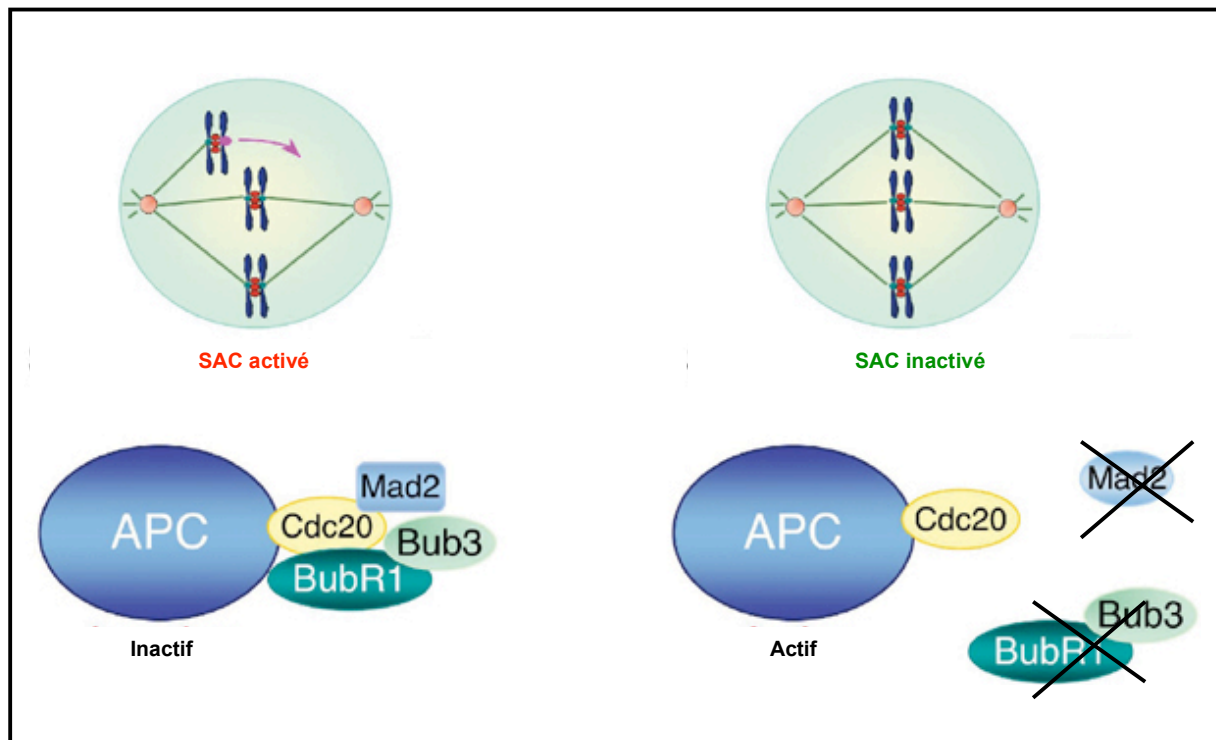


Figure 27 : Mécanisme de la voie de signalisation du point de contrôle du fuseau mitotique

Pendant la mitose, tant qu'un seul KT n'est pas correctement attaché au fuseau, le SAC maintient l'inhibition d'APC/C par le complexe inhibiteur Mad2/Bub3/BubR1. Une fois tous les chromosomes correctement alignés, le complexe inhibiteur est dissolu, l'inhibition levée et le complexe APC/C/Cdc20 va alors permettre la séparation des chromatides sœurs et la sortie de mitose (d'après Bharadwaj et Yu, 2004).

LA COHESION DES CHROMATIDES SŒURS

L'alignement des chromosomes pendant la métaphase ne dépend pas seulement des forces exercées par les MTs sur les KT's, mais aussi de l'opposition à ces forces dues à la cohésion entre chromatides sœurs, notamment au niveau du centromère. Ainsi, cette cohésion permet de générer une tension qui stabilise les attachements corrects des chromatides sœurs en résistant aux forces de tractions des MT's. Le contrôle de l'attachement correct des chromosomes est donc *in fine* dépendant de la cohésion des chromatides sœurs.

Le complexe de cohésine

La cohésion des chromatides sœurs, depuis leur synthèse en phase S jusqu'à leur séparation en anaphase, a longtemps été attribuée uniquement à l'entremêlement de leur ADN (Cf: Décaténation des centromères). Puis l'étude de minichromosomes circulaires chez la levure a révélé l'existence d'un complexe protéique indispensable à la cohésion de ces minichromosomes en absence de caténations d'ADN. Ce complexe protéique appelé cohésine est essentiel à la ségrégation correcte des chromosomes contrairement aux caténations d'ADN qui ne semblent pas nécessaires (Guacci *et al.*, 1994; Koshland et Hartwell, 1987).

Le complexe multiprotéique de cohésine est composé de 4 sous-unités : SMC1 et SMC3 (Structural Maintenance of Chromosomes), la sous-unité clivable RAD21, également appelée Scc1 (Sister Chromatid Cohesion), et Scc3 (Losada, 2007) (**Figure 28**).

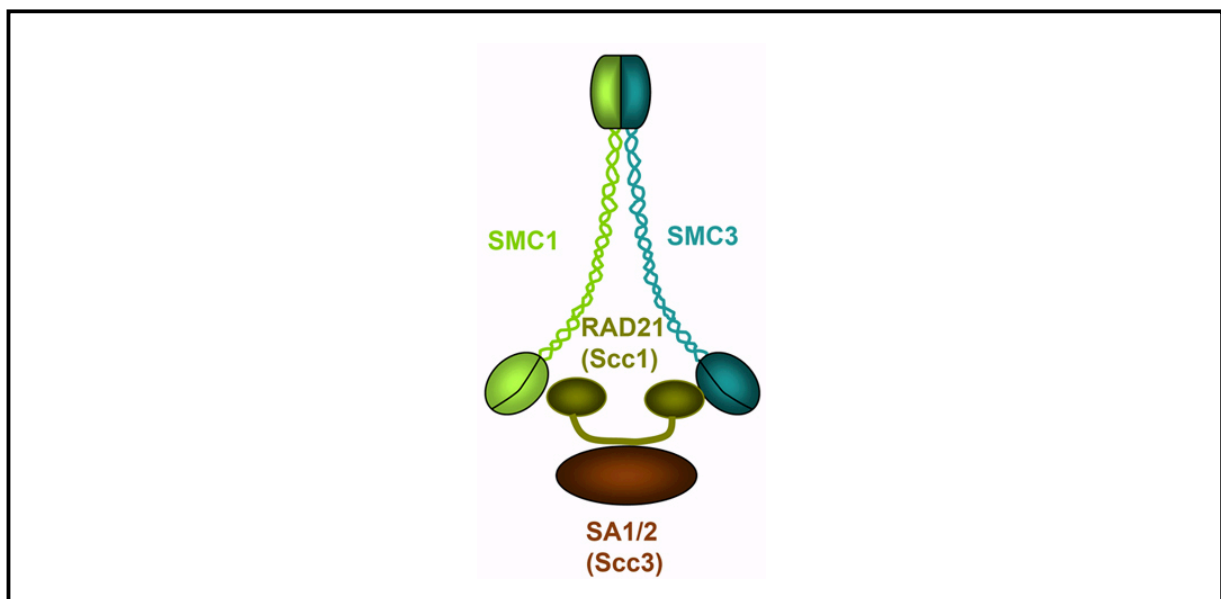


Figure 28 : Le complexe cohésine

Un hétérodimère composé des protéines SMC1 et SMC3 forme la partie centrale de la cohésine qui contient également deux sous-unités non-SMC, les protéines RAD21/Scc1 (sous-unité clivable) et SA/Scc3 (d'après Kitagawa *et al.*, 2009).

Des études biochimiques chez la levure et de microscopie électronique chez l'Homme ont révélé une forme triangulaire de la cohésine. Ainsi, les sous-unités SMC1 et SMC3 formeraient une base ouverte en V et les sous-unités RAD21 et scc3 permettraient la fermeture de cette base (Anderson *et al.* 2002; Haering *et al.* 2002). Ce complexe présente un diamètre interne d'environ 35 nm alors que la fibre de chromatine est de 10 nm. Pour expliquer sa capacité à maintenir deux

molécules d'ADN ensemble, le modèle du « complexe en anneau » est le plus communément admis. Cet anneau encerclerait topologiquement les deux chromatides sœurs (Haering *et al.*, 2002 ; Gruber *et al.* 2003). En effet, l'ouverture de l'anneau par clivage détruit l'association avec la chromatine, et réciproquement, le clivage de l'ADN libère les cohésines de la chromatine. Ceci semble indiquer une interaction topologique plutôt que physique. Ce modèle suggère également que la cohésine possède une très grande mobilité quand elle est associée à la chromatine. Le modèle alternatif repose sur le principe qu'un complexe de cohésine n'encerclerait qu'une seule molécule d'ADN et interagirait avec un autre complexe de cohésine permettant ainsi le maintien de deux molécules d'ADN ensemble (Anderson *et al.*, 2002; Guacci, 2007; Huang *et al.*, 2005). D'autres modèles ont également été proposés associant les cohésines et l'ADN de différentes manières (Huang *et al.* 2005). Bien que la fonction la plus connue des cohésines soit de maintenir associées les chromatides sœurs depuis leur synthèse lors de la réplication jusqu'à leur séparation pendant la mitose, les cohésines auraient d'autres fonctions dans la réparation des dommages à l'ADN ou le contrôle de l'expression génique (Feeney *et al.*, 2010).

Régulation de la cohésion

Lors de la mitose, l'élimination de la cohésion est nécessaire pour la ségrégation correcte des chromosomes. Chez la levure, cette élimination est réalisée en une seule étape, à la transition métaphase-anaphase (Ciosk *et al.*, 1998; Funabiki *et al.*, 1996). Chez les vertébrés, le mécanisme permettant de retirer la cohésine des chromosomes se fait en deux temps (**Figure 29**).

La première étape est réalisée dès l'entrée en mitose par le PDP (Prophase Dissolution Pathway) qui dissocie des bras des chromosomes les cohésines préalablement phosphorylées par des kinases de la famille Plk et Aurora (Losada *et al.*, 2002; Waizenegger *et al.*, 2000). Il a été proposé que la dissociation des cohésines des bras des chromosomes avant la transition métaphase-anaphase facilite leur décaténation par la Topo II en pré-métaphase et métaphase et contribue ainsi à la synchronie de leur disjonction en anaphase. En outre, le PDP présente également l'avantage de libérer un pool considérable de cohésines sans la cliver ni la dégrader (Waizenegger *et al.*, 2000). Une grande partie de ce pool peut donc se réassocier aux chromosomes dès le cycle suivant. En début de pré-métaphase, il ne persiste donc que les cohésines des régions centromériques vraisemblablement protégées par une protéine appelée Shugoshine (Watanabe, 2005). Il a été montré que la Shugoshine est associée aux centromères aussi bien dans des cellules mitotiques que dans des cellules méiotiques chez la levure (Katis *et al.*, 2004; Kitajima *et al.*, 2004), chez la drosophile (Kerrebrock *et al.*, 1992) et chez l'Homme (McGuinness *et al.*, 2005). De façon

remarquable, la déplétion de la Shugoshine par RNAi (interférence par ARN) dans des cellules HeLa provoque une perte de la cohésion des chromatides soeurs une fois que les chromosomes se sont alignés sur la plaque équatoriale, mais avant que l'anaphase n'ait été initiée par la voie de l'APC/C et de la séparase (McGuinness *et al.*, 2005). Dans ces conditions, les cohésines sont absentes des centromères, les chromosomes sont alors sous la forme de chromatides uniques et quittent la plaque équatoriale.

La seconde étape est réalisée lors de la transition métaphase-anaphase, où les cohésines centromériques sont clivées par la séparase pour déclencher l'anaphase (Hauf *et al.*, 2001; Nakajima *et al.*, 2007; Uhlmann *et al.*, 2000). Ces deux processus impliquent des mécanismes différents ainsi qu'une régulation temporelle distincte, étant donné que le PDP n'implique pas le clivage de la cohésine par la séparase (Sumara *et al.*, 2000).

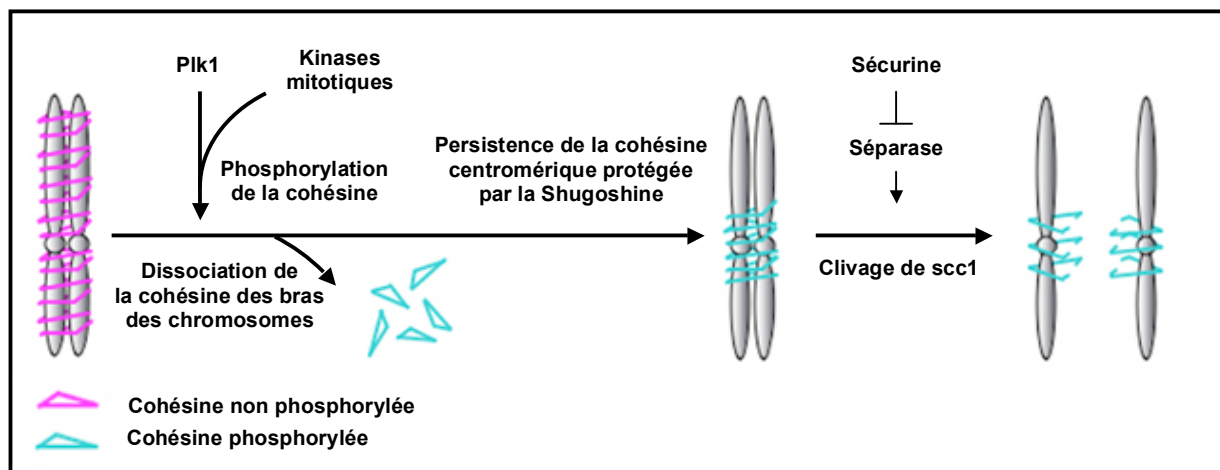


Figure 29 : Régulation du retrait de la cohésine chez les vertébrés

En début de mitose, les chromatides sœurs sont maintenues entre elles par la cohésine. La phosphorylation de celle-ci par certaines kinases dont PIK1 permet sa dissociation des bras des chromosomes. Les cohésines situées au niveau du centromère sont protégées par la présence de la Shugoshine. Durant la transition métaphase-anaphase, la destruction de la sécurine par le complexe APC/C/Cdc20 permet à la séparase de cliver la sous-unité Scc1 provoquant ainsi la séparation complète des chromatides sœurs (d'après Lee *et al.*, 2005).

La cartographie des sites de fixation de la cohésine chez *S. cerevisiae* révèle un enrichissement de la cohésine sur une région de 50 kb autour des éléments centromériques CDE I, II et III. (Blat et Kleckner 1999; Megee *et al.* 1999). En outre, cet enrichissement est dépendant de la présence d'un KT fonctionnel (Weber *et al.* 2004). Bien que de telles études n'aient pas encore été menées dans d'autres organismes que la levure, il semblerait que les régions centromériques ne soient donc pas seulement des loci favorables à l'assemblage du KT, mais pourrait également présenter un environnement favorable pour la fixation de la cohésine.

Le métabolisme de l'ADN centromérique

Sur les 3,3 milliards de paires de bases du génome humain, seul 1,5% sert de support pour la synthèse protéique. L'absence de transcription ou de traduction des 98,5% restants (3,25 milliards de paires de bases) a longtemps incité certains scientifiques à les considérer comme de « l'ADN poubelle » inutile ou obsolète pour la cellule. Or il apparaît depuis quelques années que cet ADN non codant, et en particulier l'ADN centromérique, peut être transcrit et qu'il revêt une extrême importance fonctionnelle pour la cellule.

LA TRANSCRIPTION DES SEQUENCES CENTROMERIQUES

L'étude des transcrits centromériques et péri-centromériques a pris un essor considérable avec la découverte des mécanismes d'ARNi chez *S.pombe*. Ce mécanisme, très bien conservé au cours de l'évolution, a tout d'abord été décrit comme un mécanisme de répression post transcriptionnelle des gènes (Fire *et al.*, 1998), impliquant l'intervention d'ARN double-brins dans la destruction d'ARNm cibles. Mais depuis, d'autres fonctions lui ont été attribuées. Ainsi, il a été identifié chez *S. pombe* des ARNs impliqués dans l'établissement et la maintenance de l'hétérochromatine péri-centromérique (Hall *et al.*, 2002; Volpe *et al.*, 2002), elle-même requise pour l'assemblage *de novo* de CENP-A sur les centromères (Folco *et al.*, 2008). Il s'agit de petits ARNs double-brins produits par la machinerie ARNi. De manière surprenante, ces ARNs proviennent de la transcription des régions péri-centromériques. Or ces régions, tout comme les régions centromériques, ont longtemps été considérées comme transcriptionnellement inactives (Grewal et Elgin, 2007). La conservation de l'organisation de ces régions au cours de l'évolution a tout de suite poussé les scientifiques à rechercher l'existence et la nécessité de tels ARNs chez les eucaryotes supérieurs.

Expression des transcrits centromériques

Les gènes présents au niveau d'un centromère actif, incluant les néocentromères (centromères ectopiques), les centromères endogènes et les centromères présents sur les chromosomes artificiels humain peuvent être transcrits. La présence de l'histone CENP-A n'inhibe pas la transcription. En effet, l'étude de chromosomes artificiels humains contenant des séquences α -

satellites entrecoupées de séquences non-centromériques a permis de déterminer que CENP-A était capable de s'associer aussi bien avec des séquences α -satellites que des séquences non-centromériques contenant des régions transcriptionnellement actives (Lam *et al.*, 2006). De même, l'étude de néocentromères présents au niveau de rétrotransposons L1 indique que non seulement la transcription de ces séquences n'est pas inhibée mais que les transcrits qui en sont issus sont requis pour le maintien de l'intégrité du néocentromère (Chueh *et al.*, 2009). Il semblerait que cette transcription au niveau de néocentromères soit possible du fait de la présence de « poches » d'hypométhylation (Wong *et al.*, 2006). La transcription des régions centromériques a été observée chez les plantes, la souris et l'Homme (Bouzinba-Segard *et al.*, 2006; Lam *et al.*, 2006; May *et al.*, 2005; Topp *et al.*, 2004).

L'étude de la transcription des séquences centromériques est particulièrement délicate car elle est extrêmement dépendante du contexte biologique. Ainsi chez la souris, la transcription des régions centromériques est régulée en fonction du stade embryonnaire et lors de la différenciation cellulaire (Rudert *et al.*, 1995). Des ARNs murins aux fonctions inconnues issus des centromères ont été observés au cours de la différenciation des cellules musculaires (Bouzinba-Segard *et al.*, 2006; Terranova *et al.*, 2005). La phase du cycle cellulaire dans laquelle se trouve la cellule détermine également le statut de la transcription des régions centromériques. Les ARNs de centromères murins sont à peine détectables en phase G1 et présentent une forte accumulation en phase G2/M (Ferri *et al.*, 2009).

Rôles des transcrits centromériques

Comme il vient de l'être indiqué, les ARN centromériques semblent impliqués dans le processus de différenciation cellulaire. Cependant d'autres pistes concernant leur fonction sont privilégiées. Ainsi, de récentes données mettent en lien ces transcrits avec le maintien de l'intégrité du centromère.

D'une part, les transcrits centromériques jouent un rôle dans le recrutement des protéines du centromère et/ou dans le remodelage de la chromatine centromérique. Il a notamment été montré que la protéine CENP-C s'associe à des ARN centromériques et que cela est nécessaire pour son recrutement aux centromères (Du *et al.*, 2010; Wong *et al.*, 2007).

D'autre part, les transcrits centromériques sont également impliqués dans le recrutement des protéines du complexe CPP ainsi que dans la potentialisation de l'activité kinase d'Aurora B. Dans la plupart des organismes, le complexe CPP est composé de la protéine kinase Aurora B

(Terada *et al.*, 1998) et de trois sous-unités non-enzymatiques appelées INCENP (Cooke *et al.*, 1987; Adams *et al.*, 2000), Survivine et Borealine (également appelée Dasra-B) (Honda *et al.*, 2003; Sampath *et al.*, 2004; Gassmann *et al.*, 2004; Klein *et al.*, 2006). Ces trois sous-unités ont pour fonction de cibler Aurora B au centromère et de contrôler son activité kinase ainsi que sa stabilité. Ce complexe joue plusieurs rôles essentiels dans le processus mitotique et a ainsi été qualifié de « chef d'orchestre » de la mitose (Ruchaud *et al.*, 2007). Le complexe CPP est notamment responsable du contrôle de l'attachement correct des chromosomes, de la régulation de la cohésion entre chromatides sœurs et du contrôle de la cytokinèse (Ruchaud *et al.*, 2007). Il a été montré que l'accumulation forcée, ou en réponse à un stress, de certains transcrits centromériques murins conduit à des anomalies de ségrégation des chromosomes, à la perte de cohésion des chromatides sœurs, et à l'aneuploïdie. Ces anomalies seraient dues à la perte de certaines modifications épigénétiques ainsi qu'à la délocalisation des protéines Aurora B et HP1 (Bouzinba-Segard *et al.*, 2006). Il a également été montré que les transcrits centromériques murins sont des composants à part entière de la chromatine centromérique et qu'ils s'associent avec Aurora B et Survivine. L'association de ces transcrits avec Aurora B potentialise fortement son activité kinase (Ferri *et al.*, 2009). Chez l'Homme, les transcrits centromériques sont nécessaires pour que les protéines Survivine et INCENP soient recrutées aux centromères pendant la mitose (Wong *et al.*, 2007). Par conséquent, chez la souris et l'Homme ces transcrits semblent être intimement liés au processus mitotique de par leur interaction avec le complexe CPP.

LA DECATENATION DES CENTROMERES

"Since the two chains in our model are intertwined, it is essential for them to untwist if they are to separate (...) Although it is difficult at the moment to see how these processes occur without everything getting tangled, we do not feel that this objection will be insuperable." (Watson et Crick, 1953)

À la suite de leur fameux article proposant une structure en double-hélice pour l'ADN, Watson et Crick exposent les prémices d'un modèle de réplication semi-conservatif de l'ADN. Ce modèle a conduit la communauté scientifique de l'époque à immédiatement envisager la formation de contraintes topologiques au niveau de l'ADN lors de sa réplication (Delbruck, 1954).

Ces contraintes se traduisent par la formation de supertours positifs d'ADN devant la fourche de réplication. Ces supertours sont alors supprimés par l'action des Topo I et II chez les eucaryotes (Wang, 2002). Cependant, les topoisomérases sont parfois incapables de supprimer ces tensions,

notamment durant la terminaison de la réplication. Il semblerait alors que la fourche de réplication pivote pour détendre l'ADN devant elle au détriment de la formation d'entremêlements d'ADN derrière elle (**Figure 30**) (Peter *et al.*, 1998). Ces entremêlements, appelés caténations, se forment donc entre les deux molécules d'ADN des chromatides soeurs et sont la conséquence directe de la réplication de l'ADN (Sundin et Varshavsky, 1980; Sundin et Varshavsky, 1981). Dans tous les organismes étudiés, il a été montré que la fonction principale de la Topo II, est de supprimer ces caténanes d'ADN postréplicatifs afin d'individualiser les deux chromatides sœurs avant que la cellule n'achève sa division cellulaire.

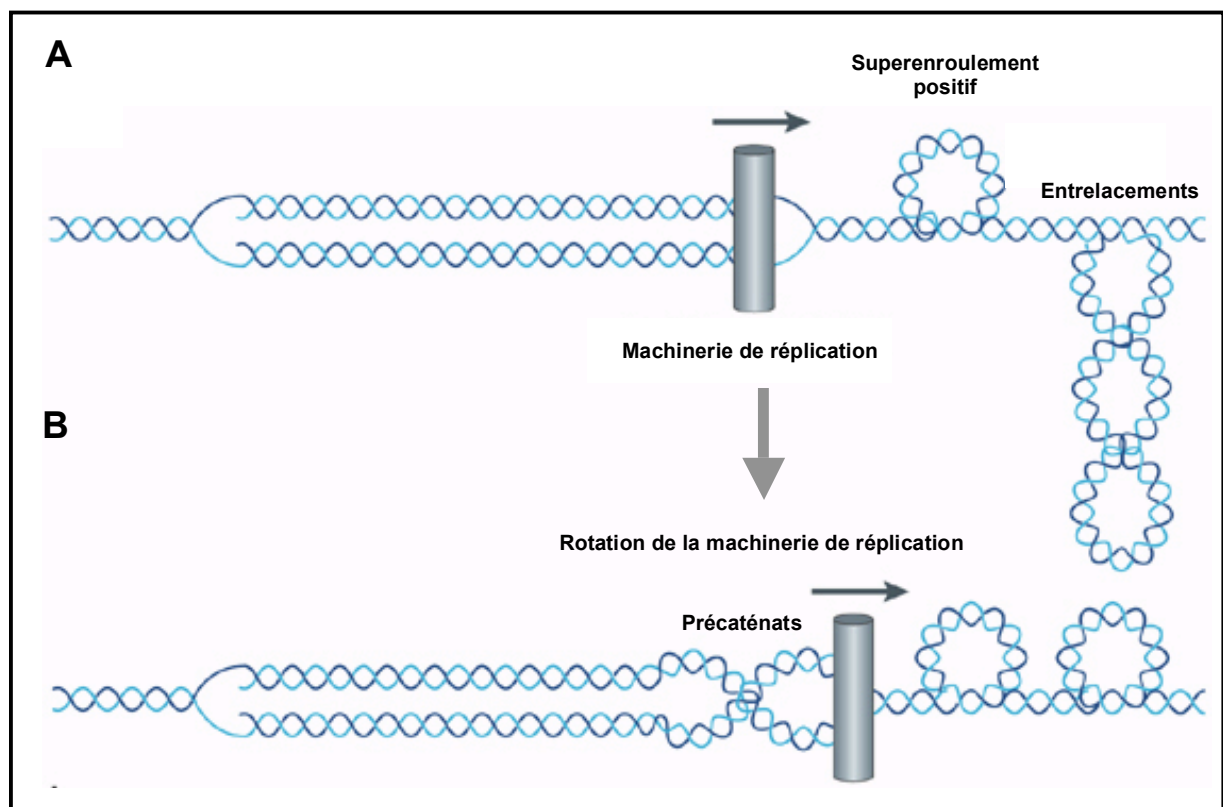


Figure 30 : Rôle de la Topo II lors de la réplication

Durant la réplication, l'activité des hélicases sur l'ADN aboutit à la création de superenroulements positifs au devant de la fourche de réplication. Ces structures peuvent alors s'isomériser et former des entrelacements. Dans le cas où ces supertours et entrelacements ne peuvent être supprimés par l'action des Topo I et II, la fourche de réplication pivote pour détendre l'ADN devant elle. Cela aboutit alors à la formation d'entremêlements d'ADN derrière elle appelés précaténanes (Nitiss *et al.*, 2009).

Le rôle fondamental de la Topo II

La Topo II est la seule enzyme de type II chez les eucaryotes et possède donc un mécanisme d'action unique. Deux isoformes existent: α et β . Elle a la capacité de former ou de supprimer des super-enroulements, des noeuds et des caténations d'ADN (**Figure 31**), ce qui est essentiel dans de nombreux processus impliqués dans le métabolisme de l'ADN comme la réplication, la transcription, la recombinaison et la décaténation. L'activité de la Topo II est également nécessaire pour la condensation des chromosomes (Nitiss *et al.*, 2009).

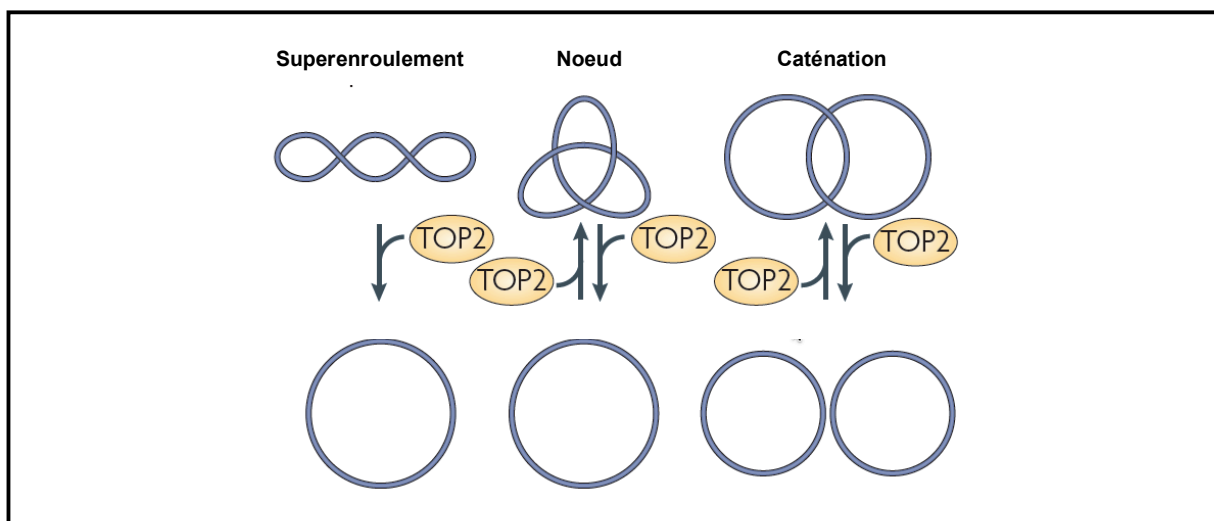


Figure 31 : Substrats de la Topo II

La Topo II est capable de résoudre trois types de structures d'ADN de natures topologiques différentes: les superenroulements, les nœuds et les caténations. Exception faite des superenroulements, la Topo II est capable de catalyser la conversion dans un sens et dans l'autre: nouer/dénouer et caténer/décaténer (Yanagida, 2009).

Le cycle enzymatique de la Topo II est partiellement connu, grâce notamment à la résolution de sa structure (Berger *et al.*, 1996) et à des études basées sur l'utilisation d'analogues non-hydrolysables de l'ATP, ou la décaténation de cercles d'ADN radiomarqués (Roca *et al.*, 1996; Roca *et al.*, 1994; Roca and Wang, 1992). Le fonctionnement de l'enzyme repose sur le modèle communément appelé "two gates model". Dans ce modèle, le cycle catalytique que la Topo II effectue lors du passage d'un ADNdb au travers d'un autre ADNdb peut être décomposé en quatre étapes (**Figure 32**).

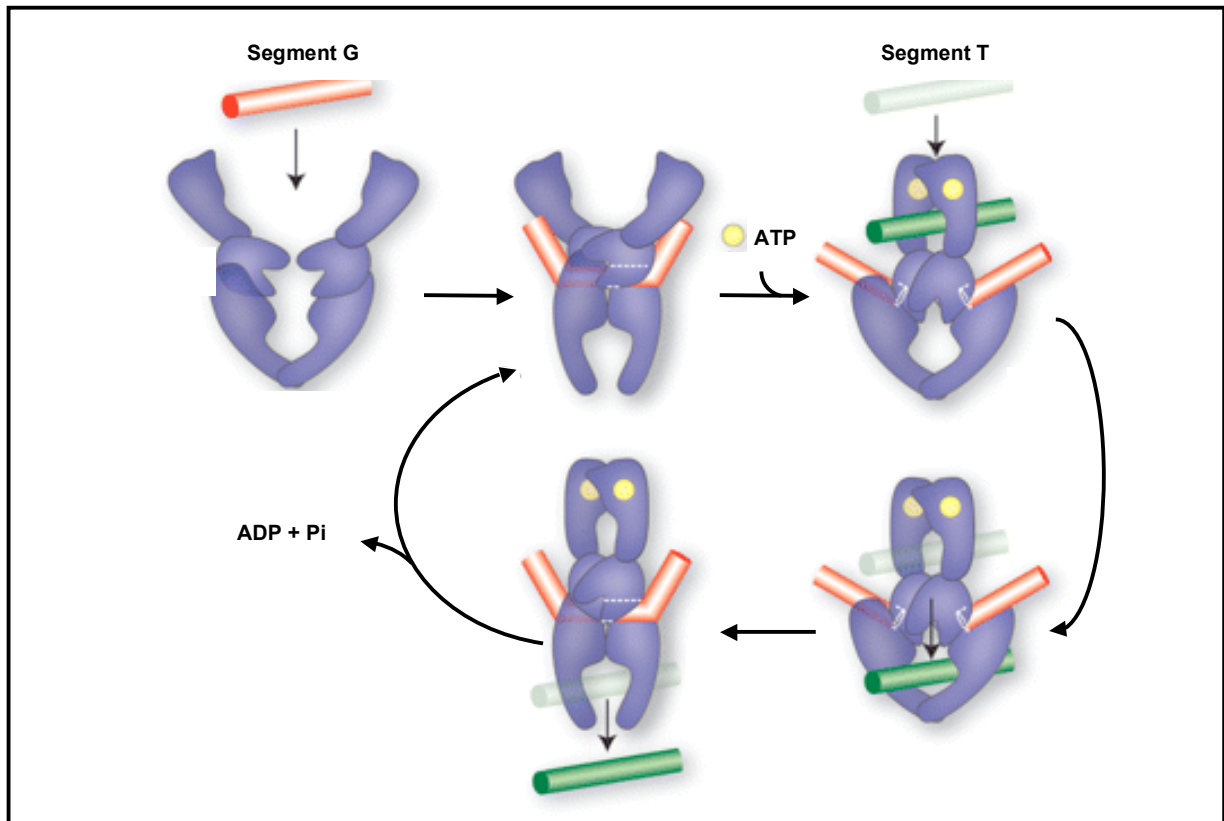


Figure 32 : Cycle catalytique de la Topo II

Etape 1 : La Topo II débute son cycle catalytique en se liant de façon non-covalente à un ADNdb appelé segment G (Gate). A la suite de l'interaction avec le segment G, l'enzyme se trouve dans une conformation présentant une cavité qui peut alors interagir avec un deuxième ADNdb appelé segment T (Transport).

Etape 2 : Après l'interaction avec le segment T, la Topo II effectue une coupure double-brins transitoire dans le segment G. Ainsi l'enzyme se trouve liée de façon covalente à l'extrémité 5' du brin qu'elle a clivé. Ce complexe covalent ADN/enzyme est appelé « complexe clivable ».

Etape 3 : La fixation et l'hydrolyse d'une molécule d'ATP par la Topo II entraîne une modification de conformation de l'enzyme, qui déclenche la migration du segment T au travers de la coupure du segment G. Ensuite les deux extrémités du segment G sont rapprochées et reliées. Ceci cause la réduction de l'espace disponible dans la cavité dans laquelle le duplexe T est accueilli et entraîne ainsi sa sortie.

Etape 4 : L'hydrolyse d'une deuxième molécule d'ATP en ADP et en phosphate inorganique (Pi) est indispensable pour permettre le recyclage de l'enzyme. Ce processus permet à la Topo II de retrouver sa capacité à s'engager dans un nouveau cycle catalytique.

(d'après Collins *et al.*, 2009)

Si la Topo II a la capacité de séparer deux molécules d'ADN en les décaténant, elle peut également les « emmêler » en les caténant. Il semblerait que la topologie de l'ADN donne une directionnalité à cette réaction. Plusieurs modèles différents expliquent pourquoi les topoisomérases préfèrent démêler l'ADN plutôt que le contraire et il est probable que plusieurs mécanismes composent la solution. Ainsi, une topoisomérase se lie préférentiellement à l'ADN lorsqu'il est accroché à une seconde double hélice à cause de la courbure adoptée (Buck et

Zechiedrich, 2004). Il est possible également que la liaison de la topoisomérase à l'ADN modifie elle-même la courbure qu'adopte l'ADN afin de favoriser la prise d'un segment-T dans une molécule emmêlée (Vologodskii *et al.*, 2001). Ensuite, il est envisageable que le substrat favori de la topoisomérase se retrouve plus souvent dans une molécule surenroulée plutôt que relaxée, ce qui ferait qu'en somme, les topoisomérases vont agir plus fréquemment pour défaire des noeuds plutôt que l'inverse (Zechiedrich et Osheroff, 1990). Enfin, une étude de mouvement de polymères simulant des chromosomes dans une cellule a déterminé que ceux-ci vont se repousser de manière spontanée (Jun et Mulder, 2006) et cette théorie pourrait donc expliquer pourquoi l'action de décaténation est favorisée.

La décaténation des centromères

L'activité de décaténation de la Topo II est essentielle pour la dynamique des chromosomes en mitose que ce soit chez la levure ou les mammifères. Son absence ou son inhibition conduit notamment à des anomalies d'individualisation des chromosomes (Gimenez-Abian *et al.*, 2000), des anomalies de disjonction des bras des chromosomes (Gimenez-Abian *et al.*, 1995) et des anomalies de disjonction des chromatides sœurs pendant l'anaphase (Clarke *et al.*, 1993; Holm *et al.*, 1985; Holm *et al.*, 1989; Sakaguchi et Kikuchi, 2004; Uemura *et al.*, 1987; Uemura et Yanagida, 1984). Il est donc essentiel pour la cellule de pouvoir résoudre les caténations d'ADN reliant les deux chromatides sœurs ensemble afin qu'elles n'interfèrent pas avec le processus de ségrégation des chromosomes.

La plupart des caténations sont retirées durant les phases S et G2 du cycle cellulaire (Koshland *et al.*, 1987; Ishimi *et al.* 1992; Ishida *et al.* 1991), cependant une population importante de caténations persistent durant la mitose. Ainsi il a été démontré que l'injection d'ICRF-193, un inhibiteur de la Topo II, dans des cellules embryonnaires de drosophile en début de mitose, conduit à des anomalies de disjonction des chromatides sœurs pendant l'anaphase (Oliveira *et al.*, 2010; Buchenau *et al.*, 1993). De plus, chez la levure, les forces du fuseau mitotique ainsi que la sous-unité SMC2 de la condensine sont nécessaires à la décaténation complète des chromosomes par Topo II lors de la mitose (Holm *et al.*, 1985; Uemura *et al.*, 1987; Baxter *et al.*, 2011). Ceci indique que la décaténation des chromatides sœurs ne s'achève qu'au cours de la mitose.

Les anomalies mitotiques observées en absence d'une Topo II fonctionnelle sont dues au fait que les caténations sont capables de maintenir une association entre les chromatides sœurs, ce qui pourrait également expliquer la raison du maintien d'une partie de celle-ci jusqu'en mitose notamment afin de suppléer la cohésine (**Figure 33**). Ainsi, la déficiente en Top2 chez *S pombe*

conduit au phénotype cut (cells untimely torn) (Holm *et al.*, 1985; Uemura *et al.*, 1987). Dans des cellules de mammifère, l'absence d'une Topo II fonctionnelle conduit également au maintien de la cohésion entre chromatides sœurs et ce en absence de cohésine (Diaz-Martinez *et al.*, 2006; Toyoda and Yanagida, 2006; Vagnarelli *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2010). La suppression coordonnée de la cohésine et des caténations contribuait donc à la régulation de la disjonction des chromatides sœurs durant l'anaphase (Diaz-Martinez *et al.*, 2006; Kenney and Heald, 2006; Toyoda and Yanagida, 2006; Yanagida, 2009).

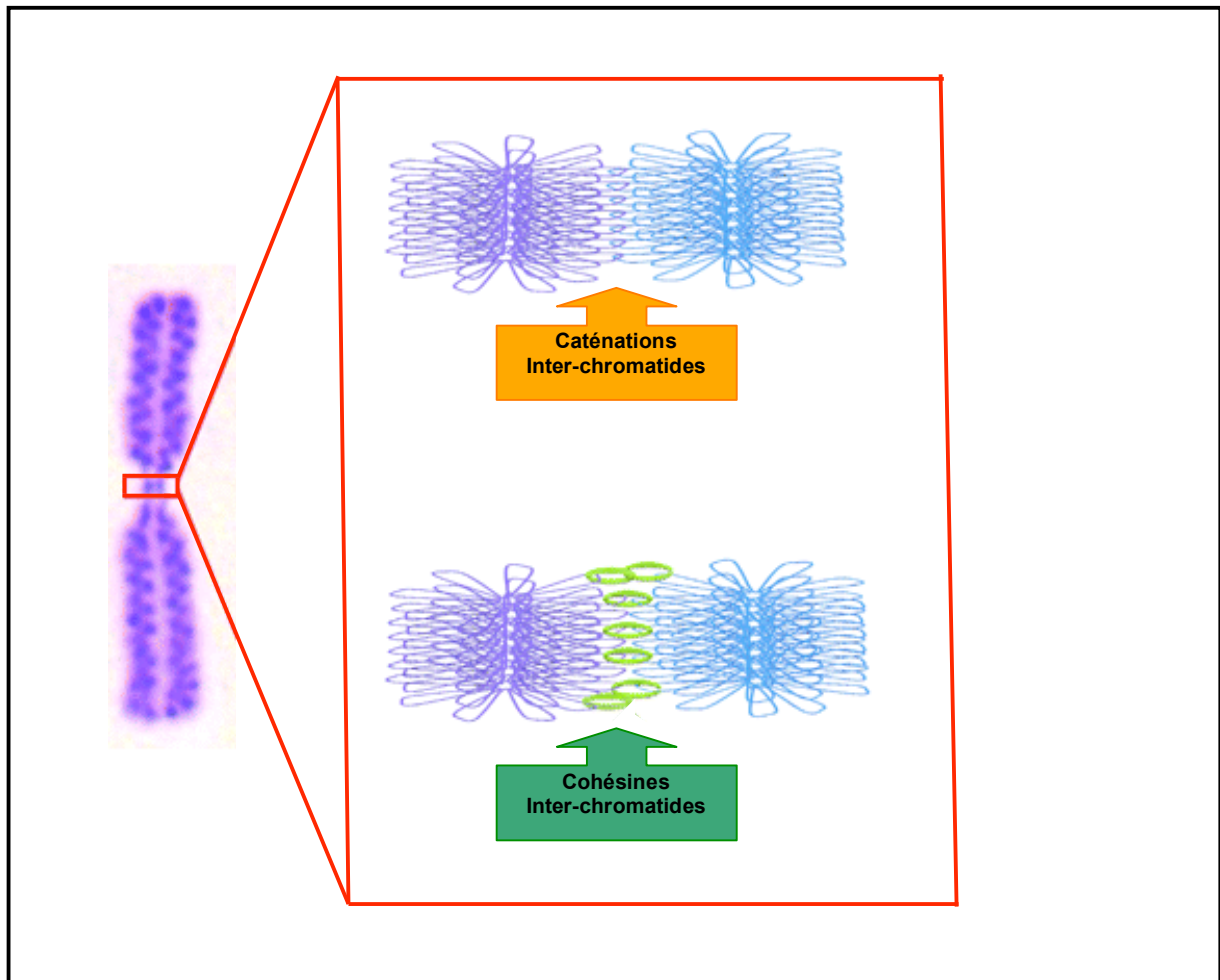


Figure 33 : Mécanisme de cohésion entre deux chromatides sœurs

La cohésion entre deux chromatides sœurs est le résultat de la coopération entre deux mécanismes de cohésion: les caténations d'ADN (schéma du haut) et la cohésine (schéma du bas). La contribution de chacun peut dépendre de nombreux facteurs tels que l'espacement des caténations et des sites de fixation de la cohésine, la structure de la chromatine et la réplication de l'ADN (d'après Diaz-Martínez *et al.*, 2009).

La Topo II α est un composant majeur des chromosomes mitotiques (Hart et Laemmli, 1998). Dans un grand nombre d'espèces, cette enzyme présente une accumulation spécifique au niveau

des centromères durant la mitose où elle y est également plus active que sur le reste du chromosome suggérant l'importance de son activité au niveau de ce locus particulier (**Figure 34**) (Christensen *et al.*, 2002; Gorbsky, 1994; Null *et al.*, 2002; Rattner *et al.*, 1996; Sumner, 1996; Taagepera *et al.*, 1993). Ceci a notamment été renforcé par la découverte de sites majeurs d'activité de clivage de la Topo II au niveau des séquences α -satellites humaines (Floridaia *et al.*, 2000; Spence *et al.*, 2002).

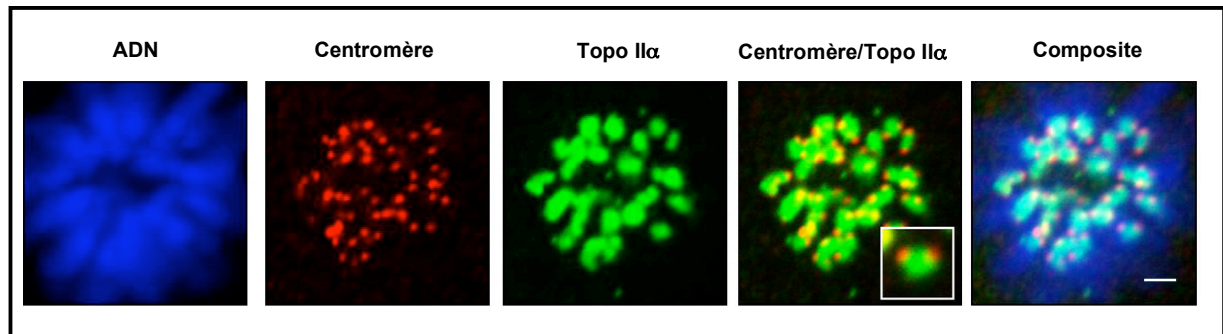


Figure 34 : Localisation préférentielle de la Topo II α aux centromères

L'immunolocalisation de la Topo II α (en vert) dans des cellules de fibroblastes embryonnaires de souris indique un recrutement préférentiel de Topo II α aux centromères. Les centromères sont visualisés en rouge par immunomarquage de protéines CENPs. L'ADN est coloré en bleu. La barre d'échelle représente 10 μ m (d'après Dawlaty *et al.*, 2008).

Par ailleurs, la décaténation au niveau des centromères semble plus complexe que sur les bras. En effet, si les caténations des bras des chromosomes semblent être retirées avant la métaphase (Porter et Farr, 2004), cela n'est pas le cas pour certaines caténations centromériques. La présence de fibres d'ADN, appelé UFBs (Ultra Fine anaphase Bridges), reliant deux centromères situés de part et d'autre de la plaque équatoriale de la cellule lors de l'anaphase a été observée. Ces fibres d'ADN ne peuvent être visualisées par des marquages conventionnels de l'ADN mais seulement par immunomarquage des protéines BLM et PICH (Cf: Présentation du projet de recherche) (**Figure 35**) (Baumann *et al.*, 2007; Chan *et al.*, 2007). La très forte augmentation d'UFBs dans des cellules en réponse à un traitement avec des inhibiteurs de Topo II suggère que ces UFBs soient composés de caténations d'ADN résiduelles (Baumann *et al.*, 2007; Chan *et al.*, 2007). Il a été montré que ces caténations ne peuvent être résolues qu'après le clivage de la cohésine expliquant ainsi leur persistance aux centromères jusqu'en anaphase (Wang *et al.*, 2010). La cohésine limiterait de manière stérique l'accès de Topo II à l'ADN. La présence de cohésine pourrait également empêcher les forces du fuseau mitotique de modifier la topologie de l'ADN centromérique ce qui limiterait alors l'activité de décaténation de l'enzyme (Wang *et al.*, 2010).

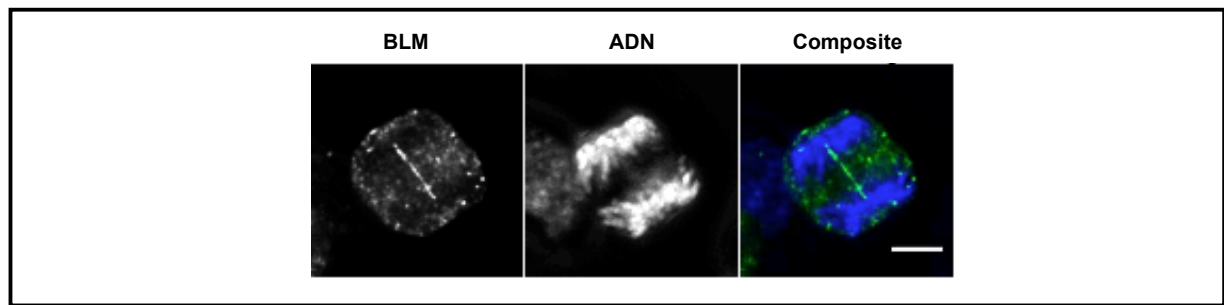


Figure 35 : Localisation d'un UFB en anaphase

L'immunolocalisation de la protéine BLM (en vert) dans des cellules de fibroblastes humains révèle la présence d'UFBs. L'ADN est coloré en bleu. La barre d'échelle représente 5 μm (Rouzeau et al, en cours de soumission).

En outre, il a également été montré que la Topo II est requise pour la disjonction des centromères chez la levure, la drosophile et l'Homme (Bachant *et al.*, 2002; Coelho *et al.*, 2008; Diaz-Martinez *et al.*, 2006). Chez les eucaryotes supérieurs, le statut de sumoylation de Topo II α a été mis en lien étroit avec son rôle dans la disjonction des centromères. Chez le xénope, la SUMO E3-ligase PIASY est nécessaire pour la sumoylation de composants de la partie interne du centromère ainsi que de la Topo II α et son absence dans des extraits d'œufs conduit à des défauts de ségrégation des chromosomes (Azuma *et al.*, 2005). Chez l'Homme, la Topo II α est sumoylée (Azuma *et al.*, 2003) et beaucoup d'arguments sont également en faveur d'un rôle de PIASY dans cette sumoylation (Diaz-Martinez *et al.*, 2006). Il a notamment été montré que la déplétion de PIASY conduit à un arrêt prolongé en métaphase et en l'absence d'enrichissement en Topo II α au niveau des centromères (Diaz-Martinez *et al.*, 2006). Cependant, PIASY n'étant pas létale chez la souris, il est possible que certaines SUMO E3-ligases soient capables de coopérer et de se substituer les une aux autres (Wong *et al.*, 2004). Il a d'ailleurs été démontré chez l'Homme que la SUMO-ligase RanBP2 est également impliquée dans l'enrichissement de la Topo II α aux centromères et essentielle pour la ségrégation correcte des chromosomes (Dawlaty *et al.*, 2008). Il apparaît donc que la sumoylation de la Topo II α est nécessaire pour son enrichissement aux centromères et qu'un défaut de cette modification post-traductionnelle soit responsable de défauts de disjonction des chromatides sœurs (Azuma *et al.*, 2005; Dawlaty *et al.*, 2008; Diaz-Martinez *et al.*, 2006).

PRESENTATION DU PROJET DE RECHERCHE

Contexte : La protéine BLM pendant la mitose

Comme indiqué dans le premier chapitre de ce manuscrit, les fonctions exactes de la protéine BLM sont encore mal définies à ce jour, mais les données de la littérature convergent toutes vers un rôle potentiel de BLM dans des mécanismes de surveillance et/ou maintien de l'intégrité du génome. Par ailleurs, la grande majorité de ces données indique que BLM agirait pendant la phase S. Cependant, l'expression de la protéine BLM persiste en phase G2/M, ce qui suggère également une importance particulière de cette protéine pendant ces phases. Cette hypothèse est renforcée par le fait que, dès 1969, une fréquence très élevée d'anomalies mitotiques comme des ponts anaphasiques ainsi que des chromosomes ou fragments de chromosome retardés ont été observées dans les cellules BS (**Figure 36**) (German, 1969).

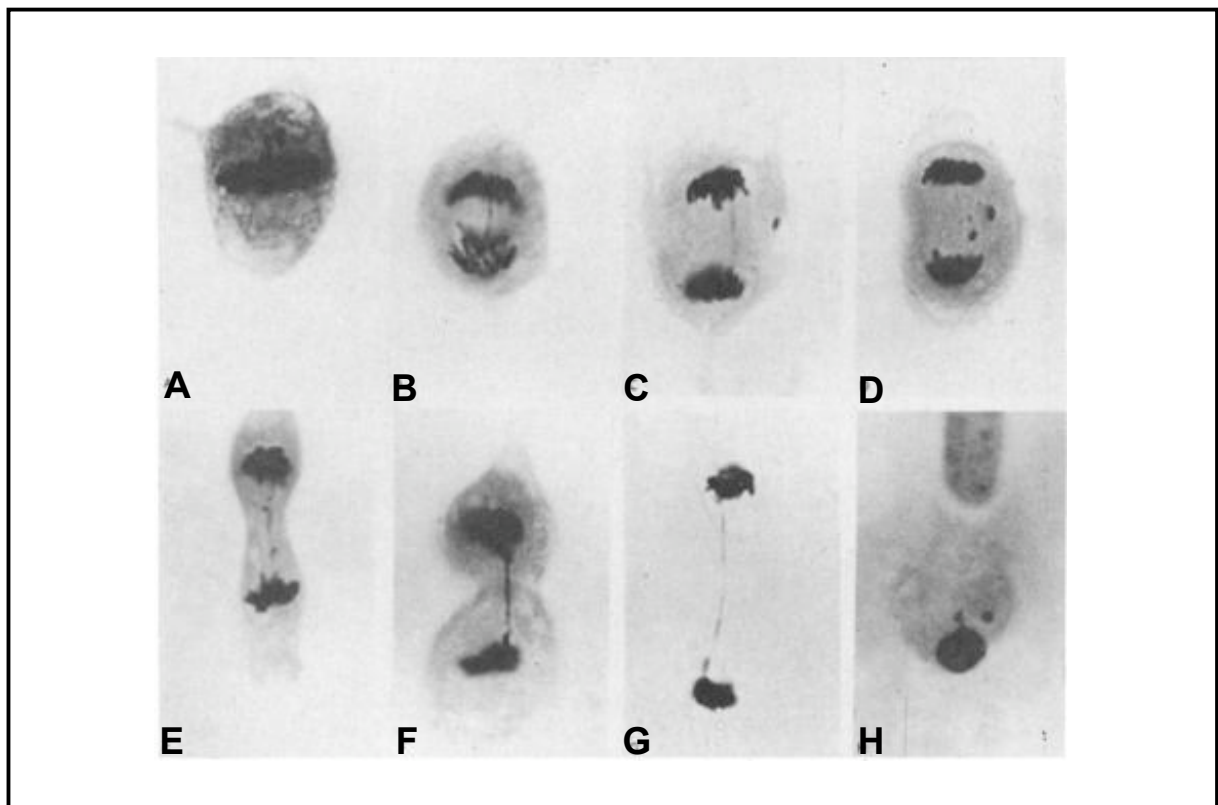


Figure 36 : Illustration des anomalies de mitoses observées dans des cellules dérivées de biopsies de peau de patients BS

Les cellules BS mitotiques se caractérisent principalement par une fréquence élevée de ponts anaphasiques (B, C, F et G) ainsi que de chromosomes ou fragments de chromosomes perdus (C, D et E). Leur non-résolution est la source majeure de formation de micronoyaux (H) (German, 1969). Les ponts anaphasiques et les micronoyaux sont des marqueurs d'instabilité chromosomique qui pourraient participer à la prédisposition au développement de cancers des patients BS.

L'équipe du Dr Amor-Guéret a été pionnière dans la caractérisation de la protéine BLM pendant la mitose. Entre 2000 et 2006, une suite de travaux réalisés au laboratoire a notamment abouti à la découverte de la phosphorylation de BLM par le complexe MPF pendant la mitose ainsi qu'à la proposition d'un premier modèle concernant un rôle potentiel de BLM pendant la mitose (Bayart *et al.*, 2006; Dutertre *et al.*, 2000; Dutertre *et al.*, 2002). Selon ce modèle, BLM est hyperphosphorylée et ainsi exclue de la fraction chromatinienne (Cf: La protéine BLM) afin d'éviter qu'elle n'interfère avec certains processus mitotiques comme la condensation des chromosomes. En présence de structures d'ADN anormales et persistantes au cours de la pré-métaphase, le MPF est momentanément inactivé ce qui provoque alors la déphosphorylation de BLM et son recrutement au niveau de ces structures pour en permettre leur résolution. Le MPF serait ensuite réactivé et BLM rephosphorylée (Bayart *et al.*, 2006) (**Figure 37**). D'autre part, il a été montré par Leng et ses collègues que BLM est également phosphorylée par MPS1 conduisant à une interaction entre BLM et Plk1. La phosphorylation de BLM par MPS1 est essentielle pour la stabilité des chromosomes lors de la mitose et notamment pour le maintien du SAC actif (Leng *et al.*, 2006).

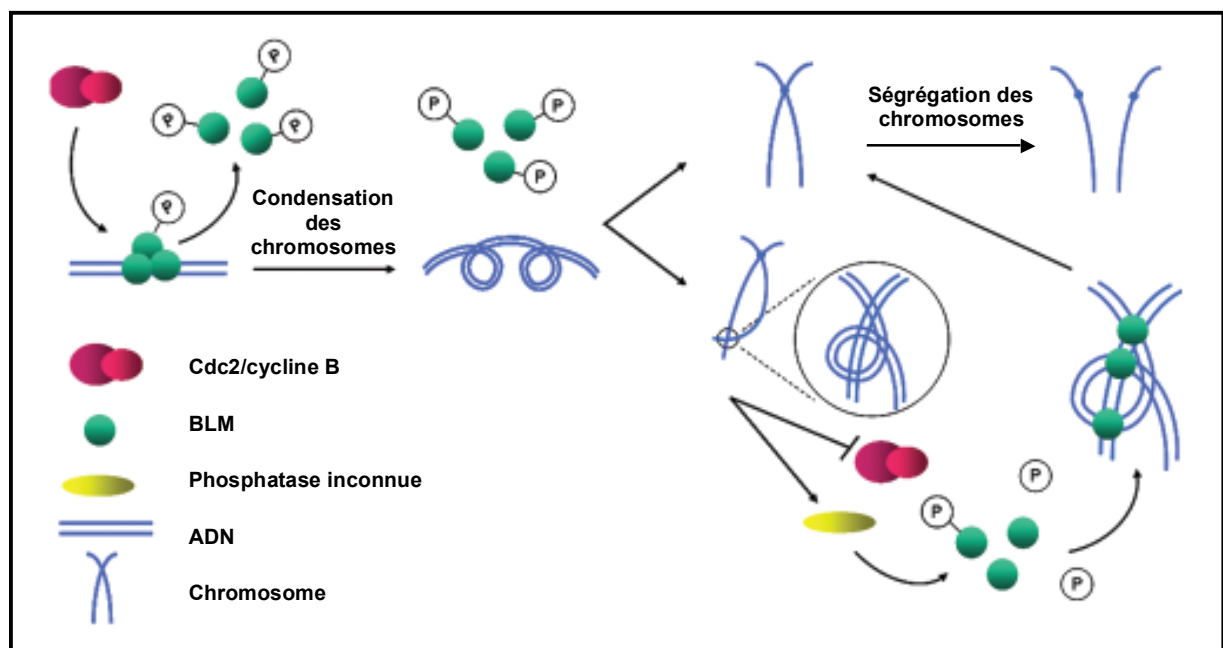


Figure 37 : Modèle de fonction mitotique de BLM pendant la pré-métaphase

L'inactivation de la Cdc2, par un traitement à la roscovitine ou après RIs, conduit à une déphosphorylation massive de BLM et induit sa relocalisation dans la fraction protéique chromatinienne. Ces données indiquent que la Cdc2 contrôle l'exclusion de BLM de la chromatine. Le modèle ci-dessus a alors été proposé : l'activation du complexe Cdc2/cycline B déclenche l'entrée en mitose et provoque la phosphorylation de la protéine BLM, conduisant ainsi à son exclusion de la fraction chromatinienne afin d'éviter d'interférer avec les processus mitotiques, comme la condensation des chromosomes. Si des structures chromosomiques complexes ou des dommages à l'ADN persistent ou apparaissent durant la mitose, la kinase Cdc2 est momentanément inactivée permettant alors l'activation d'une phosphatase encore inconnue qui déphosphorylerait BLM. BLM pourrait ainsi être recrutée au niveau de ces structures pour en permettre la résolution (d'après Bayart *et al.*, 2006).

L'ensemble de ces données suggère donc que pendant la mitose BLM ait un rôle bien plus important qu'initialement suspecté, sans démontrer toutefois les fonctions précises de la protéine mitotique. C'est précisément dans ce cadre que j'ai commencé mon projet de recherche avec pour objectif de déterminer la ou les fonctions que BLM assure pendant la mitose. En 2007, au moment même où je commençais ce projet, une nouvelle étude a apporté de nouveaux éléments en faveur d'un rôle de BLM pendant la mitose. L'analyse de la localisation mitotique de BLM et de ses partenaires Topo III α et RMI1 a révélé la présence de ces protéines sur la grande majorité des ponts anaphasiques ainsi que sur plus de la moitié des chromosomes retardés pouvant apparaître dans des cellules (**Figure 38**) (Chan *et al.*, 2007). De plus, la réexpression de BLM dans des cellules BS permet de diminuer de façon importante le nombre de cellules présentant ces types d'anomalies (Chan *et al.*, 2007; Chan *et al.*, 2009). Ces données suggèrent fortement que BLM est recrutée sur des structures d'ADN anormales composant les ponts anaphasiques, pour en permettre leur résolution au cours de l'anaphase. Ces données sont cohérentes avec l'hypothèse proposée par le laboratoire en 2006 (**Figure 37**) et indiqueraient que la protéine BLM est nécessaire pour la résolution de structures ADN anormales tout au long de la mitose.

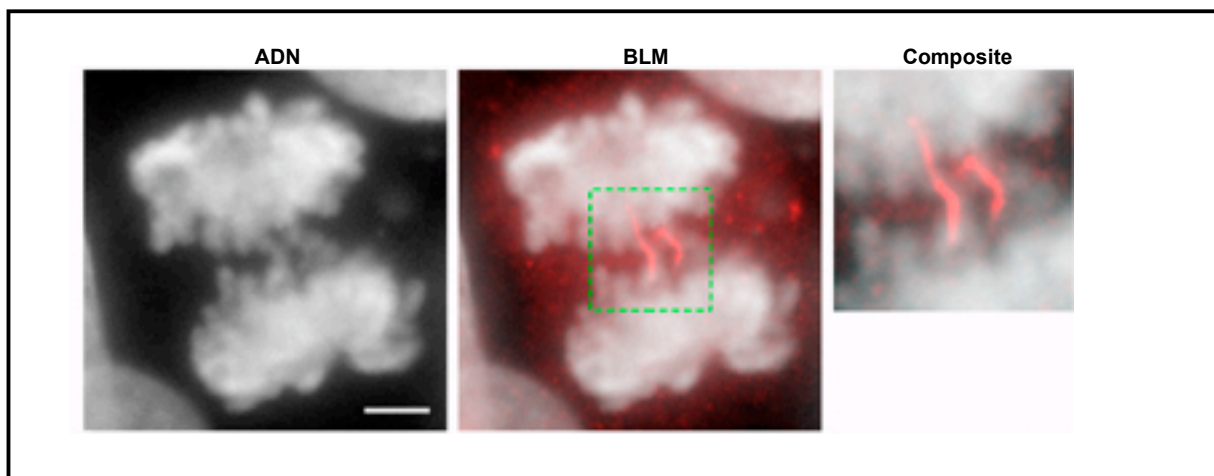


Figure 38 : BLM est recrutée sur les ponts anaphasiques

L'immunolocalisation de la protéine BLM (en rouge) dans des cellules de fibroblastes humains révèle sa présence sur les ponts anaphasiques. L'ADN est coloré en gris. La barre d'échelle représente 5 μ m (d'après Chan *et al.*, 2007).

Cette même étude montre également que BLM et ses partenaires se situent sur un nouveau type de structure mitotique appelé Ultrafine anaphase Bridges (UFBs) (**Figure 35**) (Chan *et al.*, 2007). L'existence de ces structures fut initialement révélée par immunomarquage de la protéine PICH (Plk1-Interacting Checkpoint Helicase) qui est une protéine de la famille des hélicases SNF2

interagissant avec Plk1 et recrutée sur les centromères depuis la pré-métaphase jusqu'à la télophase (Baumann *et al.*, 2007). Les UFBs sont longtemps restés inconnus de la communauté scientifique bien que ces structures soient fréquemment présentes à l'état basal dans quasiment toutes les cellules humaines (Baumann *et al.*, 2007; Chan *et al.*, 2007). Ceci est principalement dû au fait qu'ils sont indétectables avec des agents conventionnels de coloration de l'ADN (Hoechst, YOYO, DAPI, etc.) et ne semblent pas comporter d'histones (Baumann *et al.*, 2007; Chan *et al.*, 2007). Les UFBs sont sensibles à la DNase et peuvent être visualisés par immunomarquage de BrdU après son incorporation dans l'ADN indiquant qu'il s'agit bien de structures ADN.

Les deux protéines colocalisent sur les UFBs, cependant PICH est détectable sur les UFBs dès la métaphase lorsque la chromatine est encore condensée au maximum alors que BLM n'est détectable qu'à partir de l'anaphase. BLM semble donc être recrutée sur des ponts déjà pré-existants au moment du passage en anaphase. Dans des cellules déplétées en PICH, les UFBs ne sont plus détectables par immunomarquage de BLM indiquant que soit PICH est nécessaire pour recruter BLM sur ces structures soit PICH prévient la rupture prématurée des UFBs (Baumann *et al.*, 2007; Chan *et al.*, 2007; Ke *et al.*, 2011). En revanche, les cellules BS présentent une fréquence accrue d'UFBs immunomarkés par PICH, suggérant que BLM est nécessaire pour leur résolution (Chan *et al.*, 2007).

LES UFBs ASSOCIES AUX PROTEINES DE FANCONI

BLM ayant des fonctions potentielles impliquées dans les processus de réplication et réparation de l'ADN, une recherche de protéines impliquées dans ces mêmes processus et pouvant également être localisées sur les UFBs a été réalisée. Celle-ci a révélé une absence de la majorité de ces protéines comme γ H2AX, RAD51, WRN, PML, NBS1 ou MRE11 (Chan *et al.*, 2007). En revanche, les protéines FA semblent être impliquées dans ces structures. Ainsi il a été montré que FANCM est recrutée tardivement, en fin d'anaphase, sur un faible nombre d'UFBs et de manière dépendante de BLM (Vinciguerra *et al.*, 2010). D'autre part, des foyers FANCD2 et FANCI ont été détectés à chaque extrémité de quelques UFBs (**Figure 39**) (Chan *et al.*, 2009). Ces UFBs associés à FANCD2 sont très peu nombreux en condition basale mais sont fortement augmentés après un stress de réplication au moyen d'un traitement à l'APH ce qui suggère que ces UFBs représentent la persistance d'hémicaténanes reliant deux chromatides sœurs composés soit d'intermédiaires de réplication tardifs non répliqués (IRTs) soit d'intermédiaires de recombinaison non-résolus. Cependant, il a été montré au laboratoire que la formation d'UFBs n'est pas dépendante de RAD51, protéine clé de la recombinaison, il est donc fortement probable

qu'il s'agit d'IRTs (Lahkim Bennani-Belhaj *et al.*, 2010). En accord avec cette hypothèse, il a également été montré la présence de RPA et donc d'ADNsb sur certains UFBs associés à FANCD2 (Chan *et al.*, 2009).

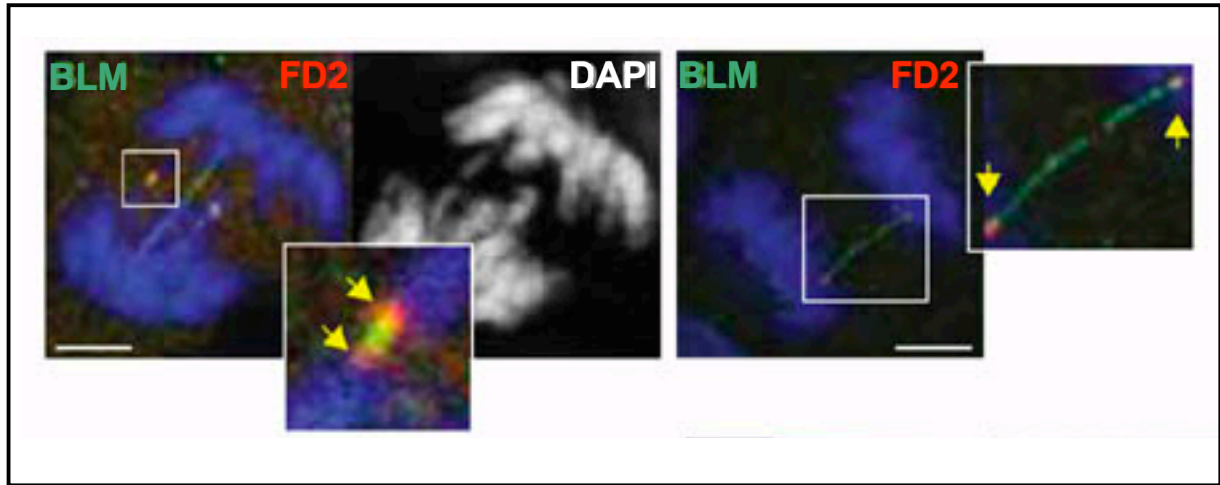


Figure 39 : Visualisation d'un UFB associé à FANCD2 en anaphase

L'immunolocalisation de la protéine BLM (en vert) dans des cellules de fibroblastes humains révèle la présence d'UFBs à la base desquels se trouvent des foci FANCD2 (FD2) (en rouge). L'ADN est coloré en bleu. La barre d'échelle représente 5 μm (Chan *et al.*, 2009).

L'analyse précise de la localisation des foyers FANCD2 dans des cellules a permis de montrer que ces foyers se trouvent sous forme de doublets de la phase G2 jusqu'à la métaphase et que leur nombre augmente après un stress de réplication. De manière intéressante, ces doublets se localisent très fréquemment au niveau de différents sites fragiles, régions particulièrement difficiles à répliquer (Chan *et al.*, 2009; Naim et Rosselli, 2009). Il a alors été proposé que ces doublets FANCD2 se dissocient avec la séparation des chromatides sœurs en anaphase pour être ainsi localisés à chaque extrémité de certains UFBs. Leur présence indiquerait que ces UFBs sont composés d'hémicaténanes d'IRTs dérivant le plus souvent de sites fragiles (Chan *et al.*, 2009). Il est possible que FANCD2 soit présent au niveau de ces hémicaténanes pour les stabiliser depuis leur formation jusqu'à leur résolution (Chan et Hickson, 2011). Cette résolution se ferait très probablement au moyen de l'activité conjuguée de BLM et Topo III α . En effet, la protéine RecQ d'*E. Coli* et son partenaire Top III sont capables de résoudre des hémicaténanes provenant d'IRTs *in vitro* (Suski et Marians, 2008), ce qui suggère que BLM et Topo III α en sont également capables. De manière intrigante, lorsque les UFBs disparaissent en télophase, les foci FANCD2 persistent de manière symétrique par rapport à l'axe de division et sont à nouveau composés de

doublets. Ces doublets ont été appelés « foci-jumeaux ». Une étude a récemment montré que, de manière similaire aux « foci-jumeaux » FANCD2 pendant la télophase, des « foci-jumeaux » de 53BP1, ainsi que d'autres protéines impliquées dans la réparation de l'ADN, sont formés dans des cellules en G1 et disparaissent ensuite en début de phase S suivante (Lukas *et al.*, 2011). Ces « foci-jumeaux » 53BP1 sont également augmentés suite à un stress de réplication. Il a alors été proposé que 53BP1 est recrutée pendant la phase G1 au niveau des IRTs issus de la décaténation des UFBs associés à FANCD2. De manière cohérente, les foci 53BP1 sont fréquemment situés au niveau de sites fragiles. Ces données suggèrent que les IRTs persistent de la mitose jusqu'à la phase G1 suivante où ils sont reconnus et pris en charge par des protéines impliquées dans la réparation de l'ADN. 53BP1 étant impliquée dans l'inhibition de la RH (Bunting *et al.*, 2010), il est donc possible que 53BP1 protège ces IRTs de réparations recombinogènes inappropriées en G1 afin de faciliter leur résolution pendant la phase S suivante (**Figure 40A**).

Par ailleurs, un stress de réplication chez la levure induit la formation de structures analogues aux UFBs (Sofueva *et al.*, 2011), indiquant que ce mécanisme semble être conservé au cours de l'évolution.

LES UFBs CENTROMERIQUES

Les UFBs associés à FANCD2 se situent exclusivement sur les bras des chromosomes, cependant la très grande majorité des UFBs est d'origine centromérique (cUFBs). Contrairement aux UFBs associés à FANCD2 qui semblent être des structures pathologiques, les cUFBs seraient des structures physiologiques fréquemment retrouvées à l'état basal dans quasiment toutes les cellules humaines (Chan *et al.*, 2007). La fonction de ces structures, si elle existe, reste à déterminer bien que certaines hypothèses proposent un rôle des cUFBs dans le SAC et notamment la détection de tension entre chromatides sœurs afin de vérifier la bi-orientation des chromosomes. Afin de déterminer le type de structure ADN composant les cUFBs, des cellules ont notamment été traitées avec des inhibiteurs de la Topo II. Ce traitement augmente très fortement le nombre de cUFBs dans les cellules suggérant fortement que ce type d'UFBs représente des caténanes d'ADNdb (Baumann *et al.*, 2007; Chan *et al.*, 2007). Comme indiqué dans le chapitre précédent, la résolution des caténanes centromériques ne peut se faire qu'après le retrait de la cohésine à ce niveau. Or la cohésine centromérique n'est retirée qu'à la transition métaphase-anaphase, contrairement à la cohésine située sur les bras des chromosomes qui disparaît dès la prophase. Ceci explique ainsi la persistance de caténations pendant l'anaphase uniquement au niveau des

centromères. Ces caténations seraient alors visualisées sous forme de cUFBs au moment de la séparation des chromatides sœurs (Figure 40B).

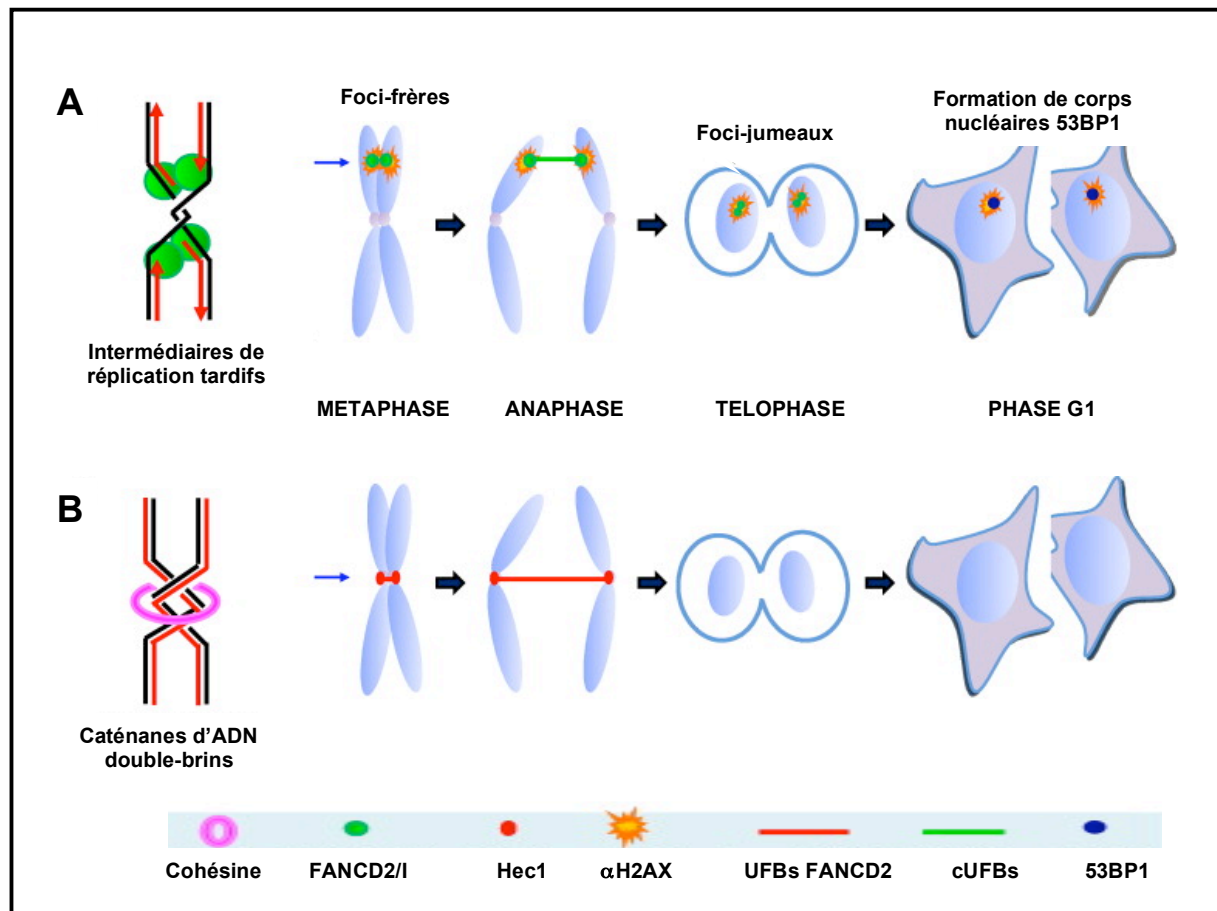


Figure 40 : Modèle de formation et réparation des UFBs associés à FANCD2 et des UFBs centromériques

(A) Des IRTs provenant principalement de sites fragiles pourraient s'accumuler au niveau des bras des chromosomes aboutissant à la formation d'hémicaténanes. Les protéines FANCD2 et FANCI seraient alors recrutées au niveau de ces intermédiaires afin de les stabiliser. Durant l'anaphase, la persistance de ces structures est à l'origine de certains UFBs qui seraient alors résolus par l'activité conjuguée de BLM et Topo III α . Chacun des IRTs ainsi désolidarisé serait alors transmis dans chaque cellule fille en phase G1 et protégé par la protéine 53BP1 en attendant leur réparation lors de la prochaine phase S.

(B) Au niveau des centromères, les caténanes d'ADNdb sont protégés par la cohésine de la décaténation par Topo II α . En anaphase, les cUFBs seraient générés à partir de ces caténations, puis l'activité de remodelage de la chromatine de PICH en coopération avec BLM permettrait la résolution progressive de ces UFBs par la Topo II (d'après Chan *et al.*, 2011).

Il a récemment été démontré *in vitro* que PICH possède une activité de remodelage de la chromatine, principale caractéristique des hélicases de la famille SNF2, et qu'*in vivo*, BLM est nécessaire pour cette activité (Ke *et al.*, 2011). Sur la base de ces résultats, il a été proposé un modèle permettant d'expliquer la contribution de BLM et PICH dans la résolution des cUFBs. Ainsi, PICH en coopération avec BLM permettrait de retirer les nucléosomes situés sur les cUFBs permettant ainsi de les rendre plus souples et ainsi plus résistants à la rupture pouvant être

provoquée par les forces mécaniques du fuseau mitotique pendant l'anaphase. Cela permettrait d'obtenir un délai suffisant pour leur décaténation complète par Topo II α (ou par des enzymes de réparation de l'ADN dans le cas d'UFBs non centromériques) (**Figure 41**) (Ke *et al.*, 2011).

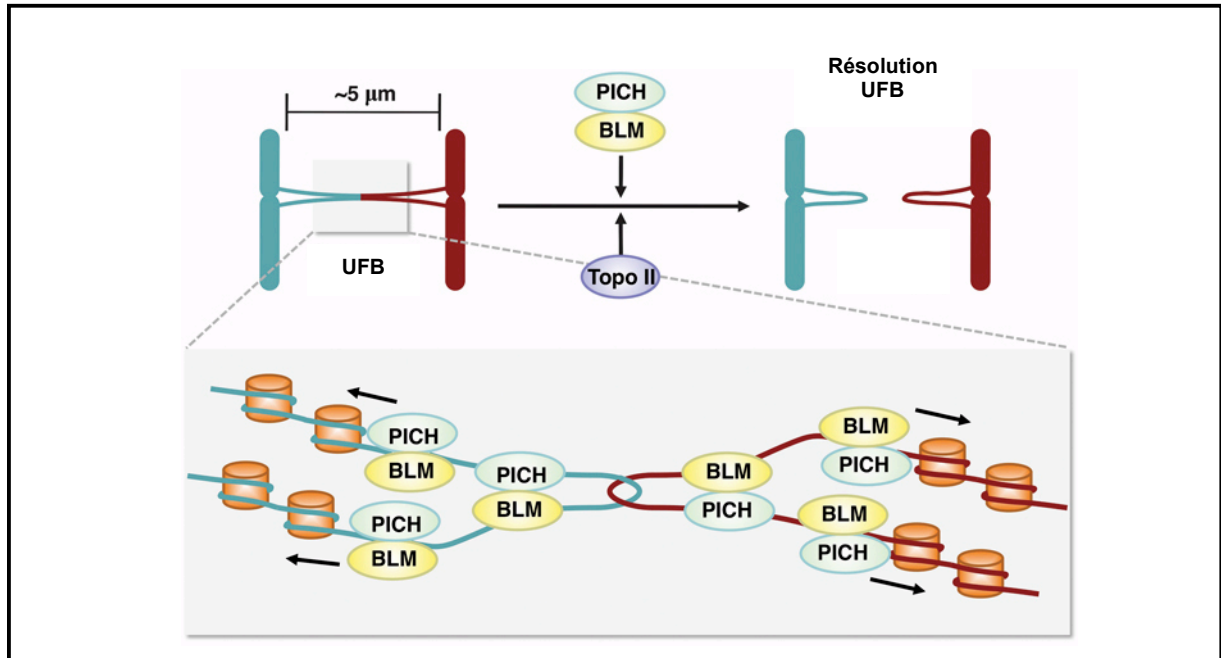


Figure 41 : Modèle de résolution des UFBs centromériques par BLM et PICH

Dans ce modèle, BLM et PICH coopèrent pour retirer les nucléosomes des caténanes d'ADN composant les cUFBs. Cela permettrait ainsi d'obtenir un délai suffisant pour leur résolution par Topo II α (d'après Ke *et al.*, 2011)

Un autre modèle intéressant a été proposé pour la résolution des cUFBs : selon lequel, PICH facilite le recrutement de BLM sur les cUFBs afin de catalyser le désappariement des duplexes d'ADN générant ainsi de l'ADNsb. Ces UFBs composés ainsi d'ADNsb pourraient alors être décaténés par Topo III α . En accord avec cette hypothèse, il a été montré la présence de RPA sur certains cUFBs (Chan *et al.*, 2009).

Ces deux modèles sont cohérents avec le fait que les cUFBs disparaissent progressivement en fin d'anaphase et durant la télophase sans provoquer de CDBs de l'ADN (absence de γ H2AX), ce qui indique que ces structures finissent par être résolues en fin de mitose plutôt que simplement rompues par les forces mécaniques du fuseau mitotique (Chan *et al.*, 2009).

Hypothèse de travail:

L'ensemble de ces données indique que, pendant l'anaphase, la protéine BLM est nécessaire à la résolution des cUFBs en conditions normales de croissance, ainsi qu'à la résolution des UFBs associés à FANCD2 en réponse à un stress de réplication. Tout l'enjeu de mon projet était de déterminer si BLM était également impliquée dans la prévention de la formation de ces UFBs et donc si BLM jouait un rôle avant l'anaphase.

RESULTATS

Article

Bloom's syndrome and PICH helicases cooperate with topoisomerase II α in centromere disjunction

Sébastien Rouzeau^{1,2}, Fabrice P. Cordelières^{1,2,3}, Géraldine Labarchède-Buhagiar^{1,2}, Ilse Hurbain^{4,5,6}, Rosine Onclercq-Delic^{1,2}, Laura Magnaghi-Jaulin⁷, Christian Jaulin⁷ & Mounira Amor-Guélet^{1,2*}.

¹Institut Curie, Centre de Recherche, Centre Universitaire, Bât. 110, Orsay F-91405, France;

²CNRS UMR 3348, Stress Génotoxiques et Cancer, Orsay, F-91405, France.

³Institut Curie, Centre de Recherche, Plateforme d'Imagerie Cellulaire et Tissulaire IBiSA, Centre Universitaire, Bât. 112, Orsay F-91405, France;

⁴Institut Curie, Centre de Recherche, Paris F-75248, France;

⁵Structure et Compartimentation membranaire, CNRS UMR144, 12 rue Lhomond, Paris, F-75248, France;

⁶Plateforme d'Imagerie Cellulaire et Tissulaire IBiSA, CNRS UMR 144, 12 rue Lhomond, Paris, France;

⁷Institut de Génétique et Développement, Université de Rennes I, CNRS UMR 6061, 2 rue du Professeur Léon Bernard, Rennes F-35043, France.

*Correspondance: mounira.amor@curie.fr (M.A-G.)

Un des moyens classiques pour tenter de déterminer les fonctions d'une protéine est d'étudier en premier lieu sa localisation cellulaire. Nous avons donc entrepris de déterminer de nouvelles localisations cellulaires de BLM pendant le cycle cellulaire. Dans cet objectif, nous avons établi au laboratoire un modèle cellulaire permettant de localiser la protéine BLM par fluorescence. Cette lignée fibroblastique commerciale (GM08505B), dérivée d'un patient BS, a été transfectée par une construction plasmidique portant une cassette de résistance à un antibiotique et permettant l'expression d'une protéine BLM fusionnée à la GFP (Green Fluorescent Protein) sous le contrôle d'un promoteur fort CMV (Cytomégalo virus). Une sélection par l'antibiotique a permis l'obtention d'une lignée stable « GFP-BLM ». Une lignée stable contrôle « BS » a également été obtenue en transfectant la lignée GM08505B par la même construction plasmidique mais ne codant que pour la GFP. L'expression de la protéine GFP-BLM permet une complémentarité fonctionnelle puisque le taux de SCE de la lignée GFP-BLM est diminué de plus de cinq fois par rapport à la lignée BS (Lahkim Bennani-Belhaj *et al.*, 2010b).

En utilisant cette lignée GFP-BLM, nous avons observé pour la première fois la présence de BLM aux centromères pendant les phases S et G2 ainsi que les étapes précoces de la mitose. Ce recrutement est progressif, BLM n'étant recrutée que sur quelques centromères en fin de phase S et présente sur tous les centromères en fin de G2/début de mitose (prophase). De manière intéressante, nous avons montré que l'activité de liaison à l'ADN de BLM, mais pas son activité hélicase, est nécessaire pour le recrutement de la protéine aux centromères. Ces résultats suggèrent que la protéine BLM se lie directement à l'ADN.

Nous avons confirmé la présence de BLM aux centromères pendant la mitose dans des cellules HeLa par immunomarquage de la protéine endogène, la spécificité des anticorps ayant été préalablement validée par ARNi. La suite des expériences présentées dans l'article a été réalisée sur les lignées BS et GFP-BLM. Nous avons ainsi montré que les protéines BLM et PICH sont nécessaires :

- 1 – à l'organisation structurale de l'ADN centromérique.
- 2 – à la disjonction complète des centromères, indépendamment de la voie des cohésines, suggérant une implication de ces protéines dans le processus de décaténation des centromères. L'activité hélicase de BLM est essentielle pour cette disjonction. De manière intéressante, les cellules déficientes pour les deux protéines présentent le même phénotype que les cellules déficientes pour l'une ou l'autre des protéines, indiquant que celles-ci agissent dans la même voie cellulaire.

3 - au recrutement de la Topo II α active aux centromères. L'activité hélicase de BLM est également essentielle pour ce recrutement.

Nos résultats révèlent une nouvelle localisation et une nouvelle fonction de la protéine BLM, aux centromères, et montrent pour la première fois l'implication des protéines BLM et PICH dans la décaténation centromérique avant l'anaphase. Nous proposons que BLM et PICH, par leurs activités respectives hélicase et de remodelage de la chromatine, modifient la structure des centromères pendant la pré-métaphase, rendant ainsi certaines caténations accessibles à la Topo II α avant l'anaphase. Ainsi, en absence de BLM ou de PICH en pré-métaphase, certaines caténations au niveau de l'ADN centromérique sont masquées du fait d'un défaut de remodelage de la chromatine, entraînant un défaut de recrutement de Topo II α , faute de substrat accessible. La persistance de ces caténations centromériques non résolues contribuerait à l'augmentation de la fréquence des cUFBs observée dans les cellules BS.

Ce modèle ainsi que son intégration dans le contexte scientifique actuel seront abordés dans la partie « Discussion et Perspectives ».

Bloom's syndrome and PICH helicases cooperate with topoisomerase II α in centromere disjunction

Sébastien Rouzeau^{1,2}, Fabrice P. Cordelières^{1,2,3}, Géraldine Labarchède-Buhagiar^{1,2}, Ilse Hurbain^{4,5,6}, Rosine Onclercq-Delic^{1,2}, Laura Magnaghi-Jaulin⁷, Christian Jaulin⁷ & Mounira Amor-Guélet^{1,2*}.

¹Institut Curie, Centre de Recherche, Centre Universitaire, Bât. 110, Orsay F-91405, France;

²CNRS UMR 3348, Stress Génotoxiques et Cancer, Orsay, F-91405, France.

³Institut Curie, Centre de Recherche, Plateforme d'Imagerie Cellulaire et Tissulaire IBiSA, Centre Universitaire, Bât. 112, Orsay F-91405, France;

⁴Institut Curie, Centre de Recherche, Paris F-75248, France;

⁵Structure et Compartimentation membranaire, CNRS UMR144, 12 rue Lhomond, Paris, F-75248, France;

⁶Plateforme d'Imagerie Cellulaire et Tissulaire IBiSA, CNRS UMR 144, 12 rue Lhomond, Paris, France;

⁷Institut de Génétique et Développement, Université de Rennes I, CNRS UMR 6061, 2 rue du Professeur Léon Bernard, Rennes F-35043, France.

*Correspondance: mounira.amor@curie.fr (M.A-G.)

Centromeres are specialized chromosome domains that control chromosome segregation during mitosis, but little is known about the mechanisms underlying the maintenance of their integrity. Ultrafine anaphase bridges are physiological DNA structures thought to contain unresolved DNA catenations between the centromeres separating during anaphase. BLM and PICH helicases co-localize at these ultrafine anaphase bridges and promote their resolution. Since PICH is a centromeric protein, we hypothesized that BLM could also locate at centromeres and that both proteins could cooperate upstream from anaphase. Using immunofluorescence analyses, we demonstrate that BLM is recruited at centromeres from G2 phase to mitosis. We combined fluorescence in situ hybridization, electron microscopy, RNA interference, chromosome spreading and chromatin immunoprecipitation to show that both BLM-deficient and PICH-deficient prometaphase cells are associated with changes in centromeres structure and with a higher frequency of centromeric non disjunction in the absence of cohesin, suggesting the persistence of catenations. Moreover, both proteins are required for the correct recruitment of active topoisomerase II α to the centromere, revealing a functional relationship between BLM, PICH and topoisomerase II α in the centromere decatenation process. These results indicate that the increase in the frequency of centromeric ultrafine anaphase bridges in BLM-deficient cells is not only due to unresolved physiological ultrafine anaphase bridges, but also to newly formed ultrafine anaphase bridges that we define here as supernumerary centromeric ultrafine anaphase bridges. We thus propose that BLM and PICH cooperate in rendering centromeric catenates accessible to topoisomerase II α , thereby facilitating correct centromere disjunction and preventing the formation of supernumerary centromeric ultrafine anaphase bridges.

Introduction

The centromere is a highly differentiated chromosomal structure consisting, in human cells, of α -satellite DNA repeats [1]. It plays an essential role in cell division, particularly in kinetochore assembly, and in ensuring the segregation of equal number of chromosomes to daughter cells during mitosis [2]. The maintenance of centromere stability is thus essential to prevent chromosomal instability and cancer development [3]. Our interest in centromere stability began with the unexpected

discovery that a helicase-like protein, PICH (Plk1-interacting checkpoint “helicase”) and the Bloom syndrome helicase (BLM) co-localized to centromeric ultrathin DNA threads that could not be counterstained with conventional DNA dyes or antibodies against histones [4,5]. These threads were found to be common in all cultured normal cells tested, and are therefore probably physiological structures. These PICH- and BLM-positive DNA threads, which are also called ultrafine anaphase bridges (UFBs), are thought to contain unresolved DNA catenations between the centromeres

separating during anaphase or to originate from incompletely replicated DNA [4,5]. Almost all the UFBs detected in untreated cells are of centromeric origin and have been proposed to prevent reactivation of the spindle assembly checkpoint (SAC) during early anaphase, by maintaining tension across centromeres [4,6]. As cells progress through anaphase, UFBs become progressively longer and decrease in number. They are no longer detectable by telophase. The resolution of centromeric UFBs requires topoisomerase II α (Topo II α) activity and occurs after the onset of anaphase, after the disappearance of cohesin [6,7]. Thus, sister centromeres are held together through double-stranded DNA catenations until the end of anaphase, accounting for the strong induction of centromeric UFBs by catalytic inhibitors of Topo II [4,5]. The frequency of PICH-positive UFBs is also higher in BLM-deficient cells than in control cells, suggesting the involvement of BLM in their resolution [5]. This point is of particular interest because BLM-deficiency causes Bloom syndrome, an autosomal recessive disease displaying one of the strongest known correlations between chromosomal instability and an increase in the risk of cancer at an early age [8]. The hallmark of BLM-deficient cells is elevated frequency of sister chromatid exchanges (SCEs) [8]. Thus, BLM plays a crucial role in preventing genetic instability and cancer. In normal cells, BLM is only detectable on UFBs in anaphase, whereas PICH staining is detected as early as metaphase [5]. PICH enables the localization of BLM to anaphase UFBs, and BLM is required for the chromatin remodeling function of PICH *in vivo*, both proteins cooperating to limit histone incorporation into UFBs and to promote their resolution [9]. We hypothesized that the functional relationship between PICH and BLM may also be of major importance before anaphase in the maintenance of centromere integrity.

We report here the localization of BLM to the centromere of cells at prometaphase/metaphase stage. We show that PICH and BLM deficiencies are associated with changes in centromere structure, with an increase in centromeric non disjunction in cohesin-depleted cells, and with a defect in the recruitment of active Topo II α to centromeres. Our results reveal the existence of a new centromeric mechanism involving cooperation between PICH and BLM, likely to render some centromeric catenates accessible to Topo II α before anaphase onset, thereby facilitating correct centromeric disjunction and preventing the formation of SC-UFBs.

Results

BLM is a centromeric protein

PICH is a centromeric protein [4]. As BLM, like PICH, localized with centromeric UFBs [5], we first investigated whether BLM also localized to

centromeres. We analyzed the subcellular distribution of stably expressed GFP-tagged BLM protein in asynchronous GM08505 BS cells (GFP-BLM cells) [10]. We detected GFP-BLM in PML bodies, as expected [11] (Figure S1), but in some cells, BLM foci were smaller, double-dotted and no longer colocalized within PML bodies. Using CREST serum as a centromeric marker, we showed, by cyclin B1 staining [12], that 73% of cells with GFP-BLM-positive centromeres were in G2-phase or early mitosis (Figure 1A and 1B, left panel). These cells included a mean of 27 GFP-BLM-positive pairs of centromeres (7 to 59 pairs). By contrast, only 10 GFP-BLM-positive centromeres (1 to 24 pairs) were detected in late S-phase cells (most centromeres being paired), negative for cyclin B1 staining (Figure 1B, right panel). All the centromeres in prophase cells displayed positive staining for GFP-BLM (Figure 1C). These results suggest that BLM is progressively loaded to the centromeres from late S phase until mitosis. We then investigated whether the helicase and/or DNA binding activity of BLM were required for centromeric localization, using GM08505 BS cells stably transfected with a construct encoding either the BLM protein with an inactive helicase domain (GFP-I841T) or with both an helicase and DNA binding domains inactivated (GFP-G891E) [13]. We found that DNA-binding activity was required for the centromeric localization of BLM, whereas helicase activity was not. Indeed, GFP-G891E displayed a diffuse distribution in BS cells and was not detectable at centromeres (Figure 1D). These results suggest that BLM interacts directly with centromeric DNA.

Centromeric localization of BLM was further investigated by performing immunofluorescence experiments with two different anti-BLM antibodies, on mitotic chromosome spreads from HeLa S3 cells at prometaphase/metaphase stage, downregulated for BLM (siBLM) or without BLM downregulation (siCtrl). In HeLa siCtrl cells, we detected endogenous BLM at centromeres, with CREST serum used as a centromeric marker. The siRNA-mediated depletion of BLM (siBLM) resulted in the absence of the BLM signal at centromeres, confirming the specificity of the anti-BLM antibodies (Figure 2A). Closer examination of centromeres from each chromosome revealed that BLM signal was detected on about 84% of centromeres in HeLa siCtrl cell and on 1.7% of centromeres from HeLa siBLM (Figure 2B). Thus, BLM is clearly a centromeric protein.

BLM and PICH deficiencies are associated with changes in centromeric DNA structure

We investigated the possible effects of BLM deficiency on centromere structure. We used a FISH (fluorescence in situ hybridization)-based assay to investigate the centromeric DNA organization of

one chromosome and its volume (chromosome 8, CEN-8 probe [14]) in GM08505 BLM-deficient cells stably expressing a GFP vector (BS cells) and in GFP-BLM cells during prometaphase and metaphase (Figure 3A). We found that CEN-8 signal volume in BS cells was less than half the volume of that in control cells, indicating that BLM is involved in centromeric DNA structure (Figure 3B, left panel). To confirm these findings, we analyzed the effects of BLM deficiency on the structural morphology of the centromeric DNA in BS and GFP-BLM metaphase cells by electron microscopy (EM) (Figure 3C). Centromeric chromatin was identified adjacent to the typical kinetochore structure. Immunofluorescence analysis of several kinetochore/centromere markers confirmed that BLM deficiency had no major effect on kinetochore structure, as previously shown for PICH-deficient cells [4] (Figure S2). However, the centromeric chromatin was clearly more dense in BS cells than in GFP-BLM cells (Figure 3C), confirming an effect on centromeric DNA organization of the absence of BLM. We next performed FISH experiments in GFP-BLM cells downregulated for PICH (siPICH) or without PICH downregulation (siCtrl). We found that CEN-8 signal volume in PICH-downregulated cells was about half the volume of that in control cells, indicating that PICH is also involved in centromeric DNA structure before anaphase onset (Figure 3B, right panel). These results are not the consequence of a coregulation of *PICH* and *BLM* genes, because the deficiency of one protein did not affect the expression of the other (Figure S3).

BLM and PICH are required for complete centromere disjunction

As BLM localizes to centromeres (Figure 1 and 2), we next investigated if, in addition to its potential role in resolving UFBs during anaphase [5,9], BLM could be involved in preventing UFB formation, by contributing to the centromeric DNA decatenation process before the metaphase-anaphase transition. DNA catenation induced by the inhibition of Topo II α has been shown to maintain sister chromatid cohesion in the absence of cohesin complexes [7,15]. We thus analyzed chromosome spreads from BS cells and from GFP-BLM cells arrested in prometaphase (+colchicine) and knocked down for PICH (siPICH) or not (siCtrl) (Figure 4A). For these experiments, Rad21, the cleavable subunit of cohesin, was depleted in all cell lines (siRad21) (Figure 4A, upper right panel). BLM deficiency and PICH knockdown were associated with an increase in centromeric cohesion. Indeed, we observed three distinct and different phenotypes: classical X-shaped chromosomes probably corresponding to cells not transfected with Rad21 siRNA (X-shapes), the expected fully disjoined chromatids resulting from cohesin depletion (complete disjunction), and a third, unusual phenotype of separated sister

chromatids that were still physically linked, reflecting incomplete chromatid disjunction (incomplete disjunction) (Figure 4A, upper left panels). Careful examination of these “separated but still paired” chromatids revealed that they were mostly linked via their centromeres (visualized as the major chromosomal constriction). This observation was confirmed by quantifying the intensity profile of the centromeric region between the two chromatids of the “X-shape” and “incomplete disjunction” phenotypes in the four cell lines (Figure 4A, lower left panel). We determined the frequency of each phenotype among the four cell lines and found that about 15% of the prometaphase cells presented the X-shaped phenotype. About 19% of siRad21-treated BS cells, siRad21 + siPICH treated GFP-BLM cells, and siRad21 + siPICH-treated BS cells presented completely disjoined chromatids, whereas about 66% of the same cells, displayed an incomplete centromere disjunction phenotype (Figure 4A, lower right panel). In contrast, in GFP-BLM cells knocked down for only Rad21, 34.2% of the cells displayed complete sister chromatid disjunction and 50.5% had separated sister centromeres that remained paired (as opposed to 66% observed in the other cell lines). About 27% incomplete disjunction was observed in Rad21-depleted HeLa cells (Figure S4). Thus, the 50.5% of incomplete disjunction observed in siRad21-treated GFP-BLM cells can be explained by incomplete complementation of BS cells by GFP-BLM expression, which is consistent with the intermediate frequency of SCEs in GFP-BLM cells (Figure S5). We performed the same analysis using GFP-BLM-I841T cells (inactive helicase domain), and compared them with BS and GFP-BLM cells. Similar results were obtained with both Rad21-depleted GFP-BLM-I841T cells and Rad21-depleted BS cells, (Fig. 4B right panel), even though GFP-BLM-I841T and GFP-BLM cells expressed similar amounts of BLM protein (Figure 4B).

Together, these results show that both BLM and PICH are involved in the complete disjunction of sister centromeres independently of the cohesin pathway, strongly suggesting that in the absence of BLM and/or PICH, some centromeric catenations are not processed, leading to an increase in centromeric non disjunction. The results with cells expressing BLM with inactive helicase domain indicate that the helicase activity of BLM is involved in the complete disjunction of sister centromeres.

Lastly, we observed no additive or synergistic effect of PICH and BLM deficiencies on the “incomplete disjunction” phenotype, suggesting that both these genes are involved in the same regulatory pathway.

Centromeric UFBs are not detectable in PICH-depleted cells

The findings reported above suggest that the higher

frequency of centromeric UFBs in BLM-deficient cells [5], that we also confirmed, may be due to a lack of BLM processing activity of some centromeric DNA catenations. These results also suggest that the centromeric DNA catenations persisting in PICH-deficient cells are likely to result in an increase in centromere UFB frequency. We investigated the effect of knocking down PICH on the frequency of UFBs, by monitoring BLM. We found that PICH depletion resulted in a decrease in the number of cells presenting UFBs (by a factor of three) and in the number of BLM-positive UFBs (decrease by a factor of eight) (Figure S6). However, most of the BLM-positive UFBs detected were also positive for PICH staining, indicating that PICH downregulation was incomplete, with UFBs positive for both BLM and PICH probably forming in cells not efficiently transfected with PICH siRNA. The lack of BLM-positive UFB detection in PICH-depleted anaphase cells is explained by recent observations in which PICH was shown to be required for BLM localization to anaphase threads [9]. Thus, since PICH downregulation is associated with an increased frequency of cells presenting an “incomplete disjunction” phenotype, it is likely that, although not detectable in absence of PICH (and thus of BLM loading), UFB frequency is increased in these cells.

BLM and PICH are required for the recruitment of Topo II α to centromeres

Topo II α is known to be responsible for the elimination of centromeric DNA catenation [15]. To investigate the possible role of BLM and PICH in centromeric decatenation, we assessed the recruitment of active Topo II α to the pericentromeric region (satellite 3) and to the centromere of chromosomes X (α -satellite sequences DXZ1) and 17 (D17Z1). Topo II α was trapped on DNA by 15 minutes treatment with etoposide [16], and analyzed using chromatin immunoprecipitation (ChIP) coupled with semi-quantitative PCR (see Methods) in BS cells and GFP-BLM cells (Figure 5A) and in PICH-depleted GFP-BLM cells (siPICH) and their control cells (siCtrl) (Figure 5B). Immunoprecipitation of active Topo II α in BS cells, PICH-depleted GFP-BLM cells and their respective control cells, resulted in similar amplification of satellite 3 (Figure 5A and 5B, lower panels). We then used this as a control for normalization and found that the amount of DXZ1 and D17Z1 sequences were 4-fold and 2-fold increased in GFP-BLM control cells compared to BS cells (Figure 5A, upper panel). Control cells also contained about twice as many DXZ1 and D17Z1 sequences as PICH-depleted cells (Figure 5B, upper panel), whereas the total amount of Topo II α was similar in all conditions (Figure 5C). We performed the same analysis with GFP-BLM-I841T cells, comparing the results obtained with those for BS

and GFP-BLM cells, and obtained similar results for GFP-BLM-I841T cells and BS cells (Figure 5D). Thus, active Topo II α is significantly less abundant at the centromeres of BLM-deficient cells and PICH-deficient cells than at those of control cells. These results also indicate that the helicase activity of BLM is involved in the recruitment of active Topo II α to centromeres.

Discussion

We report here a new localization and function for BLM at centromeres. We also report that BLM cooperate with PICH at centromeres, and that both of these proteins play an important role in a previously unknown mechanism that consist on the recruitment of active Topo II α to centromeres to eliminate DNA catenation before the onset of anaphase.

Our FISH experiments and EM images showed changes in the structure of centromeric chromatin in the absence of BLM or PICH (Figure 3). Recombinant PICH has recently been shown to have nucleosome remodeling activity *in vitro*, and BLM has been shown to be required for the chromatin remodeling function of PICH during anaphase *in vivo* [9]. On the other hand, changes in DNA topology are required for efficient mitotic decatenation by Top2, the fission yeast homolog of Topo II α [17]. We therefore propose a model in which the combined action of BLM and PICH promotes the organization of centromeric chromatin, thereby rendering some centromeric catenates accessible to Topo II α (Figure 6). This pathway may allow Topo II α -mediated resolution of some centromeric DNA catenations as soon as cells are in prometaphase, thereby preventing centromeric non disjunction and the formation of SC-UFBs that might interfere with abscission [7].

Our results also indicate that, in addition to their role in resolving physiological UFBs [5,9], BLM and PICH participate in the prevention of newly formed supernumerary UFBs that we define as “SC-UFBs” (Supernumerary Centromeric UFBs). Thus, the additional centromeric UFBs that form in BLM-deficient cells or in cells treated with inhibitors of the catalytic activity of Topo II α include both SC-UFBs and unresolved physiological UFBs: these UFBs are likely similar in nature but of different origine. Indeed, cohesin complexes preserve catenation at centromeres until the onset of anaphase, accounting for the presence of physiological UFBs [7]. The resolution of centromeric catenation therefore depends on cohesin removal [7]. However, our results indicate that some centromeric catenations are processed before the onset of anaphase to prevent the formation of SC-UFBs. Thus, physiological UFBs may arise from catenations locally protected by cohesin complexes and processed at anaphase onset, whereas SC-UFBs

may arise from catenations not resolved at an earlier step.

In conclusion, the new centromeric decatenation mechanism reported here is probably the first step in a two-step centromeric decatenation process dependent on the coordinated action of BLM, PICH and Topo II α . Moreover, our studies shed light on the mechanisms underlying the genetic instability and predisposition to cancer associated with Bloom's syndrome.

Materials and Methods

Cell lines, cell culture and transfections. GFP-BLM construct was kindly provided by Nathan Ellis. BS and GFP-BLM cells were obtained by transfecting BS GM08505B cells with the EGFP-C1 vector alone (Clontech, Mountain View, CA), or with the same vector containing the full-length BLM cDNA [18], respectively, in the presence of JetPEI reagent (Ozyme). GFP-I841T cells were obtained by transfecting BS GM08505B cells as described above, with the EGFP-C1 vector containing the full-length BLM cDNA mutated at codon 841 (see site-directed mutagenesis).

HeLa and HeLa S3 cells were cultured in DMEM (Gibco) supplemented with 10% decomplexed FCS (Invitrogen), L-glutamine and antibiotics.

Cells were transfected with siRNAs directed against BLM (48 h), PICH (72 h) and Rad21 (72 h) and with a control non targeting pool of siRNA in the presence of Dharmafect 1 (Dharmacon) according to the manufacturer's instructions.

Chemicals. Etoposide (Sigma) was used at a final concentration of 0.5 mM.

Sister chromatid exchange (SCE) assays. SCE analysis was performed as previously described [19].

Plasmid construction and site-directed mutagenesis. Site-directed mutation was generated in the EGFP-C1 vector containing the full-length BLM cDNA: Ile-841 was mutated with the QuikChange XL site-directed mutagenesis kit (Agilent) according to the manufacturer's instructions. Primer 1 (5'-CCCAGGGTACAGAAGGACACCCTGACTCAGCTGAAG - 3') and primer 2 (5'-CTTCAGCTGAGTCAGGGTGTCTTCTGTACCCTGGG- 3') were used to mutate Ile-841.

Western-blot analysis. The procedures used for gel electrophoresis and immunoblotting have been described elsewhere [20].

Antibodies. All the commercial antibodies were used according to the manufacturers' specifications. The primary antibodies were used for

immunofluorescence (IF), immunoprecipitation (IP) or immunoblotting (IB) at the following concentrations: rabbit anti-BLM (1:5000 for IB and 1:200 for IF, AB476 from Abcam), goat anti-BLM (1:150 for IF, C18 from Santa-Cruz Biotechnology), human anti-Crest (1:500 for IF, from Antibody Incorporated), mouse anti-Rad21 (1:1000 for IB, 53A303 from Upstate), mouse anti-Topo II alpha (1:1000 for IB and IF, 3D4 from Assay Design), mouse anti-Topo II alpha (1:250 for IP, KiS1 from Millipore), anti-actin and anti-GAPDH (1:10000 for IB; Santa Cruz) antibodies, anti-PICH (1:200 for IF and 1:1000 for IB, from Abnova) and anti-Cenp-A (1:200 for IF, AB13939 from Abcam). Secondary antibodies conjugated to Alexa Fluor 488, 555 and 633 (Molecular Probes, 1:200-600) were used for immunofluorescence and secondary antibodies conjugated to horseradish peroxidase (Santa Cruz, 1:5000-10000) were used for immunoblot detection.

Immunofluorescence microscopy.

Immunofluorescence staining was performed as previously described [21] involving for detection of chromatin-bound protein a 5 minutes pre-permeabilization with 0.5% Triton prior to fixation. Nuclear DNA was detected by mounting slides in Prolong® Gold antifade reagent supplemented with DAPI (Invitrogen). Cell images were acquired with a 3-D deconvolution imaging system consisting of a Leica DM RXA microscope equipped with a piezoelectric translator (PIFOC; PI) placed at the base of a 63x PlanApo N.A. 1.4 objective, and a CoolSNAP HQ interline CCD camera (Photometrics). Stacks of conventional fluorescence images were collected automatically at a Z-distance of 0.2 μ m (Metamorph software; Molecular Devices). Images are presented as maximum intensity projections generated with ImageJ software, from stacks deconvolved with an extension of Metamorph software [22].

FISH analysis. FISH was carried out as previously described [14], with fixation in paraformaldehyde. Images were acquired on a Leica SP5 confocal system, equipped with an argon laser, with 405 nm and 561 nm laser diodes, using a 63x/1.4 objective. All recordings were made with the appropriate sampling frequency (512 \times 512 images, line average of 8 and zooming set to 8, pixel size: 60.2nm). Image processing and quantification were carried out with the freely available Image J software [23]. FISH signal volume was determined with the 3D object counter plugin to Image J software [24]. A binary 3D image was generated, and a tagged map of all objects was obtained, based on pixel connectivity (one tag per independent FISH signal, 26-neighbor connectivity). The number of voxels (i.e. 3D pixels) carrying each tag was retrieved, then multiplied by the unit volume of the voxel (64.5 nm

x 64.5 nm x 200 nm), to obtain the volume of each object. More information is available from the documentation supplied for the plugin:

http://imagejdocu.tudor.lu/lib/exe/fetch.php?media=plugin:analysis:3d_object_counter:3d-oc.pdf.

Chromosome spreading and immunolabeling. Cells were left untreated or were transfected as indicated. After 72 h of transfection with an siRNA specific for Rad21, cells were transferred to slides in 6-well plates. After 24h at 37°C, colchicine was added to a final concentration of 0.1 µg/ml and the cells were incubated for 1 hour. The cells were then treated as for the SCE assay. Centromeric disjunction was evaluated by retrieving intensity profiles with the “plot profile function” of ImageJ applied to distance-calibrated images, along a line placed over the primary constriction region. For chromosome immunolabeling, chromosome spreads were obtained by cytocentrifugation and processed as previously described [21].

Topo II ChIP analysis. Cells (10⁶) were treated with 0.5 mM etoposide for 15 min. They were then lysed in 1.5 ml of buffer containing 1% Sarkosyl, 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 10 mM EDTA, and protease inhibitor mixture (Complete Mini, Roche) by 10 passages through a 21G needle. CsCl was added from a concentrated stock solution (7 M), to give a final concentration of 0.5 M. DNA was fragmented by sonicating lysates with a Bioruptor sonicator (Diagenode), with 20-second pulses (20 seconds on/20 seconds off), for 15 minutes at the high-power setting. Under these conditions, DNA fragments of 0.5 to 3 kb were generated, as shown by agarose gel electrophoresis. Before immunoprecipitation (IP), we added 3 volumes of a buffer containing 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 10 mM EDTA, 100 mM NaCl, 0.1% Triton X-100, and protease inhibitor mixture to 1 volume of lysate. The resulting mixture was then centrifuged for 15 min at 16 000 x g at 4°C. Pre-clearing was then achieved by adding 60 µl of Protein G plus agarose beads (Santa Cruz) and rotating the tubes for 2 h at 4°C. The unbound fraction recovered by centrifugation was used for IP reactions and was incubated overnight, at 4°C, with gentle shaking, with 5 µg of specific anti-Topo II antibody (KiS1) or control antibody (mouse IgG). Protein G plus agarose beads (Santa Cruz) were added and the mixture was incubated for 1 h. The beads were collected by centrifugation and washed three times with 150 mM NaCl buffer (10 mM Tris-HCl pH 7.5, 10 mM EDTA, 150 mM NaCl, 0.1% Triton X-100, protease inhibitor). Three rounds of elution were then carried out with 500 mM NaCl buffer (10 mM Tris-HCl pH 7.5, 10 mM EDTA, 500 mM NaCl, 0.1% Triton X-100, protease inhibitor), with the beads collected by centrifugation between elutions. The DNA fragments bound to the beads were treated with 50 µg/ml RNase A, at 55°C, for 30

min, then with 200 µg/ml proteinase K at 55°C overnight. They were then purified with the MiniElute PCR Purification kit (QIAGEN), according to the manufacturers’ instructions. DNA fragments were quantified with the Quant-IT Pico Green dsDNA kit (Invitrogen™, Molecular probes®), according to the manufacturer’s protocol. Alpha-satellite DNA (10 pg) from chromosome X or chromosome 17 (DXZ1 and D17Z1, respectively) [25] or from pericentromeric DNA satellite 3 [26] was amplified by semiquantitative PCR. PCR products were analyzed by agarose gel electrophoresis and quantified with Image J (NIH) software. The signal obtained from the GFP-BLM cells was taken as 1.

Electron microscopy

BS and GFP-BLM cells grown at low density on coverslips were fixed by incubation with 2% paraformaldehyde, 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M cacodylate buffer for 24 h and postfixed by incubation with 1% (wt/vol) OsO₄ supplemented with 1.5% (wt/vol) ferrocyanide. They were then dehydrated in ethanol and embedded in Epon. Ultrathin sections were prepared with a Reichert UltracutS ultramicrotome (Leica) and viewed with a TEM CM120 Philips electron microscope after counterstaining with uranyl acetate and lead citrate.

Statistical methods. Significance was assessed with Student’s *t*-test. For all tests, *p* < 0.05 was considered statistically significant.

Acknowledgments

We thank L. Aragon for invaluable discussions, A. Carreira, S. Lambert and O. Gavet for helpful discussions and useful comments on the manuscript, S. Augui and O. Philipot for advice concerning FISH and ChIP, and T. Verly for graphical support. This work was supported by grants from the Institut Curie (PIC), the CNRS, *Ligue contre le Cancer Grand-Ouest* and by a fellowship from the *Ministère délégué de l’Enseignement Supérieur et la Recherche* and from the *Ligue Nationale contre le Cancer*.

References

1. Carroll CW, Straight AF (2006) Centromere formation: from epigenetics to self-assembly. *Trends Cell Biol* 16: 70-78.
2. Cleveland DW, Mao Y, Sullivan KF (2003) Centromeres and kinetochores: from epigenetics to mitotic checkpoint signaling. *Cell* 112: 407-421.
3. Yuen KW, Montpetit B, Hieter P (2005) The kinetochore and cancer: what’s the connection? *Curr Opin Cell Biol* 17: 576-582.
4. Baumann C, Korner R, Hofmann K, Nigg EA (2007) PICH, a centromere-associated SNF2 family ATPase, is regulated by Plk1 and required for the spindle checkpoint. *Cell* 128: 101-114.
5. Chan KL, North PS, Hickson ID (2007) BLM is required for faithful chromosome segregation and its localization defines a class of ultrafine anaphase bridges. *EMBO J* 26: 3397-3409.
6. Wang LH, Schwarzbraun T, Speicher MR, Nigg EA (2008) Persistence of DNA threads in human anaphase cells suggests late

- completion of sister chromatid decatenation. *Chromosoma* 117: 123-135.
7. Wang LH, Mayer B, Stemmann O, Nigg EA (2010) Centromere DNA decatenation depends on cohesin removal and is required for mammalian cell division. *J Cell Sci* 123: 806-813.
 8. Amor-Gueret M (2006) Bloom syndrome, genomic instability and cancer: the SOS-like hypothesis. *Cancer Lett* 236: 1-12.
 9. Ke Y, Huh JW, Warrington R, Li B, Wu N, et al. (2011) PICH and BLM limit histone association with anaphase centromeric DNA threads and promote their resolution. *EMBO J*.
 10. Chabosseau P, Buhagiar-Labarchede G, Onclercq-Delic R, Lambert S, Debatisse M, et al. (2011) Pyrimidine pool imbalance induced by BLM helicase deficiency contributes to genetic instability in Bloom syndrome. *Nat Commun* 2: 368.
 11. Yankiwski V, Marciniak RA, Guarente L, Neff NF (2000) Nuclear structure in normal and Bloom syndrome cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 5214-5219.
 12. Pines J, Hunter T (1991) Human cyclins A and B1 are differentially located in the cell and undergo cell cycle-dependent nuclear transport. *J Cell Biol* 115: 1-17.
 13. Guo RB, Rigolet P, Ren H, Zhang B, Zhang XD, et al. (2007) Structural and functional analyses of disease-causing missense mutations in Bloom syndrome protein. *Nucleic Acids Res* 35: 6297-6310.
 14. Batram C, Baddeley D, Kreth G, Cremer C (2008) High precision size measurement of centromere 8 and the 8q24/c-myc gene region in metaphase and interphase human fibroblasts indicate differential condensation. *J Struct Biol* 164: 293-303.
 15. Diaz-Martinez LA, Gimenez-Abian JF, Clarke DJ (2008) Chromosome cohesion - rings, knots, orcs and fellowship. *J Cell Sci* 121: 2107-2114.
 16. Sano K, Miyaji-Yamaguchi M, Tsutsui KM, Tsutsui K (2008) Topoisomerase IIbeta activates a subset of neuronal genes that are repressed in AT-rich genomic environment. *PLoS One* 3: e4103.
 17. Baxter J, Sen N, Martinez VL, De Carandini ME, Schwartzman JB, et al. (2011) Positive supercoiling of mitotic DNA drives decatenation by topoisomerase II in eukaryotes. *Science* 331: 1328-1332.
 18. Eladad S, Ye TZ, Hu P, Leversha M, Beresten S, et al. (2005) Intra-nuclear trafficking of the BLM helicase to DNA damage-induced foci is regulated by SUMO modification. *Hum Mol Genet* 14: 1351-1365.
 19. Lahkim Bennani-Belhaj K, Rouzeau S, Buhagiar-Labarchede G, Chabosseau P, Onclercq-Delic R, et al. (2010) The Bloom syndrome protein limits the lethality associated with RAD51 deficiency. *Mol Cancer Res* 8: 385-394.
 20. Ababou M, Dumaire V, Lecluse Y, Amor-Gueret M (2002) Cleavage of BLM and sensitivity of Bloom's syndrome cells to hydroxyurea and UV-C radiation. *Cell Cycle* 1: 262-266.
 21. Eot-Houllier G, Fulcrand G, Watanabe Y, Magnaghi-Jaulin L, Jaulin C (2008) Histone deacetylase 3 is required for centromeric H3K4 deacetylation and sister chromatid cohesion. *Genes Dev* 22: 2639-2644.
 22. Savino TM, Gebrane-Younes J, De Mey J, Sibarita JB, Hernandez-Verdun D (2001) Nucleolar assembly of the rRNA processing machinery in living cells. *J Cell Biol* 153: 1097-1110.
 23. Agostinho M, Rino J, Braga J, Ferreira F, Steffensen S, et al. (2004) Human topoisomerase IIalpha: targeting to subchromosomal sites of activity during interphase and mitosis. *Mol Biol Cell* 15: 2388-2400.
 24. Bolte S, Cordelieres FP (2006) A guided tour into subcellular colocalization analysis in light microscopy. *J Microsc* 224: 213-232.
 25. Warburton PE, Greig GM, Haaf T, Willard HF (1991) PCR amplification of chromosome-specific alpha satellite DNA: definition of centromeric STS markers and polymorphic analysis. *Genomics* 11: 324-333.
 26. Jolly C, Metz A, Govin J, Vigneron M, Turner BM, et al. (2004) Stress-induced transcription of satellite III repeats. *J Cell Biol* 164: 25-33.

Figure 1

GFP-BLM localization to centromeres in G2/prophase cells is dependent on its DNA binding activity.

(A) Localization of GFP-BLM (green) to centromeres in late G2 cells. Nuclei were visualized by DAPI staining (blue). G2 cells were stained with antibodies against cyclin B1. Cells were stained with CREST serum to visualize centromeres (red). Lower panels are the magnification of the corresponding upper panels. Scale bar = 5 μm .

(B) Two hundred cells with GFP-BLM-positive centromeres were analyzed by staining for cyclin B1 (cyclin B- or cyclin B+). The percentage of cells in each category is indicated (left), together with the mean number of GFP-BLM-positive centromeres per cell (right). Bars indicate the standard deviation (SD).

(C) Localization of GFP-BLM (green) to centromeres (red) in prophase cells. The nucleus and centromeres were visualized as in A. Scale bar = 5 μm .

(D) Localization of GFP-BLM (green) with an inactive helicase domain (GFP-I841T) or with both the helicase and DNA-binding domains inactivated (GFP-G891E). Nuclei and centromeres were visualized as in A. Scale bar = 5 μm .

Figure 1

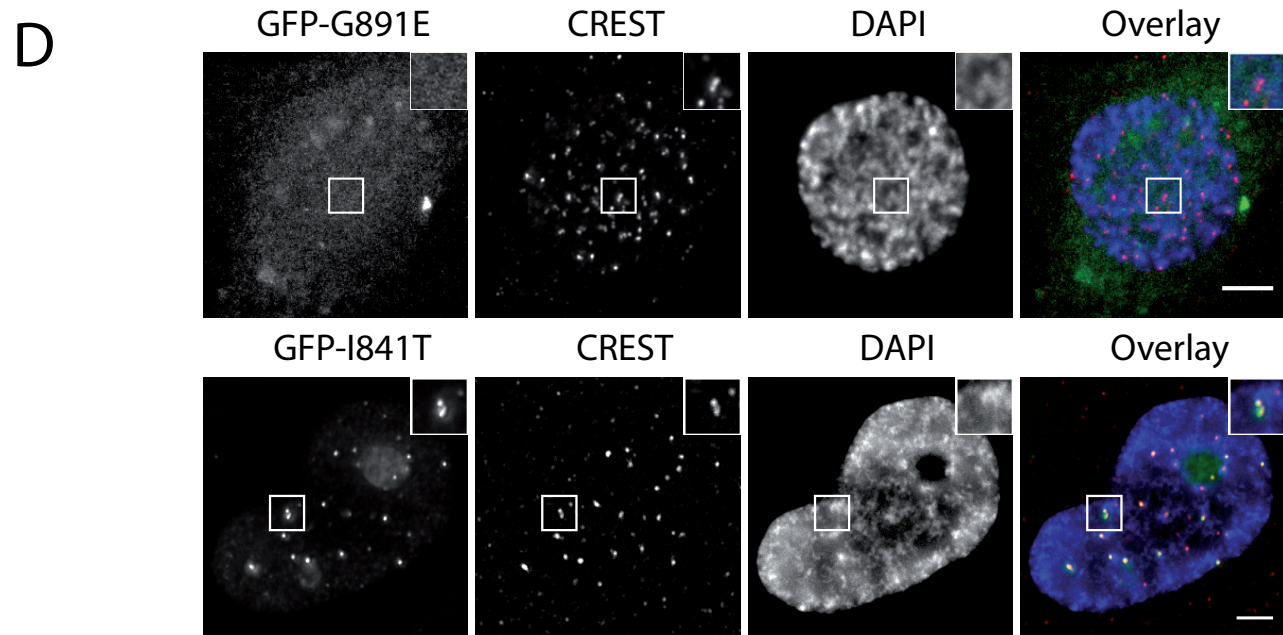
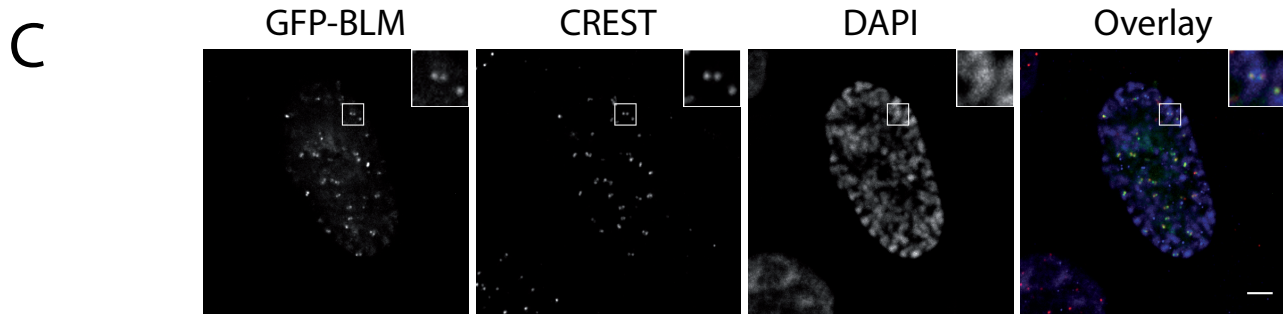
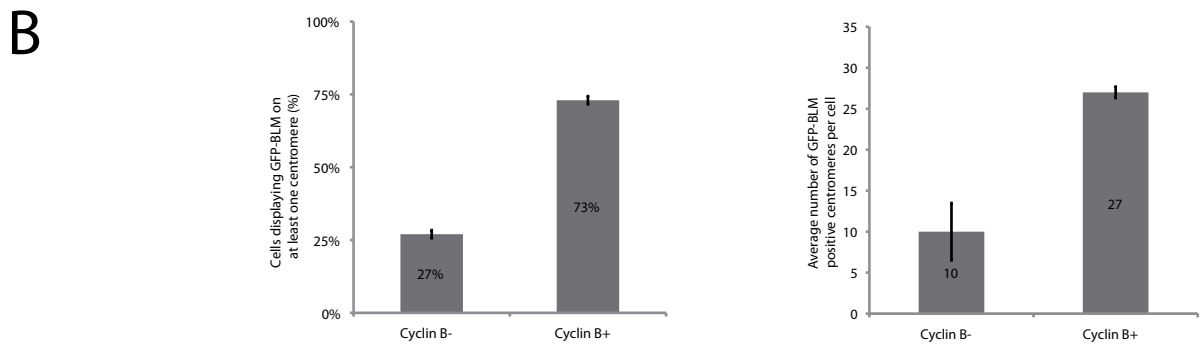
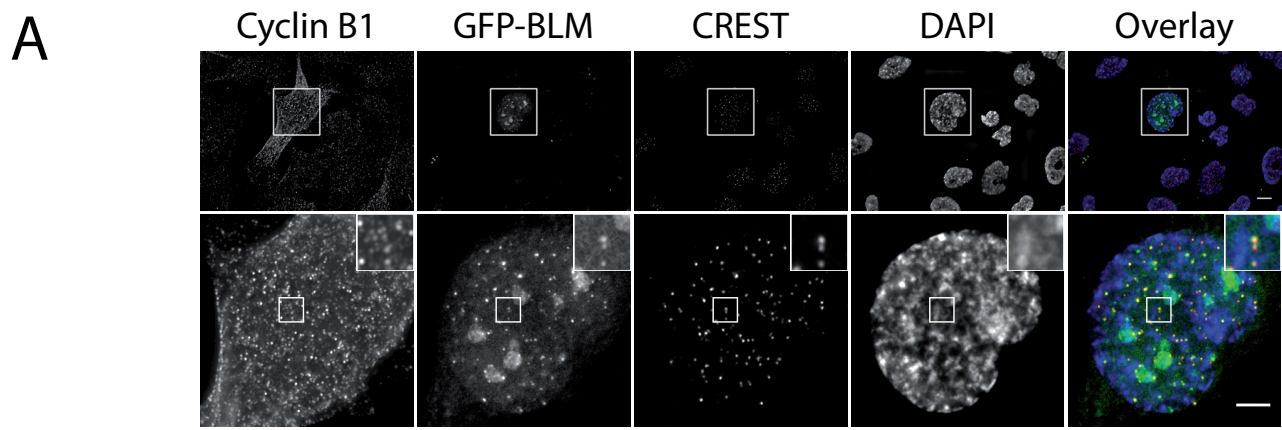


Figure 2

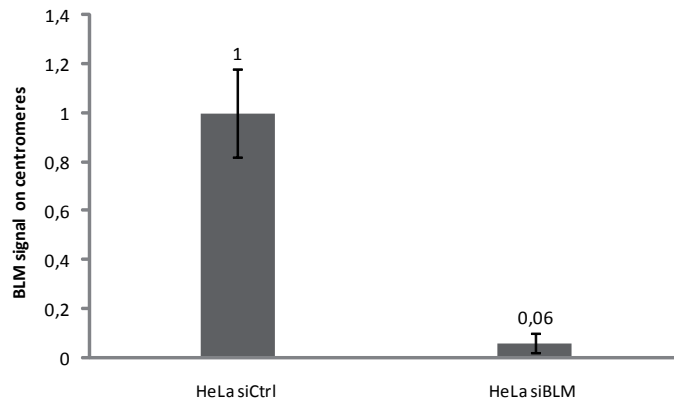
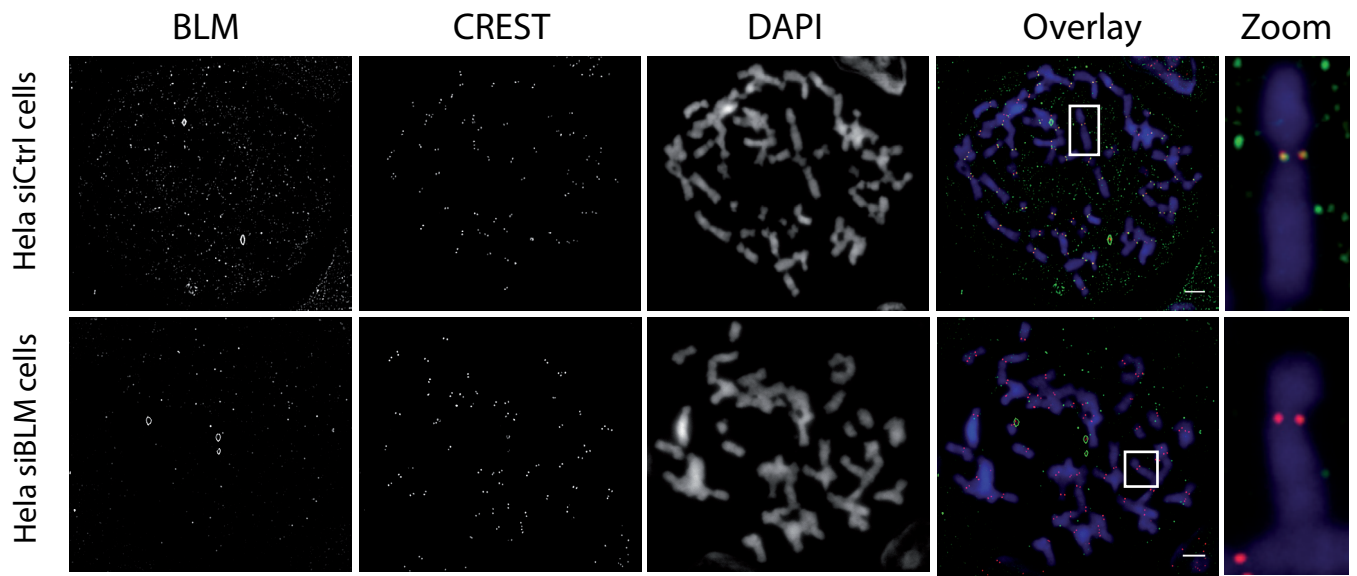
BLM localizes to centromeres in mitotic cells.

(A) Endogenous BLM localizes to centromeres in HeLa cells. Wide-field microscopy after immunofluorescence staining on chromosome spreads obtained by cyto centrifugation of BLM siRNA-transfected or control siRNA-transfected HeLa S3 cells. Staining is shown for BLM (green), CREST (red) and chromosomes (blue). Single chromosome magnifications are shown (upper panels). Quantification of centromeric fluorescence signals for BLM (normalized according to the CREST signal) for a total of 20 centromeres in control cells (siCtrl) and 24 centromeres in BLM-depleted cells (siBLM) from two independent experiments, demonstrate the specificity of AB476 BLM antibodies (lower panel). Data are means and SD normalized with respect to controls. Scale bar = 5 μm .

(B) Centromeres detected with CREST serum (red) from all the chromosomes of HeLa siCtrl cells and HeLa siBLM cells from Figure 1A were analyzed for BLM signal (green). Chromosomes were visualized by DAPI staining (blue) (left panels). The same analysis was performed on a total of 9 HeLa siCtrl cells and 9 HeLa siBLM cells from two independent experiments: the percentage of centromeres displaying BLM signal is shown (right panel).

Figure 2

A



B

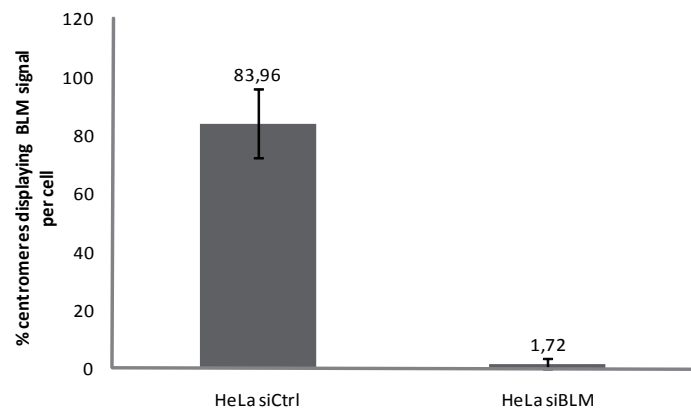
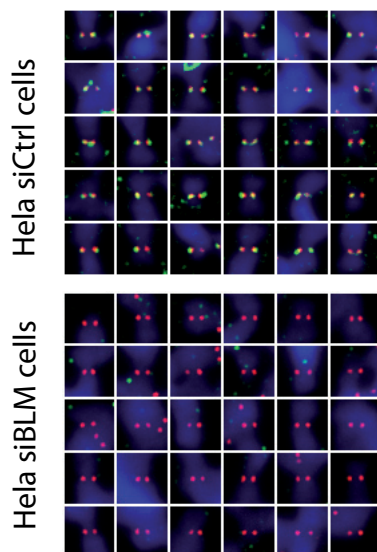


Figure 3

Structural defects at the centromeres in BLM-and PICH-deficient cells.

(A) FISH with the CEN-8 probe (green) on metaphase BS and GFP-BLM cells. Chromosomes are visualized by DAPI staining (red). Bar = 5 μ m.

(B) Comparison of the volume of the centromeric FISH signal detected on chromosomes 8 from GFP-BLM (defined as 1) and BS cells (left panel) and from GFP-BLM cells with (siPICH) and without (siCtrl) PICH downregulation (defined as 1). We analyzed 45 metaphase cells from three independent experiments for each cell line.

(C) GFP-BLM cells (left panel) and BS cells (right panel) were processed for electron microscopy. Scale bar = 1 μ m. Inset: schematic diagram of the regions of interest (white squares) (MT: microtubules, KT: kinetochore outer plate and CC: centromeric chromatin). Eight centromeres from two independent experiments were analyzed.

Figure 3

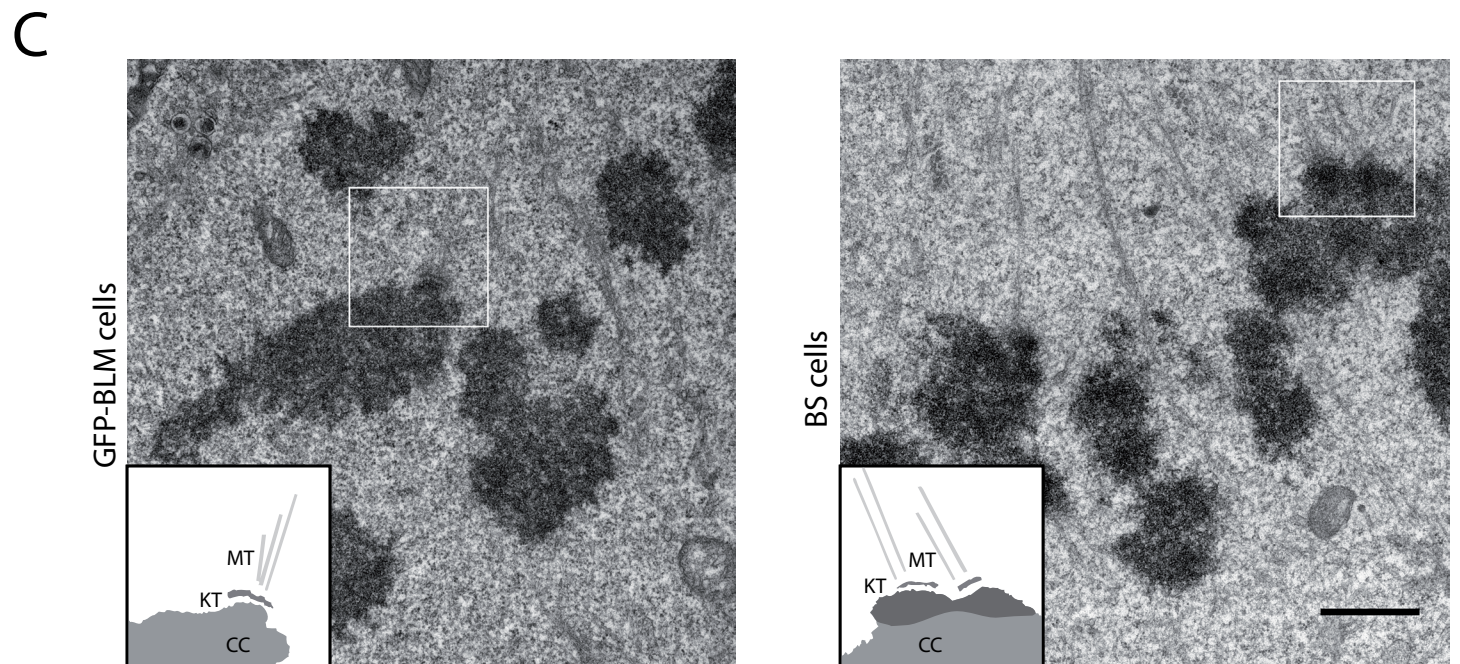
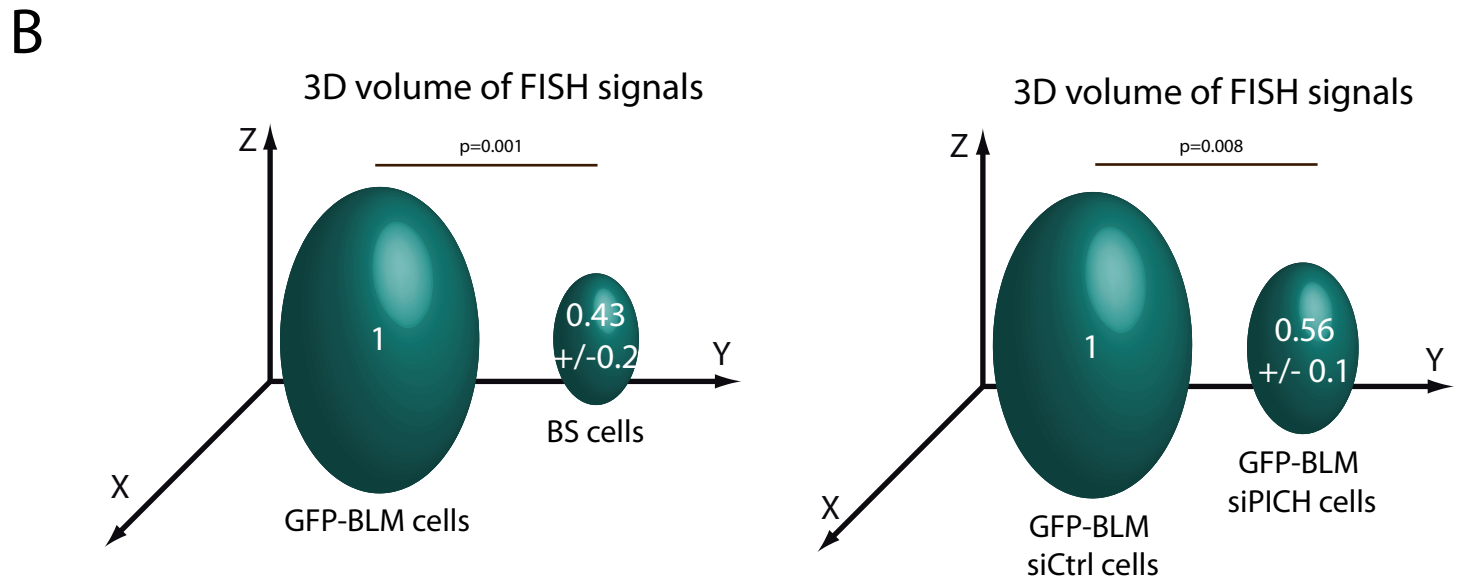
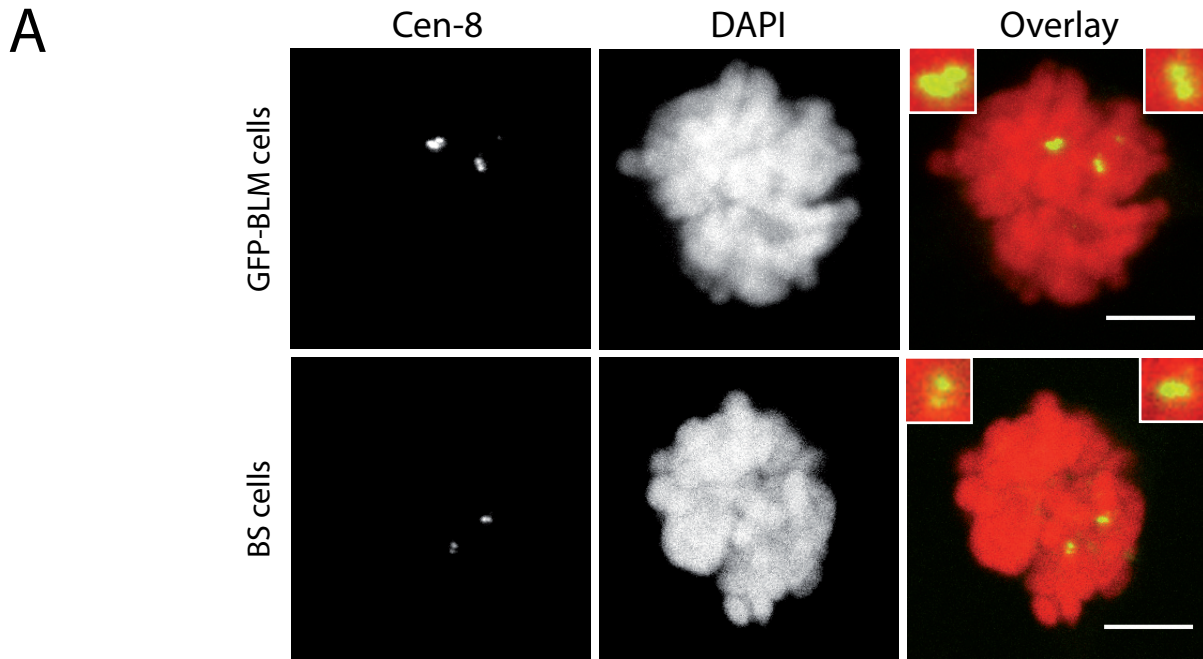


Figure 4

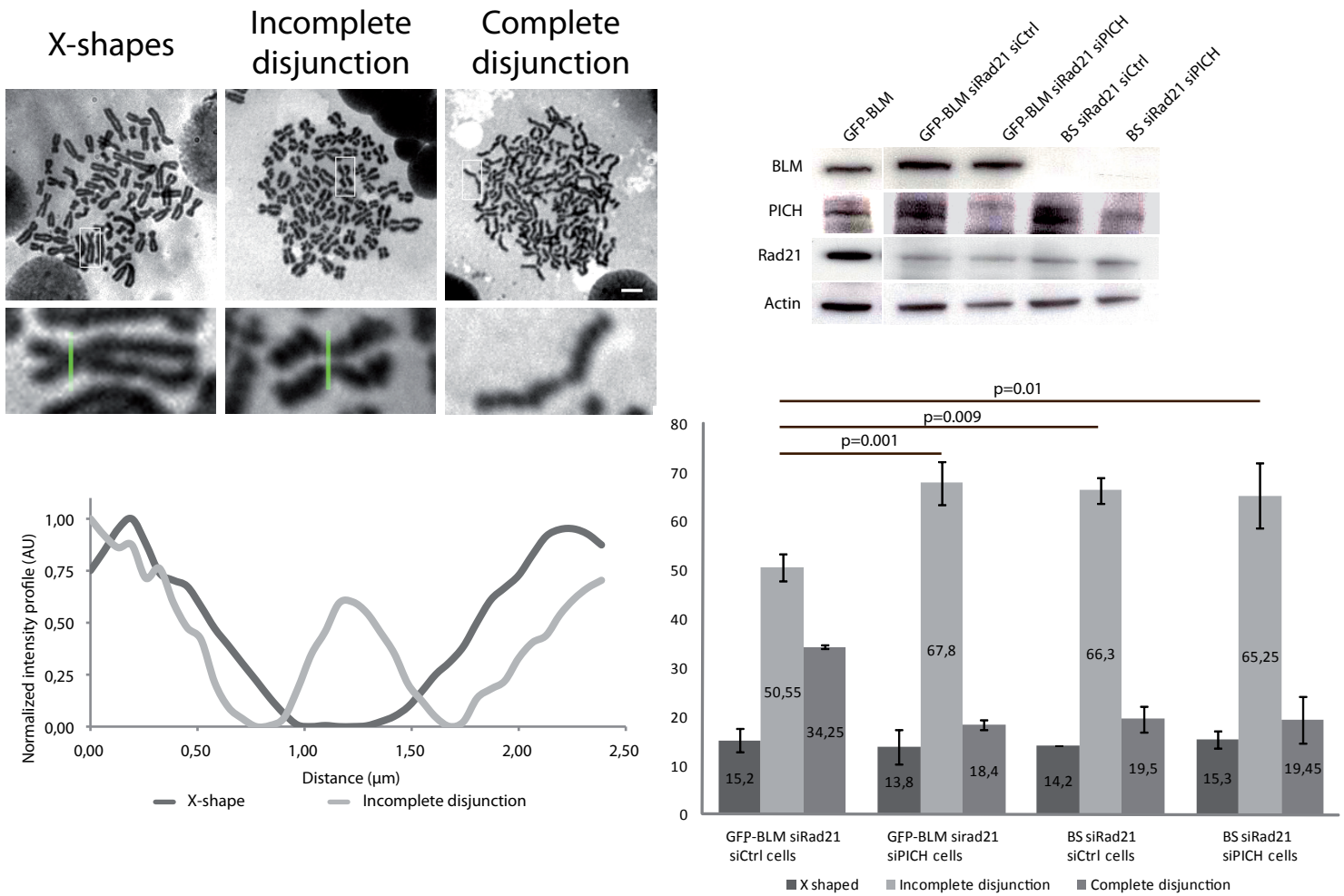
PICH-downregulated and BLM-deficient cells display non disjunction of centromeres and impaired recruitment of active Topo II α to centromeres.

(A) GFP-BLM and BS cells were transfected for 72 hours with RAD21 siRNAs and transfected either with control siRNAs or with PICH siRNAs. BLM, PICH and RAD21 proteins levels were assessed by immunoblotting by probing successively the same membrane with anti-BLM (ab-476), anti-PICH, anti-Rad21 antibody, and with anti-actin antibody, as a loading control (upper right panel). Chromosome spreads were performed and sorted on the basis of their phenotype: X-shapes, incomplete disjunction or complete disjunction. The scale bars indicate 5 μm (upper left panel). This classification is based on the intensity profiles of centromeres (lower left panel). We analyzed 500 spreads from three independent experiments for each cell line. The frequency of each phenotype, in each of the three cell lines, is shown in the histogram (lower right panel). Bars represent SD.

(B) GFP-BLM, BS and GFP-BLM-I841T cells were transfected for 72 hours with RAD21 siRNAs and the same experiments as in (A) (right panel) were carried out. We checked the levels of BLM and RAD21 proteins by western blotting (left panels).

Figure 4

A



B

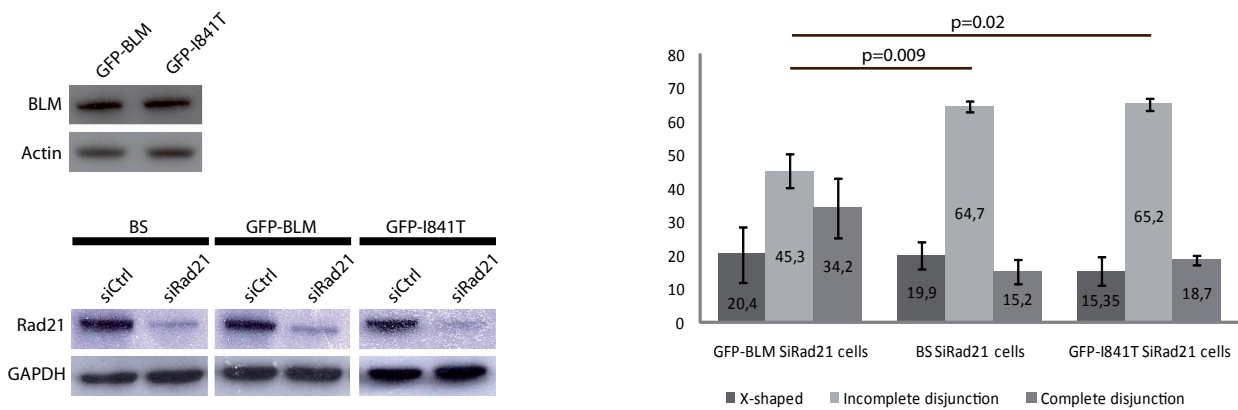


Figure 5

PICH and BLM are required for the recruitment of Topo II α to centromeres.

(A) ChIP-PCR analysis of Topo II α recruitment to pericentromeric region satellite 3 (Sat3) or to the centromeric DNA of chromosomes X (DXZ1) or 17 (D17Z1) was performed in GFP-BLM and BS cells (lower panels). The histogram shows relative enrichment in DXZ1 (DXZ1/Sat3) or D17Z1 (D17Z1/Sat3) sequences for active Topo II α in GFP-BLM (defined as 1) and in BS cells. The results presented are from three independent experiments. Error bars indicate the SD.

(B) We performed the same experiments as in (A), with GFP-BLM cells transfected for 72 hours with control siRNAs or PICH siRNAs.

(C) The amount of Topo II was evaluated in each cell line by western blotting.

(D) We performed the same experiments as in (A), with GFP-BLM, GFP-BLM-I841T and BS cells.

Figure 5

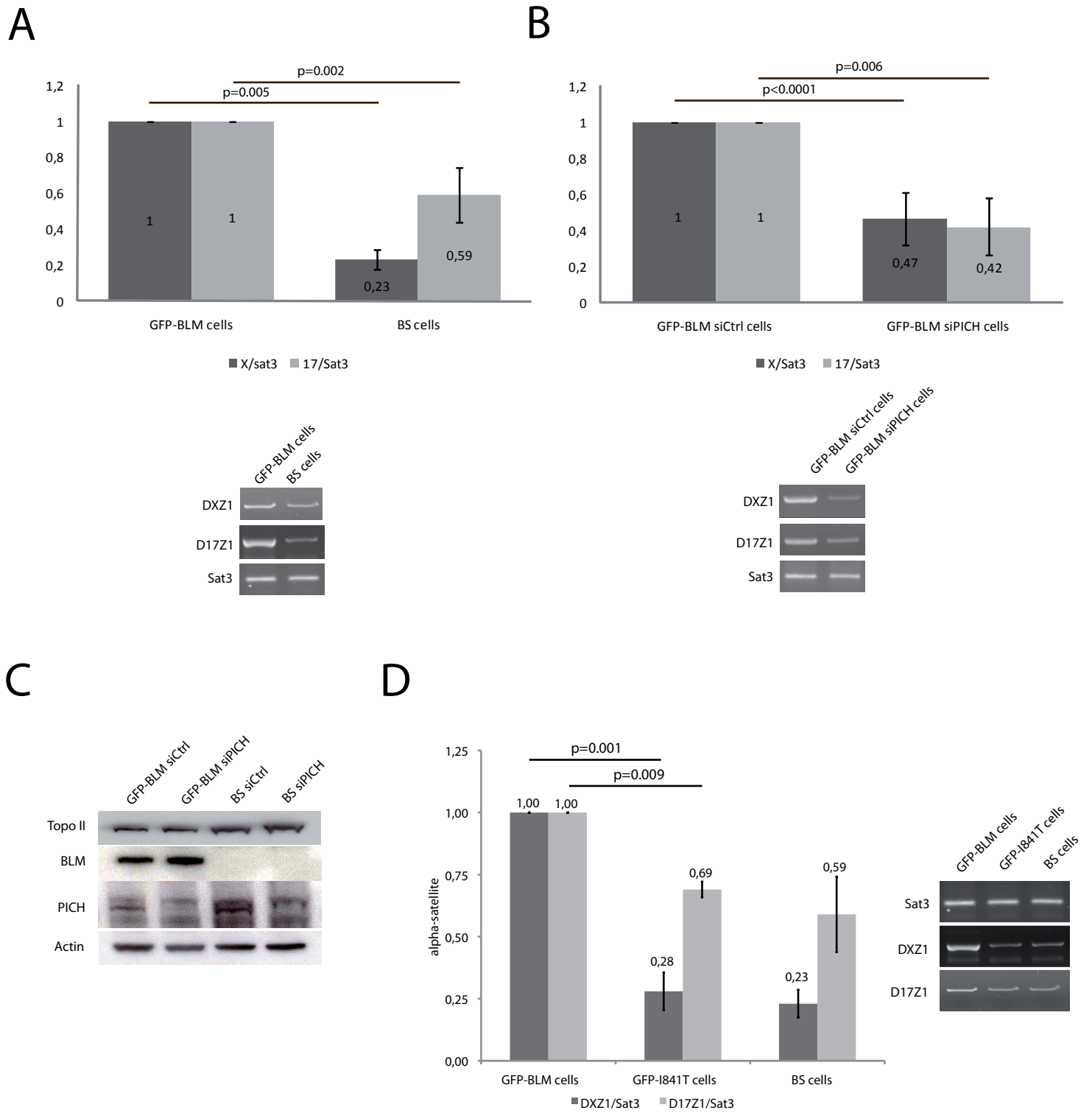
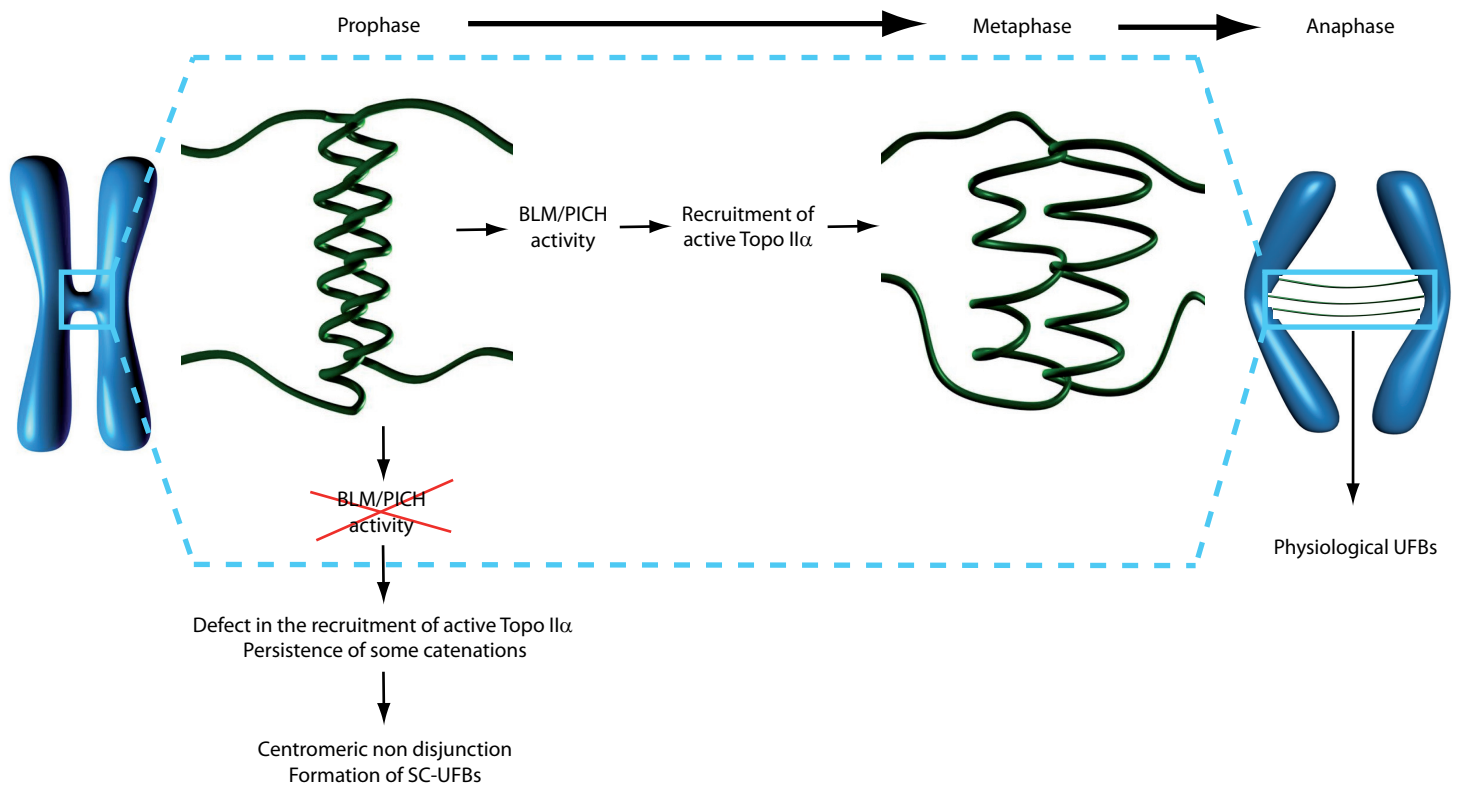


Figure 6

Model of PICH/BLM-dependent decatenation of centromeric DNA.

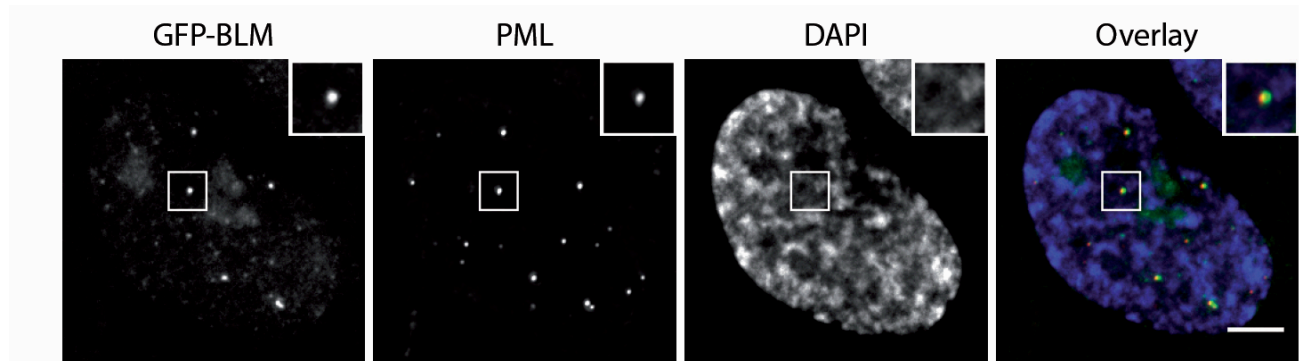
We propose that the combined action of BLM and PICH promotes the organization of centromeric chromatin, thereby rendering some centromeric catenates accessible to Topo II α . In the absence of BLM or PICH, a defect in the recruitment of active Topo II α results in the persistence of some catenations leading to centromeric non-disjunction and the formation of SC-UFBs.

Figure 6



Supporting information

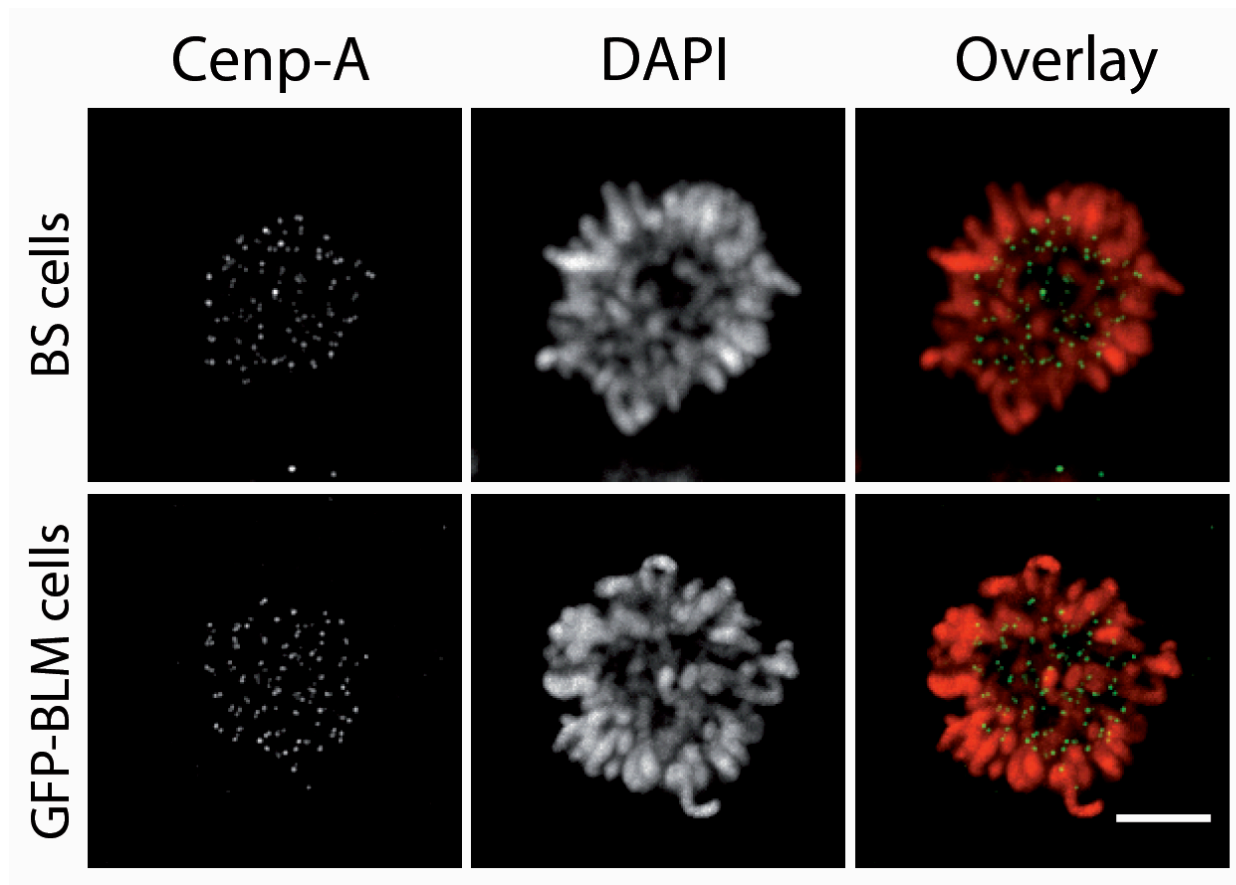
Figure S1



GFP-BLM localized to the PML body.

Co-localization of GFP-BLM (green) with PML (red). Nuclei were visualized by DAPI staining (blue). Scale bar = 5 μ m.

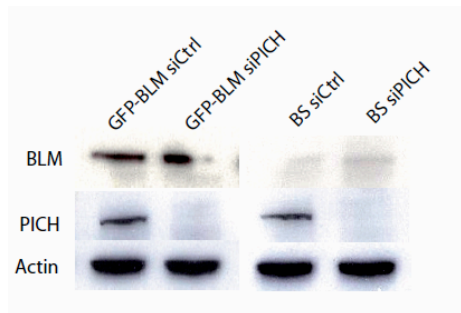
Figure S2



Kinetochores structure is not profoundly affected in BLM-deficient cells.

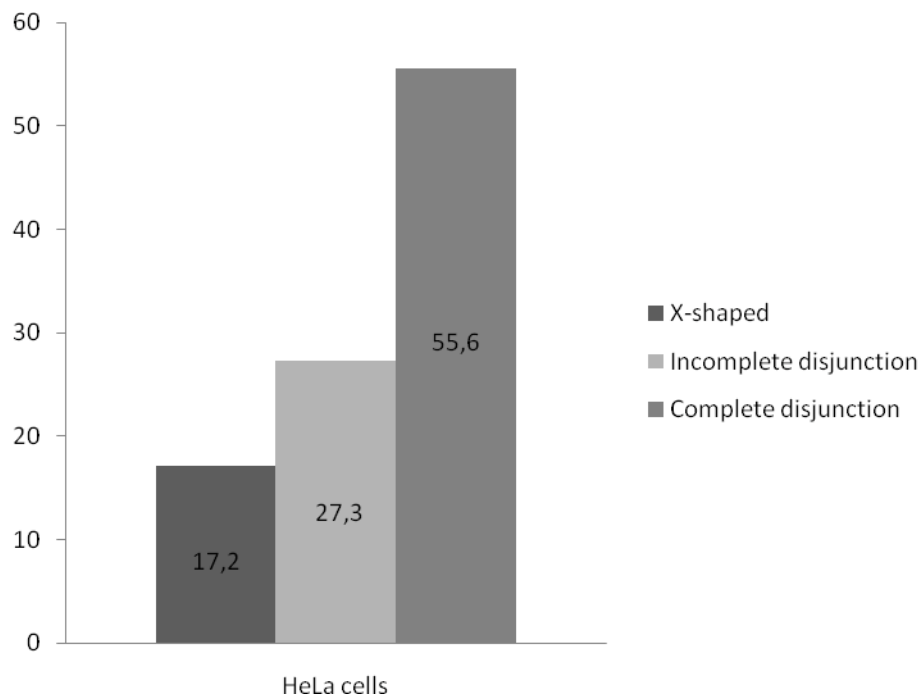
Cenp-A immunostaining of BS and GFP-BLM metaphase cells revealed a similar localization in both types of cells. Chromosomes are visualized by DAPI staining (red). Scale bar = 5 μm . Similar results were obtained with 5 representative kinetochores/centromere proteins (aurora B, Cenp-I, Hec1, Bub1 and BubR1).

Figure S3



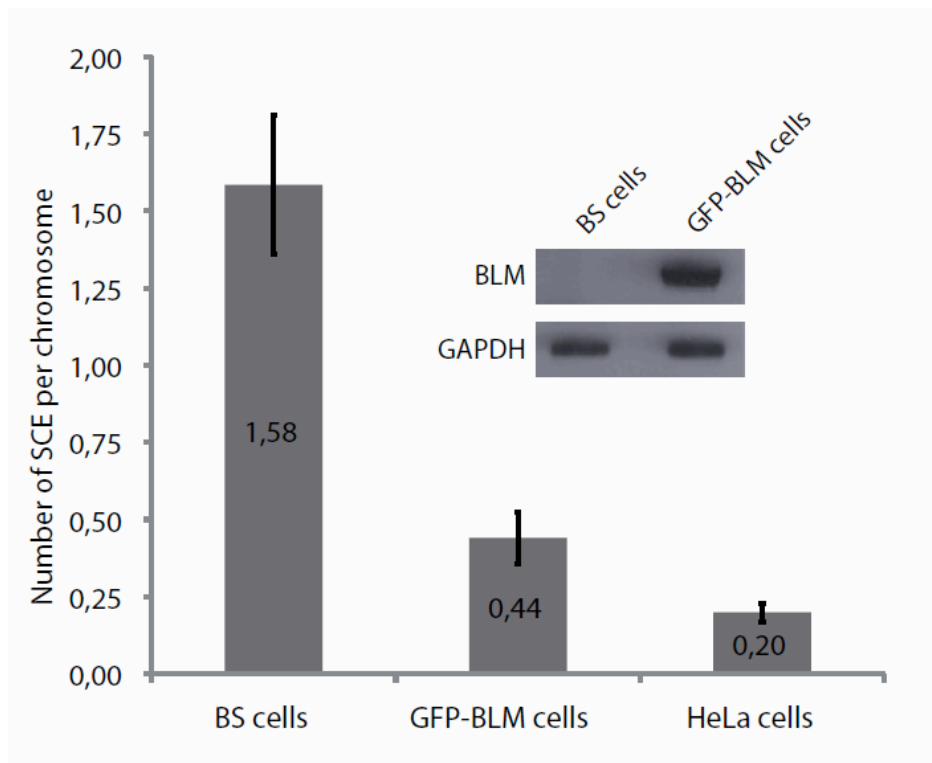
Western-blot analysis of BLM and PICH in GFP-BLM cells with (siPICH) and without (siCtrl) downregulation for PICH and in BS cells with (siPICH) and without (siCtrl) downregulation for PICH.

Figure S4



Chromosome spreads from HeLa cells were performed and sorted on the basis of their phenotype: X-shapes, incomplete disjunction or complete disjunction. The frequency of each phenotype is shown in the histogram. 150 spreads were analyzed.

Figure S5

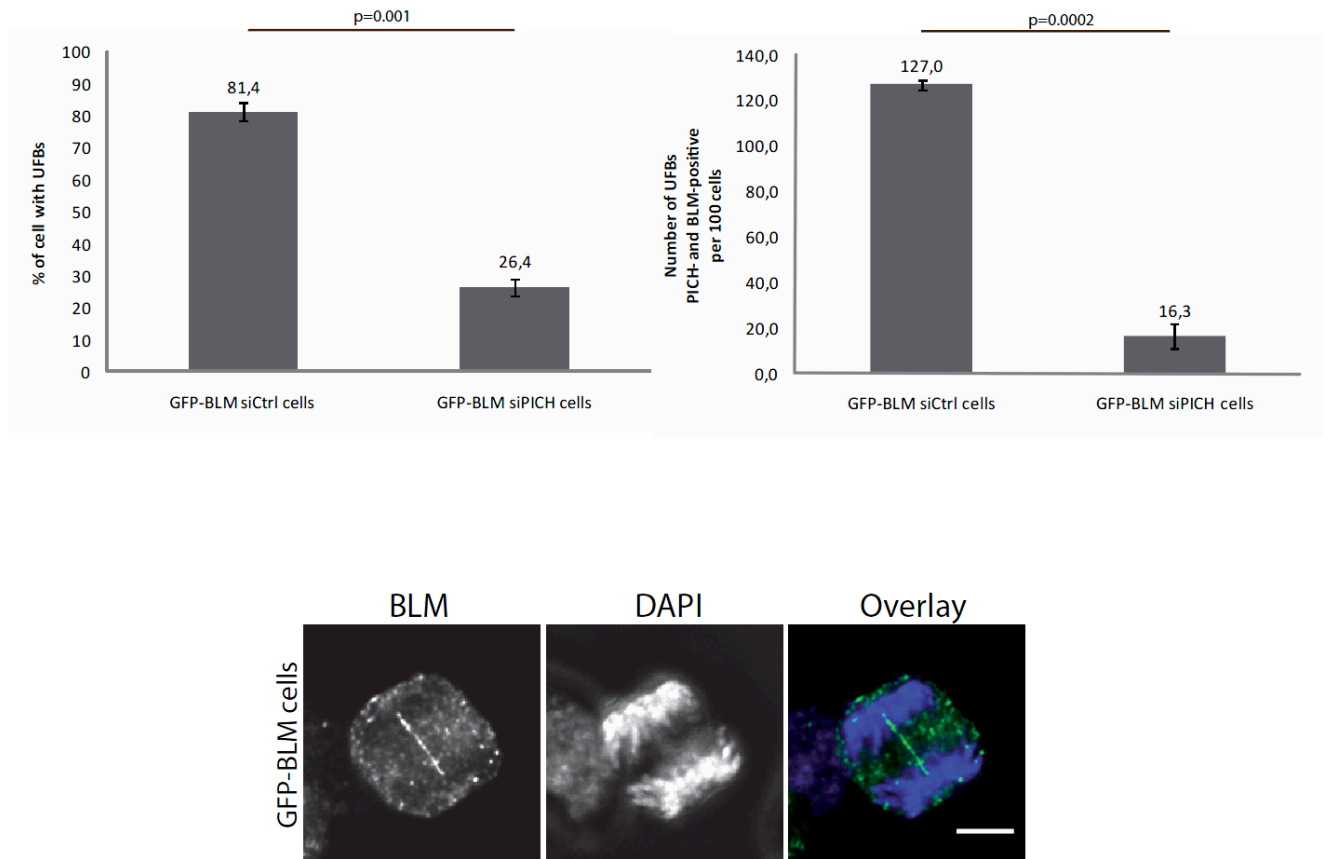


GFP-BLM expression and SCE analysis in GFP-BLM cells.

Western-blot analysis of proteins extracted from BS and GFP-BLM cells (upper right panel).

The graph shows the number of SCEs per chromosome in BS, GFP-BLM and HeLa cells. GFP-BLM cells result in functional complementation, as visualized by a significant decrease in the frequency of sister chromatid exchange (SCE). Between 2809 and 2881 chromosomes from two independent experiments were analyzed for each cell line. Error bars represent the SD.

Figure S6



Centromeric UFBs are not detectables in PICH-deficient cells

(Upper panel) GFP-BLM cells were transfected for 72 hours with PICH siRNAs. UFBs were detected by immunostaining of BLM and PICH and quantified (upper panels). For each condition, 120 cells from three independent experiments were analyzed. Bars represent SD.

(Lower panel) Representative example of an UFB in anaphase cells revealed by BLM staining. Nucleus was visualized by DAPI staining (blue). Scale bar = 5 μm.

Résultats non publiés

LA PROTEINE BLM ET LA TRANSCRIPTION DES CENTROMERES

La protéine BLM étant recrutée aux centromères dès la phase G2 dans les cellules GFP-BLM, nous avons cherché à déterminer l'implication potentielle de la protéine dans d'autres aspects du métabolisme de l'ADN centromérique, en plus de la décaténation. La présence de BLM sur quasi tous les centromères à l'état basal suggère qu'elle n'est pas recrutée dans le cadre d'un processus de réparation de l'ADN. Par ailleurs, une analyse par FISH nous a permis de déterminer que l'absence de BLM n'affectait pas de façon majeure la réplication de l'ADN centromérique. En effet, toutes les cellules BS mitotiques étudiées présentent un signal sous forme de doublets pour le chromosome 8 indiquant que la réplication a bien eu lieu (Cf : Article Figure 3). Cependant, cette technique n'est pas assez résolutive pour déterminer la présence potentielle de petites régions non répliquées et ne permet donc pas d'affirmer que BLM n'est pas impliquée dans la réplication des centromères.

Nous nous sommes ensuite tournés vers la transcription des régions centromériques. Nous avons alors observé que l'absence de BLM ou l'expression d'une protéine BLM ne possédant pas d'activité hélicase conduit à une baisse importante du niveau de transcrits centromériques des chromosomes X et 17. En revanche, l'absence de BLM ne conduit pas à une baisse significative du niveau de transcrits péri-centromériques (**Figure 42**).

Ces résultats nous ont permis de conclure que la protéine BLM est recrutée dès la fin de phases S au niveau de l'ADN centromérique et que son activité hélicase est nécessaire pour la transcription des centromères.

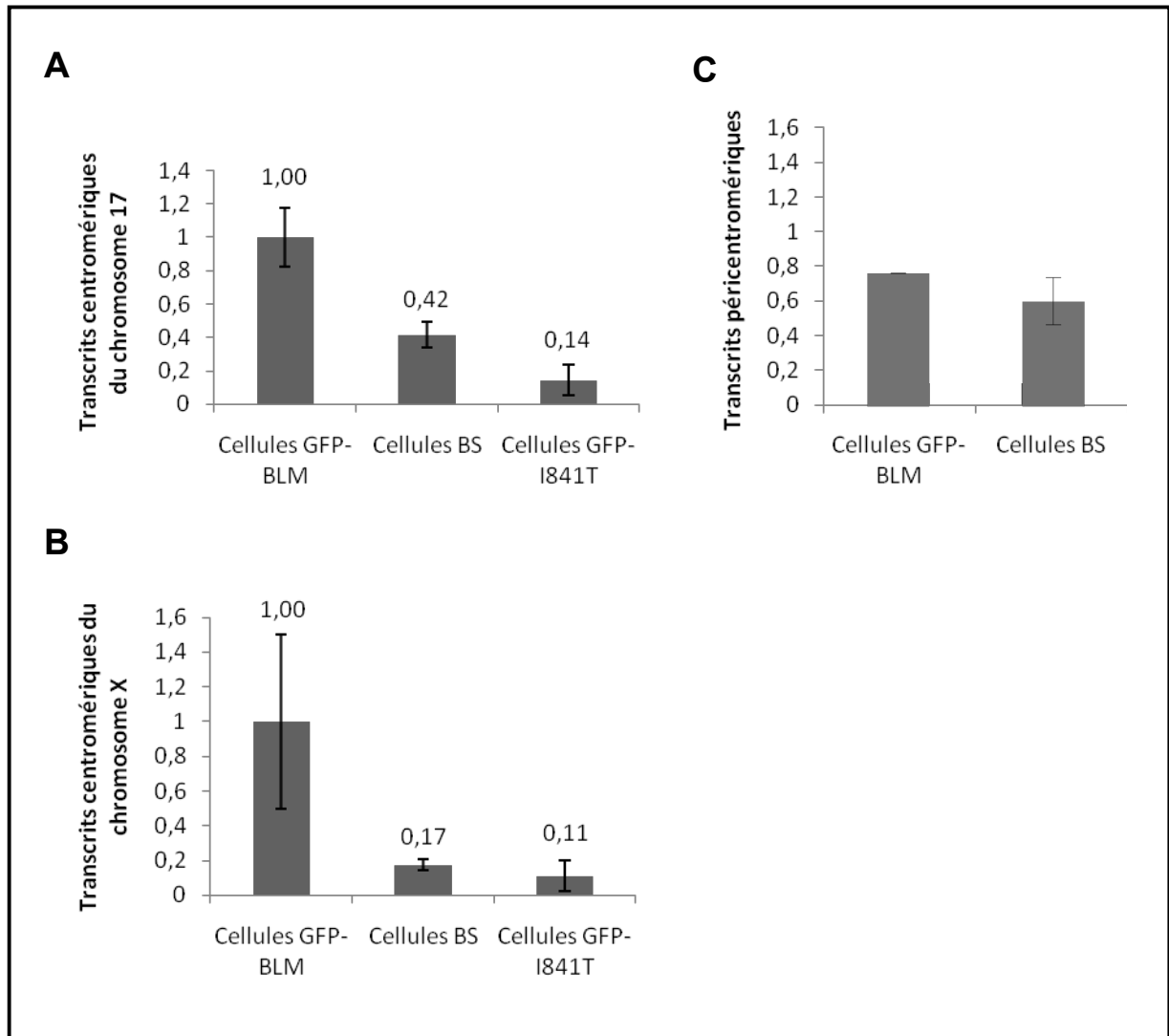


Figure 42 : L'activité hélicase de BLM est nécessaire pour la transcription des centromères

(A) Analyse par PCR semi-quantitative du niveau de transcrits centromériques du chromosome 17 dans des cellules GFP-BLM, GFP-I841T et BS. Les valeurs indiquées représentent la moyenne de trois expériences indépendantes. La barre d'erreur représente la déviation standard à la moyenne.

(B) Analyse similaire à A du niveau de transcrits centromériques du chromosome X.

(C) Analyse similaire à A du niveau de transcrits péri-centromériques du satellite 3.

Figure 43 : Analyse de la fréquence de cUFBs immunomarqués par la protéine RPA

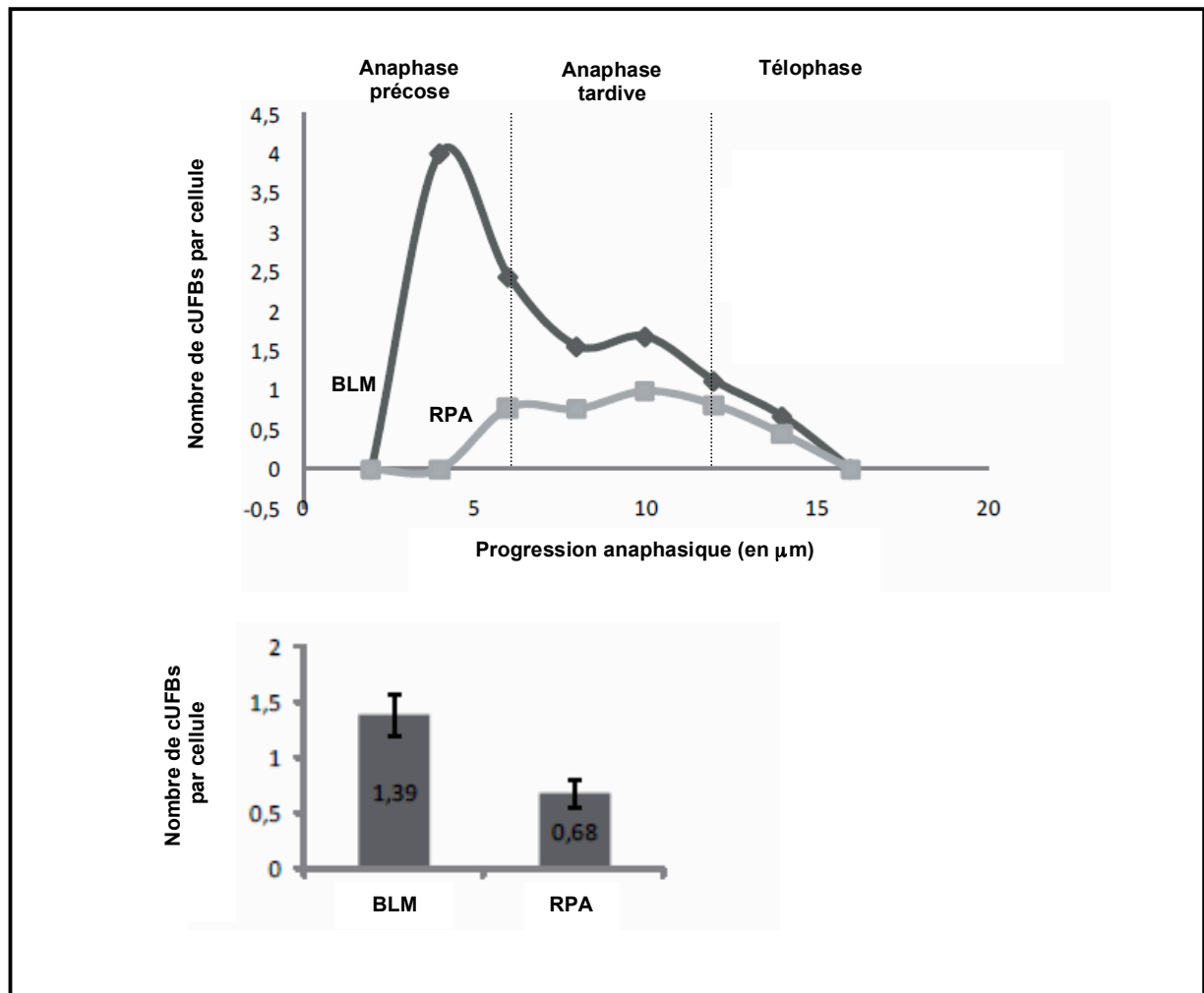
Le graphique représente la fréquence des cUFBs détectés par BLM et/ou RPA par cellule en fonction de la progression anaphasique (distance interpolaire mesurée en μm). Les valeurs indiquées représentent la moyenne de trois expériences indépendantes.

L'histogramme représente le nombre de cUFBs détectés par BLM et/ou RPA par anaphase. Les valeurs indiquées représentent la moyenne de trois expériences indépendantes. La barre d'erreur représente la déviation standard à la moyenne.

LA PROTEINE BLM ET LES UFBS CENTROMERIKES

Actuellement deux modèles ont été proposés afin d'expliquer la résolution des cUFBs (Cf: Présentation du projet de recherche). Tous les deux impliquent l'activité de BLM, cependant l'un propose la résolution des cUFBs par décaténation d'ADNdb au moyen de l'activité de la Topo II α et l'autre par la décaténation d'ADNsb au moyen de l'activité de la Topo III α . Afin d'éclaircir ce point, il fallait déterminer précisément la fréquence des cUFBs contenant de l'ADNsb et donc sur lesquels la protéine RPA était recrutée, en absence et en présence de BLM.

Par des expériences d'immunofluorescence, j'ai montré que dans les cellules GFP-BLM, RPA n'est présente que sur la moitié des cUFBs visualisés par BLM ou PICH (**Figure 43**). Par ailleurs, elle n'est pas détectable sur les cUFBs visualisés par PICH dans les cellules déficientes en BLM.

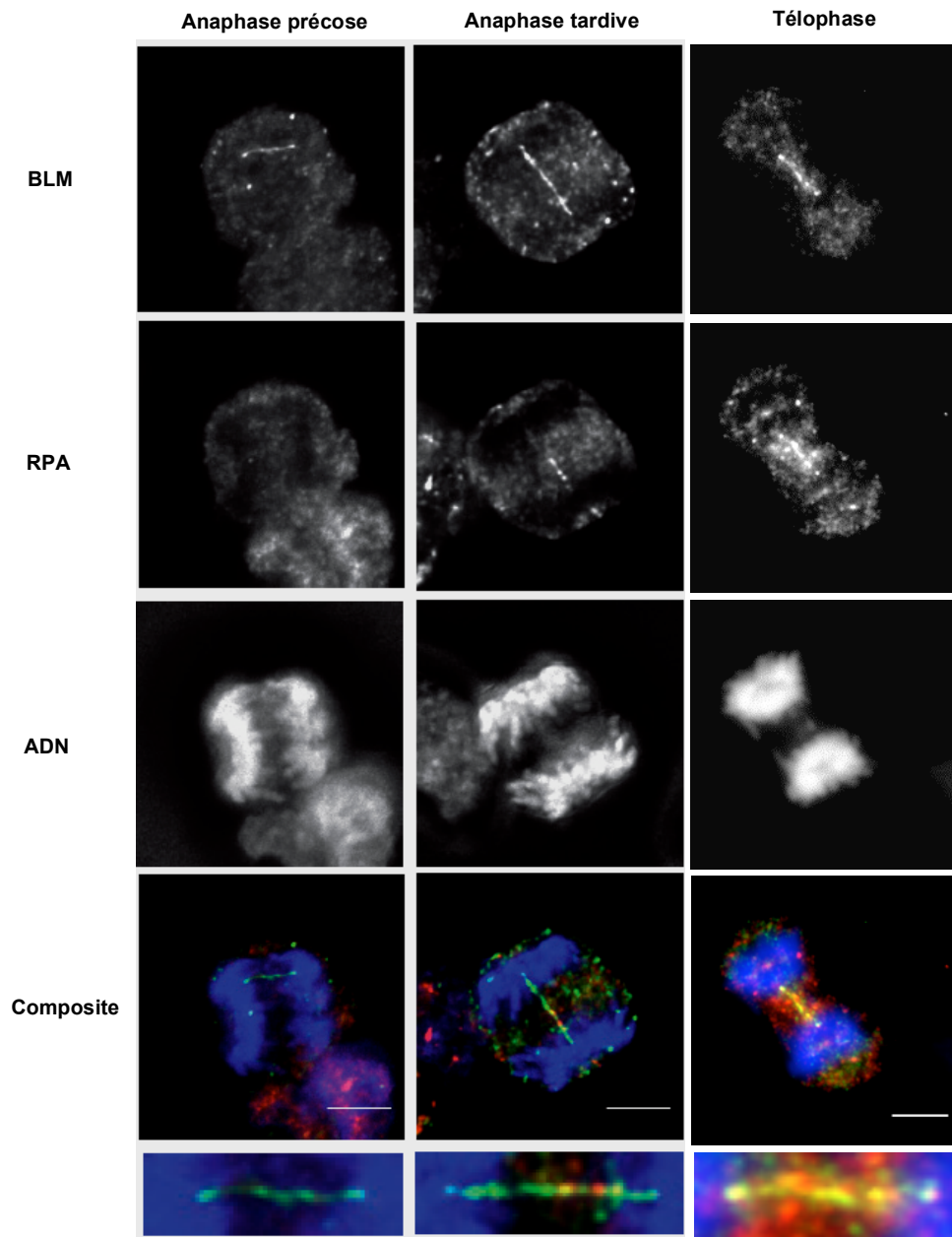
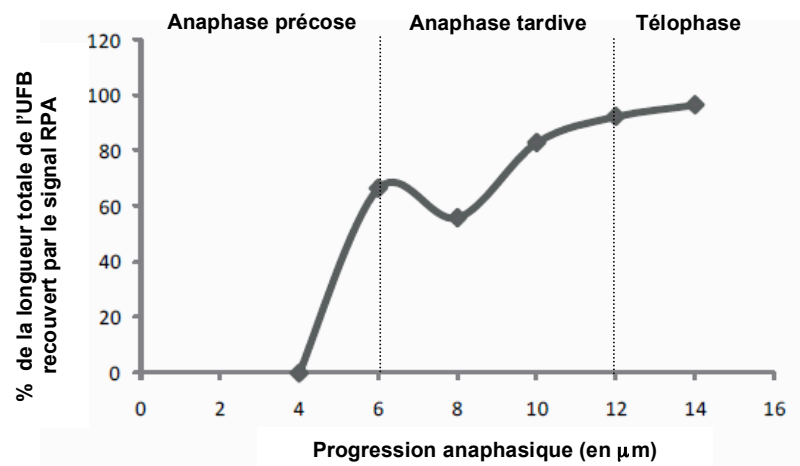


Ces résultats suggèrent que le recrutement de RPA sur les cUFBs est dépendant de la présence de BLM. De manière intrigante, RPA ne recouvre que rarement toute la longueur des cUFBs, contrairement aux protéines BLM ou PICH. L'analyse plus précise de la localisation de RPA sur les cUFBs associée à la mesure de la distance interpolaire du fuseau mitotique a révélé que plus les cellules progressent de l'anaphase vers la télophase, plus la longueur des cUFBs recouverts par RPA augmente. Ainsi en début d'anaphase, RPA est détectée sur une portion du cUFB représentant en moyenne 20% de la longueur totale du cUFB visualisé au moyen d'un marquage BLM, puis elle est détectée sur des portions de cUFBs de plus en plus grandes jusqu'à recouvrir la totalité des cUFBs en fin d'anaphase/début de télophase. Par ailleurs, nous avons remarqué que RPA n'est jamais détectable sur les cUFBs visualisés par un marquage de BLM dans des cellules en anaphase précoce, indiquant que RPA est recrutée sur les cUFBs après le recrutement de BLM. Ces résultats suggèrent que tous les cUFBs sont initialement composés d'ADNdb (**Figure 44**).

L'ensemble de ces résultats indique que BLM permet le recrutement de RPA sur les cUFBs au cours de l'anaphase en accord avec le modèle proposé par Chan et ses collègues (Chan *et al.*, 2009). Nous proposons que BLM catalyse le désappariement progressif des duplexes d'ADN en commençant par la partie centrale des cUFBs générant ainsi de l'ADNsb recouvert et protégé par RPA à mesure de leur formation. Les ADNsb entrelacés pourraient ensuite être résolus par la Topo III α .

Figure 44 : Analyse des marquages de RPA versus BLM sur les cUFBs

(A) Le marquage de RPA (rouge) révèle que cette protéine peut recouvrir partiellement ou totalement les cUFBs immunomarqués par BLM (en vert). L'ADN est coloré en bleu. La barre d'échelle représente 5 μ m.
(B) Analyse du pourcentage de la longueur des cUFBs recouvert par RPA en fonction de la progression anaphasique. Nous avons considéré que la longueur totale des cUFBs est définie par le marquage BLM. Les valeurs indiquées représentent la moyenne de trois expériences indépendantes.

A**B**

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Discussion des résultats

Au cours de ce projet, nous avons non seulement montré pour la première fois que BLM est une protéine centromérique mais nous avons également démontré que, de manière insoupçonnée, BLM est impliquée dans deux processus centromériques majeurs : la décaténation et la transcription.

LOCALISATION CELLULAIRE DE BLM PENDANT LA MITOSE

Dès 2000, Yankiwsky et ses collègues publiaient une étude sur la localisation cellulaire de BLM au cours du cycle cellulaire (Yankiwski *et al.*, 2000). Cette étude avait notamment pour objectif de déterminer une colocalisation entre BLM et certaines structures nucléaires. De manière surprenante, les auteurs en ont conclu qu'à de rares exceptions près, la majorité des foci BLM présents dans des fibroblastes humains ne colocalisaient pas avec les régions centromériques. Cependant, les images présentées dans cette étude ne révèlent pas clairement de doublets centromériques indiquant que les cellules observées sont soit en phase G1 soit en phase S. Cela peut expliquer pourquoi il n'a pas été observé de colocalisation entre BLM et les centromères. Par la suite, on peut raisonnablement supposer que les résultats de cette étude ont « dissuadé » un certain nombre de laboratoires d'orienter leur recherche en ce sens expliquant ainsi notre découverte « tardive » de la localisation de BLM aux centromères pendant la phase G2. En approfondissant notre étude, nous avons montré que cette localisation centromérique perdurait jusqu'en métaphase. Or avant la nôtre, une seule étude s'était penchée sur la localisation cellulaire de BLM pendant la mitose, celle de Chan et ses collègues en 2007 (Chan *et al.*, 2007). Cette étude renseigne sur la localisation de BLM pendant l'anaphase et indique notamment le recrutement de BLM sur les ponts anaphasiques, les chromosomes retardés et les UFBs. La encore, les auteurs n'ont pas décrit BLM aux centromères et, dans ce cas, cela peut être attribuable aux difficultés techniques que nous avons rencontrées. En effet, notre étude s'est tout d'abord révélée particulièrement délicate du fait de la localisation diffuse de la quasi-totalité du pool de protéines BLM pendant la mitose. Cet aspect diffus est attribuable à la grande solubilité de la protéine hyperphosphorylée durant cette phase (Dutertre *et al.*, 2000). Nous avons alors décidé de contourner cette difficulté technique en procédant à l'immunomarquage de BLM sur chromosomes étalés. Cette technique consiste à exposer les cellules à un choc hypotonique qui provoque une entrée d'eau dans celles-ci. La cellule ainsi gonflée est fragilisée et finit par se rompre libérant ainsi dans le milieu extérieur la grande majorité du pool de protéines solubles de

la cellule. Les immunofluorescences réalisées sur ces étalements chromosomiques présentent moins de « bruit de fond » et nous ont permis de montrer pour la première fois la localisation de BLM aux centromères pendant la pré-métaphase et la métaphase.

Il avait été montré par spectrométrie de masse qu'une fraction du pool de BLM phosphorylée est associée au fuseau mitotique pendant la pré-métaphase (Nousiainen *et al.*, 2006). Les fuseaux mitotiques analysés dans cette étude sont composés des pôles, des MTs mais aussi des KT's. Ces résultats pourraient être en accord avec les nôtres. En effet, nous avons observé que BLM ne colocalise pas parfaitement avec le CREST et se situe fréquemment sur la partie externe des centromères correspondant à la plaque interne des KT's (Figure 2 de l'article). Il est évident que ces observations doivent être confirmées en réalisant notamment d'autres expériences de co-immunolocalisation de BLM et des protéines de la plaque interne et externe du KT afin de déterminer sa localisation exacte. L'étude de Nousiainen et ses collègues par spectrométrie de masse a également révélé de nouveaux sites potentiels de phosphorylation de la protéine BLM sur les sérines 419 et 422 (Nousiainen *et al.*, 2006). Il est donc possible qu'un motif de phosphorylation particulier puisse différencier le pool de BLM associé aux centromères du pool soluble. Pour s'en assurer, il pourrait être intéressant de réaliser des constructions GFP-BLM dans laquelle BLM est mutée pour ces sites de phosphorylation et de vérifier ensuite si cette protéine mutée est toujours recrutée aux centromères.

BLM, PICH ET LA DECATENATION DES CENTROMERES

BLM est localisée aux centromères pendant la mitose indiquant que cette protéine doit très certainement y jouer un rôle. Nous avons adopté dans un premier temps une approche structurale et démontré par deux techniques différentes (FISH et microscopie électronique) que l'absence de BLM dans les cellules BS est associée à une organisation différente de l'ADN centromérique pendant la pré-métaphase et la métaphase par rapport aux cellules GFP-BLM (Figure 3 de l'article). En effet, l'ADN centromérique semble plus compacté en absence de BLM. Cette différence d'organisation pourrait être due à une hypercondensation de l'ADN centromérique, voir péri-centromérique. La compaction de la chromatine peut notamment être médiée par des modifications post-traductionnelles des histones et notamment par des méthylations ou acétylations sur leur extrémité N-terminale. Cependant nous n'avons observé aucune différence de niveau protéique entre cellules BS et GFP-BLM concernant les variants d'histones suivants : H3T3Ph, H3K4me2 et H3K9me2/3. Néanmoins, il est important de noter que certains de ces variants d'histones (H3K4me2 et H3K9me2/3) se situent au

centromère/péricentromère mais également sur d'autres régions chromosomiques. Nous ne pouvons donc pas exclure que la technique de western-blot ne soit pas assez résolutive pour percevoir de faibles variations ayant lieu seulement au centromère. Par conséquent, pour pouvoir complètement écarter cette hypothèse des analyses de ChIP pour détecter l'enrichissement en régions centromériques pour chacun de ces variants devront être réalisées.

D'autres facteurs, agissant généralement de concert, affectent également la structure de la chromatine, notamment le remodelage mécanique des nucléosomes par la famille de protéines SNF2 (Ryan et Owen-Hughes, 2011). De manière intéressante, des cellules GFP-BLM déplétées en protéine PICH présentent également une organisation différente de l'ADN centromérique en pré-métaphase et métaphase par rapport aux cellules contrôles. Sachant que BLM est nécessaire à l'activité de remodelage des nucléosomes de PICH au niveau des cUFBs *in vivo*, il est raisonnable de proposer que PICH, en coopération avec BLM, a une fonction de remodelage de la chromatine centromérique en pré-métaphase et métaphase.

BLM et PICH étant toutes deux impliquées dans la résolution des cUFBs, nous avons alors immédiatement envisagé un rôle potentiel de ces protéines dans la prévention de la formation de ces structures. Nous nous sommes posé la question de savoir si BLM et PICH participaient à la décaténation des centromères avant l'anaphase.

Pour y répondre, nous avons analysé des étalements de chromosomes provenant de cellules GFP-BLM pré-métaphasiques et préalablement déplétées en RAD21 (sous-unité clivable de la cohésine) ce qui induit normalement la séparation précoce des chromatides sœurs (Hoque et Ishikawa, 2002) se manifestant par le phénotype "complete disjunction" (Figure 4 de l'article). La déficience en BLM et/ou PICH dans ces mêmes cellules conduit à une fréquence plus élevée de chromatides sœurs non-disjointes au niveau du centromère. Étant donnée l'absence de complexes de cohésine, ce phénotype appelé "incomplete disjunction" pourrait s'expliquer par la persistance anormale de caténanes d'ADN centromériques en absence de BLM et/ou de PICH. Ces caténanes étant résolus par la Topo II α (Diaz-Martinez *et al.*, 2008), nous avons alors évalué par ChIP le recrutement de la Topo II α active aux centromères. Nous avons observé un recrutement de cette enzyme aux centromères nettement moins important en absence de BLM ou PICH (Figure 5 de l'article). Ces données suggèrent fortement que BLM et PICH coopèrent pour rendre accessibles des structures d'ADN qui sont des substrats de la Topo II α , ce qui conduit à son recrutement aux centromères. BLM et PICH participeraient donc au processus de décaténation des centromères prévenant très probablement la formation de cUFBs. Ainsi, non

seulement BLM et PICH seraient nécessaires pour la résolution des cUFBs mais ces protéines préviendraient également leur formation.

La présence « physiologique » de cUFBs indique que la décaténation des centromères ayant lieu en pré-métaphase et métaphase grâce à l'action combinée de BLM et PICH est partielle. Cette décaténation partielle serait une étape nécessaire pour une disjonction correcte des centromères comme l'indiquent nos résultats, mais également pour le bon déroulement du processus de cytokinèse (Wang *et al.*, 2011). Dans des cellules BS ainsi que dans des cellules sauvages traitées avec un inhibiteur de la Topo II α , cette décaténation partielle des centromères n'aurait pas lieu, conduisant à la formation de cUFBs, augmentant ainsi la fréquence totale des cUFBs dans ces cellules. Ainsi, dans les cellules BS, la fréquence élevée de cUFBs aurait deux origines différentes : une partie correspondrait à des cUFBs formés du fait d'une décaténation défailante des centromères en pré-métaphase, et l'autre partie correspondrait à des cUFBs « physiologiques » qui, ne pouvant être résolus en absence de BLM, persistent tout au long de l'anaphase/télophase. Afin de distinguer l'origine de ces cUFBs, nous avons appelé ceux issus de caténations non résolues en pré-métaphase les UFBs centromériques surnuméraires (SC-UFBs).

Par ailleurs, il a été montré que la décaténation des centromères par Topo II α avait lieu uniquement après le retrait de la cohésine à la transition métaphase-anaphase (Wang *et al.*, 2010). Nos résultats montrent pourtant qu'un défaut de recrutement de la Topo II α aux centromères est associé à une augmentation de la fréquence de non-disjonction des centromères indépendamment de la cohésine pendant la pré-métaphase, suggérant qu'une partie des caténanes centromériques n'est pas « protégée » par la cohésine. Nous proposons que seules les caténations situées au niveau des sites de fixation des complexes de cohésine soient protégées jusqu'à l'anaphase donnant ainsi naissance aux cUFBs « physiologiques ». Les caténations situées « entre » les complexes de cohésine seraient résolues avant la transition métaphase-anaphase par l'action de BLM, PICH et Topo II α aux centromères.

RESOLUTION DES UFBs CENTROMERIQUES

Actuellement deux mécanismes qui ne sont pas mutuellement exclusifs et qui impliquent tous deux l'activité de BLM sont proposés pour la résolution des cUFBs :

- PICH en coopération avec BLM permettrait de retirer les nucléosomes situés sur les cUFBs ce qui les rendrait plus souples et ainsi plus résistants à la rupture pouvant être provoquée par les

forces mécaniques du fuseau mitotique au moment de la séparation des chromatides sœurs. Cela permettrait d'obtenir un délai suffisant pour leur décaténation complète par Topo II α (Ke *et al.*, 2011).

- PICH faciliterait le recrutement de BLM sur les cUFBs. BLM pourrait alors catalyser le désappariement des duplexes d'ADN composant les caténanes afin de générer de l'ADNsb pouvant ainsi être décaténé par la Topo III α (Chan et Hickson, 2009).

Nous avons montré que RPA n'est recrutée sur les cUFBs qu'après BLM. Cette observation semble indiquer que tous les cUFBs sont initialement composés d'ADNdb. Nos résultats indiquent également que seuls certains cUFBs présentent progressivement de l'ADNsb visible par immunomarquage de RPA à mesure de la progression anaphasique.

Il est possible d'envisager que la Topo II α ne soit pas capable de décaténer certains cUFBs, notamment en présence de structures secondaires de l'ADN comme des G-quadruplexes au niveau du point de caténation (point de contact entre les deux ADNdb). Or l'une des fonctions de BLM serait de résoudre *via* son domaine hélicase ce type de structures secondaires (Mohaghegh *et al.*, 2001; Sun *et al.*, 1998). Nous proposons alors que BLM réaliserait le désappariement des brins d'ADN au niveau des cUFBs qui comportent des structures secondaires de l'ADN empêchant leur résolution par Topo II α . L'hémicaténane ainsi formé serait alors résolu au moyen de l'activité de Topo III α .

En conclusion, nous pensons que les deux mécanismes proposés co-existent dans la cellule, le second prenant place uniquement sur les cUFBs qui comportent des structures secondaires de type G-quadruplexes empêchant leur résolution par Topo II α .

MECANISME DE REGULATION DE LA TRANSCRIPTION CENTROMERIQUE PAR BLM

Des expériences de RT-PCR semi-quantitative nous ont permis de montrer que la quantité de transcrits centromériques diminue en absence d'une protéine BLM fonctionnelle. Ces résultats posent la question suivante: par quel(s) mécanisme(s) la protéine BLM régule-t-elle positivement l'expression des ARNs centromériques ?

Trois hypothèses peuvent être proposées:

- L'entrée en mitose se caractérise par une importante condensation du matériel génétique donnant naissance aux chromosomes et, dans la plupart des cellules eucaryotes, cette condensation s'accompagne d'une importante baisse de la transcription (Taylor, 1960). Ceci reflète une incompatibilité entre le processus de transcription et l'état condensé des chromosomes certainement due à l'accessibilité réduite de la machinerie transcriptionnelle à la chromatine. Or nous avons montré que l'absence de BLM induit une modification de l'organisation structurale de l'ADN centromérique, induisant un aspect plus compacté de l'ADN. La réduction de la quantité de transcrits centromériques en absence de BLM pourrait donc être attribuée à la modification de la compaction de l'ADN centromérique pendant la mitose. Cependant, les transcrits centromériques sont fortement exprimés dès la phase G2 dans les cellules murines (Ferri *et al.*, 2009). Afin d'éclaircir ce point, des expériences de synchronisation de cellules devront être mises au point afin de déterminer si la transcription des régions centromériques a lieu pendant la phase G2 ou la phase M chez l'Homme. S'il s'avère que cette transcription a lieu dès la phase G2 dans les cellules humaines, à l'instar des cellules murines, il faudrait alors s'assurer que la modification structurale des centromères est détectable dès la phase G2 dans les cellules déficientes en BLM et/ou PICH. Dans le cas contraire, cette hypothèse semblerait alors peu probable et d'autres explications pourraient alors être envisagées.

- Nous avons montré par immunofluorescence que BLM est recrutée au niveau des centromères via son activité de liaison à l'ADN dès la phase G2. Cette observation indique que BLM pourrait être directement à l'origine de l'activation de l'expression transcriptionnelle des centromères via une action au niveau des promoteurs.

Cette hypothèse est confortée par le fait qu'une des fonctions de BLM serait de résoudre *via* son domaine hélicase des structures secondaires de l'ADN et notamment des structures G-quadruplexes (Mohaghegh *et al.*, 2001; Sun *et al.*, 1998). Or une étude a proposé en 2007 que les G-quadruplexes pourraient être directement impliqués dans la régulation de la transcription de gènes. Les auteurs de l'étude ont démontré que les régions de 1000 pb en amont du site de transcription des gènes (d'après la base de données « ENSEMBL ») sont enrichies en séquence consensus de formation de G-quadruplexe (PQS, Potential Quadruplex Sequence) comparées au reste du génome. Plus de 40% des promoteurs de gènes humains contiennent 1 ou plusieurs PQS (Huppert et Balasubramanian, 2007). Cet enrichissement suggère un rôle de ses séquences au niveau du promoteur, ce rôle proposé étant probablement une répression de l'expression du gène par le quadruplexe formé (Huppert et Balasubramanian, 2007). Les PQS ont comme motif consensus : $G_{3+}N_{1-7}$ $G_{3+}N_{1-7}$ $G_{3+}N_{1-7}$ et sont recherchés *in silico* par le programme QuadParser

(Huppert et Balasubramanian, 2005). La présence d'un PQS dans les promoteurs des régions centromériques expliquerait la sous-expression des transcrits centromériques en absence de BLM pour résoudre la structure (disponible sur internet : <http://www.quadruplex.org/>). Néanmoins, les régions centromériques étant particulièrement riches en AT et non en CG, cette hypothèse semble peu probable (du Sart *et al.*, 1997). De plus, des données contradictoires ont été publiées sur l'interaction *in vivo* entre les hélicases de type RecQ et les PQS. Une étude effectuée dans la levure *S. cerevisiae* a montré un enrichissement des PQS dans la région des promoteurs de gènes, et également dans les phases ouvertes de lecture (ORF : Open Reading Frame). En absence de Sgs1, l'homologue de BLM chez *S. cerevisiae*, les ORFs présentant des PQS sont sous-exprimés (Hershman *et al.*, 2008). A l'inverse, une association significative entre gènes surexprimés dans les fibroblastes BS et WRN et gènes portant des PQS a été montrée par une étude comparant les transcriptomes de fibroblastes dérivés de patients BS, WRN (syndrome de Werner) ou RTS (syndrome de Rothmund-Thomson) à des fibroblastes « normaux » (Johnson *et al.*, 2009). L'impact exact de la présence de PQS dans le promoteur et la séquence de gènes sur la régulation de la transcription reste donc mal défini. D'un autre côté, il a été montré que les séquences centromériques favorisent la formation de structures dites en « épingle à cheveux » pour lesquelles BLM a une forte affinité (Jonstrup *et al.*, 2008). Sur la base d'un raisonnement similaire, on peut proposer que la présence de ces structures dans les promoteurs des régions centromériques explique la sous-expression des transcrits centromériques en absence de BLM pour les résoudre.

De manière alternative, BLM pourrait agir directement en tant que facteur de transcription. Cette hypothèse est émise par analogie avec des données concernant une autre hélicase de type RecQ, la protéine WRN, qui a été décrite comme facteur de transcription. Le gène *CYP2B2* du rat et son homologue murin *Cyp2b10* sont tous deux fortement activés dans le foie par le phénobarbital, et il a été montré par ChIP qu'en réponse au phénobarbital, la protéine WRN est recrutée au niveau du promoteur du gène *CYP2B2*. Par ailleurs, des souris homozygotes pour une mutation de WRN provoquant une délétion d'une partie du domaine hélicase, montrent des niveaux d'ARNm *CYP2B10* basal et induit par le phénobarbital diminués par rapport aux animaux sauvages. Enfin, WRN peut se lier avec une séquence spécifique du promoteur *CYP2B2 in vitro*. Ces données suggèrent très fortement qu'en réponse au phénobarbital, la protéine WRN se lie spécifiquement aux promoteurs des gènes *CYP2B2* et *Cyp2b10* et active leur transcription (Lachaud *et al.*, 2009). WRN et BLM sont toutes deux des hélicases de type RecQ et partagent de très nombreuses similarités fonctionnelles et structurales. Ainsi, il est envisageable que BLM puisse, comme WRN,

se lier à des séquences spécifiques sur certains promoteurs afin d'activer la transcription des gènes en aval.

Pour vérifier l'une ou l'autre de ces deux hypothèses, il faudrait tout d'abord repérer les régions promotrices des séquences centromériques, s'il elles existent, qui n'ont pas été identifiées à ce jour. Un argument en faveur de l'existence de séquences régulatrices repose sur le fait que l'expression des ARNs centromériques murins est finement régulée : ainsi, ces ARNs sont à peine détectables en phase G1 et présentent une forte accumulation en phase G2/M (Ferri *et al.*, 2009). Si ces séquences régulatrices sont identifiées, des expériences de CHIP devront être réalisées pour révéler la présence de BLM au niveau des promoteurs des centromères ainsi que pour comparer le recrutement de RNA pol II au niveau des centromères dans des cellules BS et GFP-BLM. Ces expériences pourraient nous permettre de démontrer pour la première fois que la protéine BLM peut avoir une action directe sur l'expression de certains gènes.

- Une troisième hypothèse impliquant directement Topo II α peut également être proposée. En effet, nous avons montré que le recrutement de Topo II α active aux centromères est considérablement diminué en absence de BLM. Or chez la levure même si l'absence de Top2 ne bloque pas le processus de transcription, elle l'inhibe considérablement (Brill *et al.*, 1987; Gartenberg et Wang, 1992; Goto et Wang, 1985). De plus, *in vitro*, Topo II α s'associe avec la RNA polymérase II et est nécessaire à son activité de transcription sur un substrat d'ADNdb (Mondal et Parvin, 2001). Cependant, il a été démontré depuis que la Topo I peut également activer la RNA polymérase II sur ce même type de substrat (Mondal *et al.*, 2003). Ces résultats semblent indiquer que, à l'instar de la réplication, les Topo I et II sont également nécessaires au processus de transcription probablement pour résoudre les superenroulements en amont de la machinerie de transcription. Le cas échéant, le défaut de recrutement de Topo II α aux centromères observés dans les cellules BS pourrait être la cause de la diminution de la transcription centromérique. Pour vérifier cette hypothèse, il faudrait alors analyser l'activité de transcription centromérique dans des cellules déplétées en PICH par rapport aux cellules contrôles car l'absence de PICH induit également un défaut de recrutement de la Topo II α aux centromères et dans des cellules traitées par des inhibiteurs de la Topo II α .

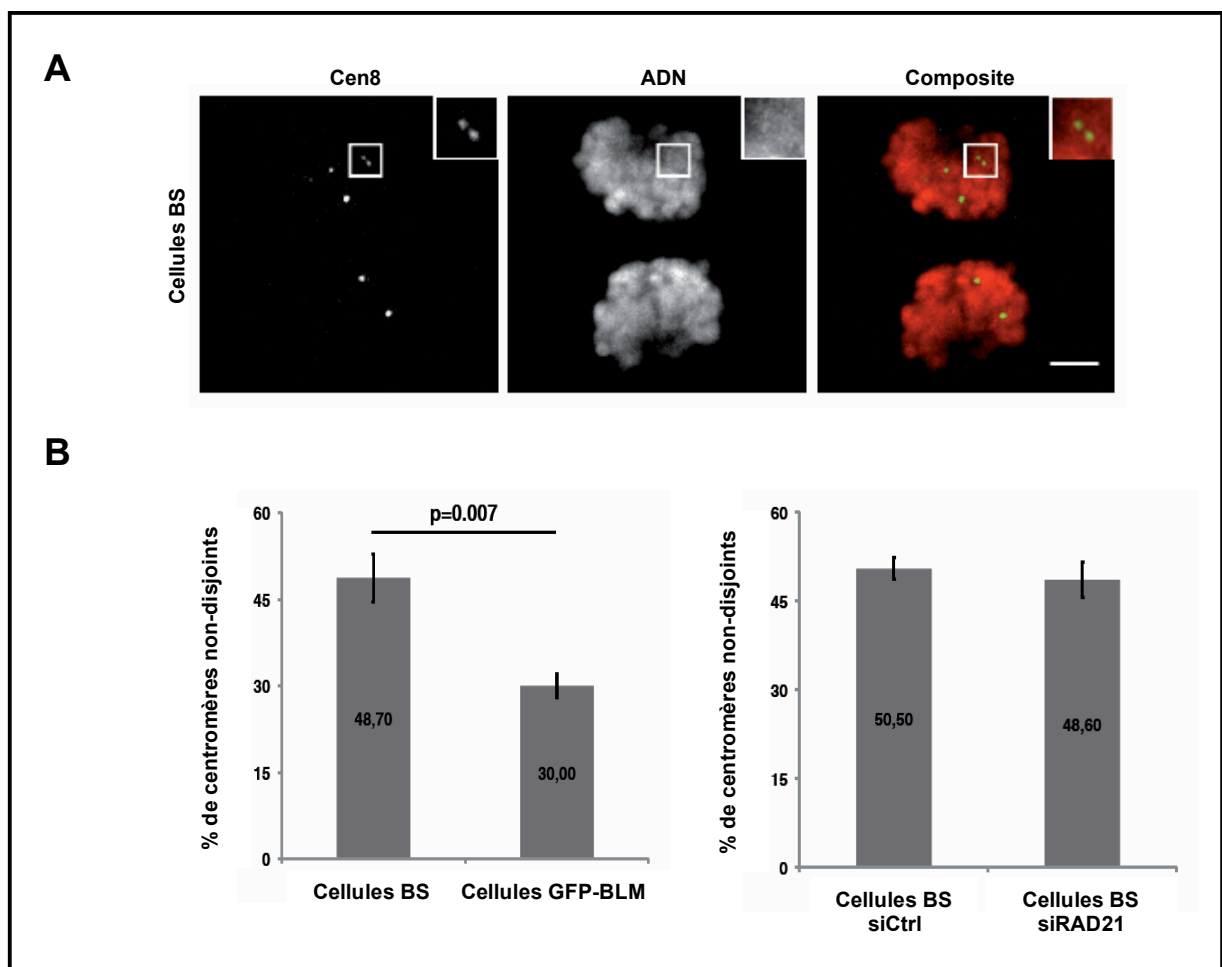
Figure 45 : Analyse des non-disjonctions des centromères du chromosome 8 dans les cellules BS en anaphase

(A) Détection par hybridation d'une sonde ADN fluorescente (Cen8) spécifique des séquences centromériques du chromosome 8 dans des cellules BS et GFP-BLM en anaphase. Exemple de non-disjonction révélée par Cen8 (en vert) dans des cellules BS. L'ADN est marqué en rouge. La barre d'échelle représente 5 μ m.
(B) Quantification du pourcentage de non-disjonctions des centromères du chromosomes 8 détectées dans les cellules BS et GFP-BLM en anaphase (histogramme de gauche). Même type de quantification dans des cellules BS ayant été préalablement transfectées par des siRNA contrôles ou des siRNA dirigés contre RAD21 (histogramme de droite). Les valeurs indiquées représentent la moyenne de trois expériences indépendantes. La barre d'erreur représente la déviation standard à la moyenne.

Implication du rôle de BLM aux centromères dans le phénotype BS

La diminution significative de l'efficacité des activités de décaténation et de transcription des centromères associée au déficit en protéine BLM fonctionnelle pose la question de son rôle dans la physiopathologie du syndrome de Bloom.

Nos résultats permettent d'expliquer au moins en partie l'augmentation des cUFBs caractéristique des cellules BS. Cependant, les cellules BS se caractérisent également par une fréquence élevée d'anomalies mitotiques comme des ponts anaphasiques et des chromosomes ou fragments de chromosome retardés (German, 1969). De manière intéressante, nous avons observé que l'absence de BLM conduit également à la non-disjonction des centromères du chromosome 8 pendant l'anaphase, et ce même en absence de cohésine, indiquant que la non-disjonction des centromères observée en absence de cohésine en pré-métaphase dans les cellules BS persiste en anaphase (**Figure 45**).



Il est donc probable que la non-disjonction des centromères soit à l'origine d'au moins une partie si ce n'est la totalité des ponts anaphasiques et chromosomes retardés observés dans les cellules BS. En accord avec cette hypothèse, nous avons détecté des centromères au niveau de la majorité de ces anomalies de ségrégation des chromosomes dans les cellules BS (**Figure 46**). De manière cohérente, Ke et ses collègues ont également observé la présence de centromères dans les micronoyaux contenus dans les cellules BS (Ke *et al.*, 2011).

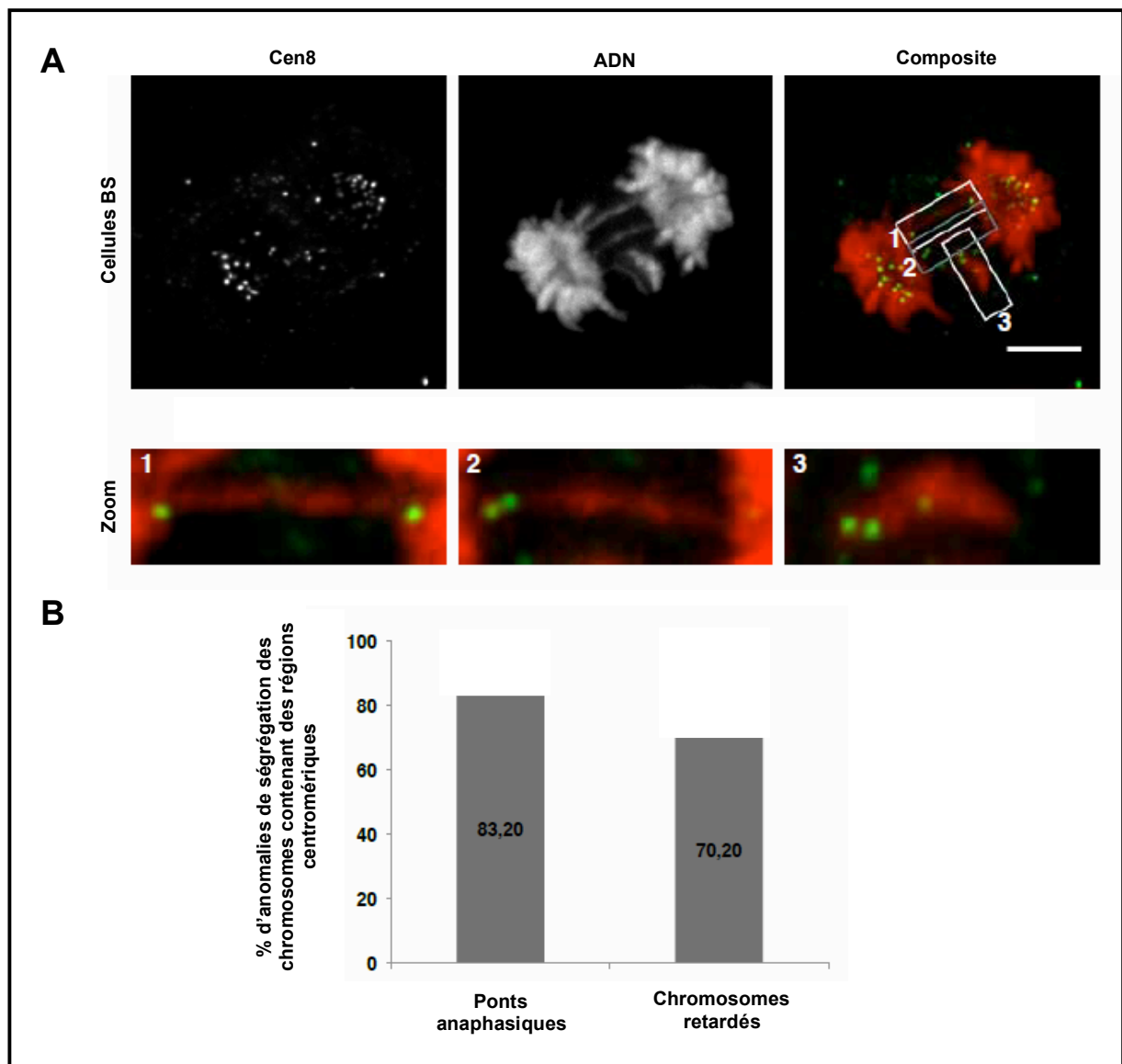


Figure 46 : Détection de régions centromériques au niveau des anomalies mitotiques dans les cellules BS

(A) Immunomarquage de la protéine CENP-A pour déterminer la présence de centromères au niveau d'anomalies de ségrégation des chromosomes dans les cellules BS. Exemples de localisation de CENP-A (en vert) sur des ponts anaphasiques et des chromosomes retardés. L'ADN est marqué en rouge. La barre d'échelle représente 5 μ m.

(B) Quantification du pourcentage d'anomalies de ségrégation des chromosomes contenant des régions centromériques dans les cellules BS. Les valeurs indiquées représentent la moyenne de trois expériences indépendantes.

L'ensemble de nos résultats permet d'envisager deux mécanismes distincts et non-exclusifs pour expliquer la fréquence élevée de non-disjonctions des centromères observée en anaphase dans les cellules BS :

- Le premier mécanisme repose sur les caténations d'ADN. En effet, nos résultats suggèrent fortement que la décaténation des centromères est incomplète dans les cellules BS. Ainsi, la présence d'une caténation persistant anormalement au centromère pendant l'anaphase conduira à la formation d'un SC-UFB. Il semblerait que ce SC-UFB, comme tous les UFBs, résulte du « débobinage » de l'ADN centromérique au niveau de la caténation à mesure de la progression anaphasique évitant ainsi la rupture des molécules d'ADN par les forces mécaniques du fuseau mitotique. Il est alors raisonnable de penser que la présence de plusieurs caténations au niveau d'un même centromère perturbe le « débobinage » de cet ADN et provoque alors une non-disjonction des centromères. Ce « débobinage » peut être soit partiellement inhibé et aboutir à la formation d'un pont anaphasique, soit complètement inhibé du fait de la présence d'un plus grand nombre de caténations et aboutir à la formation d'un chromosome retardé.

- Le second mécanisme repose sur l'activité d'Aurora B. Il a été montré que l'inhibition ou la déplétion de la Topo II α conduit à des attachements anormaux des MTs aux KT's, en l'occurrence à des attachements syntéliques, indiquant que l'activité de décaténation de la Topo II α est essentielle pour établir un attachement correct des chromosomes (Coelho *et al.*, 2008). Or, nos résultats montrent un recrutement plus faible de la Topo II α active aux centromères en absence de BLM. Il peut ainsi être proposé que les anomalies mitotiques observées dans les cellules BS pourraient être la conséquence d'attachements incorrects des MTs au niveau des KT's. En outre, en absence de la Topo II α , le SAC semble incapable de détecter l'attachement de deux kinétochores d'un même chromosome à un même pôle (Coelho *et al.*, 2008), ce qui expliquerait pourquoi nous n'avons pas observé d'arrêt mitotique prolongé dans les cellules BS. Cette défaillance du SAC pourrait être due au fait qu'en absence de Topo II α , l'activité kinase d'Aurora B est significativement réduite. Étant donné le rôle de cette protéine dans la maintenance de l'activité du SAC en réponse à un manque de tension entre KT's frères, les cellules déficientes en Topo II α ne peuvent pas répondre correctement et ne mettent donc pas de mécanismes de correction de l'attachement en place. Par ailleurs, les transcrits centromériques murins potentialisent fortement l'activité kinase d'Aurora B *in vitro*. L'absence de BLM conduisant à une diminution drastique du niveau de transcrits centromériques, il est donc envisageable que cette diminution engendre également une baisse de l'activité kinase d'Aurora B et la formation d'attachements

incorrects des chromosomes. Ce second mécanisme impliquant l'activité kinase d'Aurora B semble séduisant mais nécessite d'être approfondi. Il conviendrait notamment d'effectuer des tests de l'activité kinase d'Aurora B dans des cellules GFP-BLM et de comparer les résultats avec les cellules BS.

Il est clair que cette hypothèse nécessite d'être confirmée par des expériences supplémentaires. Cependant au vu de nos résultats et des mécanismes décrits ci-dessus, il est très probable que la fréquence élevée d'anomalies mitotiques caractéristique des cellules BS, soit effectivement due, au moins en partie, à l'absence d'activité de la protéine BLM au niveau des centromères.

Conclusion

Ces travaux ouvrent de nouvelles voies dans la compréhension du phénotype BS pendant la mitose, qui pourrait ne pas être exclusivement la conséquence de l'absence de BLM pendant la phase S, comme il le fut longtemps pensé. En effet, mes résultats indiquent qu'au moins une partie des anomalies mitotiques associées au syndrome de Bloom est la conséquence de l'absence de l'activité hélicase de BLM pendant la phase G2 et la mitose. De plus, nos résultats montrant l'importance de BLM pour la décaténation des séquences centromériques, sont peut-être le reflet d'une fonction beaucoup plus large de BLM au niveau de séquences répétées en tandem telles que les séquences d'ADN ribosomique et télomérique. Cette hypothèse attractive est renforcée par une série de travaux montrant (1) par des expériences d'immunoprécipitation de chromatine, que l'hélicase BLM se lie aux séquences d'ADN répété ribosomique et télomérique pendant les phases S et G2 du cycle cellulaire (Schawalder *et al.*, 2003), (2) que BLM interagit avec des protéines télomériques (TRF1 et TRF2), suggérant un rôle important de BLM dans la structure et le maintien de la longueur des télomères, notamment dans la régulation de la formation de la T-loop (Bhattacharyya *et al.*, 2010; Lillard-Wetherell *et al.*, 2004; Stavropoulos *et al.*, 2002; Yankiwski *et al.*, 2000), (3) une fréquence élevée d'associations télomériques entre les bras des chromosomes homologues dans des cellules BS, qui seraient la conséquence soit d'intermédiaires de recombinaison non-résolus soit de caténations persistantes ((Lillard-Wetherell *et al.*, 2004) et (4) la présence de certains d'UFBs d'origine télomérique (Chan *et al.*, 2009). Nos résultats pourraient ainsi être à l'origine d'un nouveau champ d'investigation à l'interface des phases S, G2 et Mitose pour caractériser le rôle de BLM dans la décaténation post-répllicative des séquences répétées en tandem.

ANNEXES

DNA Damage and Cellular Stress Responses

The Bloom Syndrome Protein Limits the Lethality Associated with RAD51 Deficiency

Kenza Lahkim Bennani-Belhaj^{1,2}, Sébastien Rouzeau^{1,2}, Géraldine Buhagiar-Labarchède^{1,2}, Pauline Chabosseau^{1,2}, Rosine Onclercq-Delic^{1,2}, Emilie Bayart¹, Fabrice Cordelières^{3,4}, Jérôme Couturier^{5,6}, and Mounira Amor-Guélet^{1,2}

Abstract

Little is known about the functional interaction between the Bloom's syndrome protein (BLM) and the recombinase RAD51 within cells. Using RNA interference technology, we provide the first demonstration that RAD51 acts upstream from BLM to prevent anaphase bridge formation. RAD51 downregulation was associated with an increase in the frequency of BLM-positive anaphase bridges, but not of BLM-associated ultrafine bridges. Time-lapse live microscopy analysis of anaphase bridge cells revealed that BLM promoted cell survival in the absence of Rad51. Our results directly implicate BLM in limiting the lethality associated with RAD51 deficiency through the processing of anaphase bridges resulting from the RAD51 defect. These findings provide insight into the molecular basis of some cancers possibly associated with variants of the *RAD51* gene family. *Mol Cancer Res*; 8(3); 385–94. ©2010 AACR.

Introduction

Bloom's syndrome displays one of the strongest known correlations between chromosomal instability and a high risk of cancer at an early age. Bloom's syndrome is caused by mutations in the *BLM* gene, which encodes BLM, a RecQ 3'-5' DNA helicase (1). The hallmark of Bloom's syndrome cells is a high rate of sister chromatid exchange (SCE), generally thought to be the consequence of replication-dependent double-strand breaks. SCEs are mediated by homologous recombination (HR; refs. 2-4). BLM deficiency is associated with replication abnormalities and an increase in HR (1). *In vitro*, BLM unwinds DNA structures mimicking replication forks and HR intermediates. It catalyzes the regression of replication forks and works with topoisomerase III α , RMI1, and RMI2 to dissolve double Holliday junctions (5-10). BLM inhibits the D-loop formation catalyzed by RAD51 by displacing RAD51 from ssDNA, thereby disrupting nucleoprotein filaments (11). *In vivo* evidence that BLM can disrupt RAD51 polymerization has also been reported (12). Re-

cently, SUMOylation of BLM has been shown to regulate its association with RAD51 and its function in HR-mediated repair of damaged replication forks (13). In several models, it has been proposed that BLM restarts replication after the stalling of the fork, thus preventing HR-dependent fork restart (14-16). The Bloom's syndrome phenotype also includes a significant increase in the frequency of anaphase bridges and lagging chromosomes during cell division, indicating a defect in sister chromatid separation during mitosis (17). BLM localizes to anaphase bridges and is required for their elimination (17), suggesting that BLM helps to resolve aberrant chromosome structures generated during DNA replication (17, 18). Moreover, BLM is associated with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI)-negative ultrafine DNA bridges (UFB), which are thought to be derived from replication or recombination intermediates (17). In particular, BLM localizes to UFBs and to conventional DAPI-positive anaphase bridges associated with fragile sites and is required for their resolution (19). RAD51 downregulation significantly increases fragile-site expression under both normal conditions and replication stress (20). These data suggest that a functional relationship between BLM and RAD51 may also exist during mitosis. Using RNA interference to downregulate BLM and/or RAD51 in HeLa cells, we show here that BLM and RAD51 interact functionally in both interphase and mitotic cells. Indeed, we report an epistatic interaction between *BLM* and *RAD51* in SCE formation. We also show that (a) RAD51 acts upstream from BLM to prevent anaphase bridge formation; (b) RAD51 downregulation is associated with an increase in the frequency of BLM-positive anaphase bridges, but not of BLM-associated UFBs; and (c) BLM downregulation increases the levels of cell death associated with RAD51 downregulation. Our results indicate that BLM acts downstream from RAD51 to resolve

Authors' Affiliations: ¹Institut Curie, Centre de Recherche, Centre Universitaire; ²CNRS, UMR 2027; ³Institut Curie, Centre de Recherche, Plateforme d'Imagerie Cellulaire et Tissulaire, Centre Universitaire; ⁴CNRS, UMR 146, Orsay, France; ⁵Institut Curie, Hôpital, Service de Génétique Oncologique; and ⁶INSERM, U830, Paris, France

Note: Supplementary data for this article are available at Molecular Cancer Research Online (<http://mcr.aacrjournals.org/>).

Current address for E. Bayart: Centre de Génétique Moléculaire, UPR CNRS 2167, Bâtiment 24, Avenue de la Terrasse, Gif sur Yvette, France.

Corresponding Author: Mounira Amor-Guélet, Institut Curie, CNRS UMR 2027, Centre Universitaire, Bâtiment 110, Orsay 91405, France. Phone: 33-1-69-86-30-53; Fax: 33-1-69-86-94-29. E-mail: mounira.amor@curie.u-psud.fr

doi: 10.1158/1541-7786.MCR-09-0534

©2010 American Association for Cancer Research.

RAD51-mediated Holliday junctions or to rescue anaphase bridges resulting from RAD51 deficiency, probably at difficult-to-replicate DNA sequences such as fragile sites.

Materials and Methods

Cell Cultures and Transfections

HeLa cells were used, as previously described (21). HeLaV cells and HeLashBLM cells were obtained by transfecting HeLa cells with an empty pSM2 vector or a pSM2 vector encoding a short hairpin RNA (shRNA) sequence directed against BLM (Open Biosystems, clone V2HS-89234), respectively, using JetPEI reagent (Ozyme) according to the manufacturer's instructions. After 48 h, selection with 1 to 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ puromycin (Invivogen) was applied. Individual colonies were isolated and maintained in growth medium containing 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ puromycin.

HeLa cells producing H2B fused to green fluorescent protein (GFP) were kindly provided by Dr. Kevin F. Sullivan (NUI Galway, Galway, Ireland; ref. 22). For siRNA transient transfection assays, 3×10^5 to 4×10^5 cells were added to 3 mL of medium in each well of a six-well plate. Cells were transfected by incubation with siRNAs specific for BLM or RAD51 (ON-TARGETplus, SMARTpool, Dharmacon) or with negative control siRNAs (ON-TARGETplus siCONTROL Non Targeting Pool, Dharmacon) at a final concentration of 100 nmol/L (single transfections) or 200 nmol/L (cotransfections) for 24 to 72 h, in the presence of DharmaFECT I (Dharmacon), used according to the manufacturer's instructions.

Chemicals

Hydroxyurea (Sigma) was used at a final concentration of 2 mmol/L.

Assays to Assess the Efficiency of Colony Formation

Untreated cells were plated in a drug-free medium at three different densities, in triplicate, for the counting of 30 to 300 clones depending on expected survival. After 14 to 21 d of incubation, colonies were fixed and stained with methylene blue (5 g/L in 50% water and 50% methanol) and scored. Only experiments giving a linear correlation between the different dilutions were considered. Colony-forming efficiency was estimated by dividing the number of colony-forming units by the number of cells plated.

Western Blot Analysis

Cells were lysed by incubation in 1% SDS in water or in 350 mmol/L NaCl, 50 mmol/L Tris-HCl (pH 7.5), 1% NP40, 1 mmol/L NaF, and protease inhibitors (23) for 30 min on ice, sonicated, and heated. Samples equivalent to 1.25×10^5 or 2.5×10^5 cells or to 45 μg of protein were subjected to SDS-PAGE in a 5.5% or 12% SDS polyacrylamide gel or in NuPAGE Novex 4% to 12% Bis-Tris pre-cast gels (Invitrogen), respectively. The procedures used for

gel electrophoresis and immunoblotting were as previously described (24).

Antibodies

All the commercial antibodies were used according to the manufacturers' specifications. The primary antibody used against BLM was ab476 (1:1,000; rabbit, Abcam). We used rabbit polyclonal antibodies against RAD51 (1:1,000; AB-1, Calbiochem) and β -actin (1:10,000; Sigma).

Horse radish peroxidase-conjugated goat anti-mouse IgG and goat anti-rabbit IgG (Santa Cruz Biotechnology) were used at a dilution of 1:5,000. Alexa Fluor-488-conjugated donkey anti-goat IgG antiserum was obtained from Molecular Probes, Inc., and used at a dilution of 1:600.

Reverse Transcription-PCR Analysis

Total RNA was extracted with Trizol reagent (Invitrogen). The first-strand cDNA was synthesized with 250 ng of random hexamers (Invitrogen), 5 μg of RNA, and SuperScript II reverse transcriptase (Invitrogen) in the presence of 40 units of RNase Inhibitor (Promega). Amplification was carried out with Taq polymerase (Promega) and specific ssDNA primers for BLM (5'-gaagatgctcaggaaagtac-3' and 5'-gcagatgttttctctgatcttc-3') and 18S rRNA (QuantumRNA 18S Internal Standards, Ambion) as an internal control for 25 PCR cycles (denaturation at 95°C for 40 s, annealing at 56°C for 30 s, extension at 72°C for 40 s).

SCE Assays and Chromosomal Aberration Analysis

Cells were transfected as indicated. After 24 to 40 h of siRNA transfection, cells were transferred to slides and cultured in the presence of 10 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 5-bromodeoxyuridine (Sigma) at 37°C in an atmosphere containing 5% CO₂. After 40 h, colchicine (Sigma) was added to a final concentration of 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and the cells were incubated for 1 h. Cells were incubated in hypotonic solution [1:6 (v/v) FCS-distilled water] and fixed with a 3:1 (v/v) mixture of methanol-acetic acid. Cells were then stained by incubation with 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Hoechst 33258 (Sigma) in distilled water for 20 min, rinsed with 2 \times SSC (Euromedex), exposed to UV light at 365 nm at a distance of 10 cm for 105 min, rinsed in distilled water, stained by incubation with 2% Giemsa solution (VWR) for 16 min, rinsed in distilled water, dried, and mounted. Chromosomes were observed with a Leica DMRB microscope at $\times 100$ magnification. Metaphases were captured with a SONY DXC 930 P camera and SCEs or chromosomal aberrations were analyzed.

Immunofluorescence Microscopy

Immunofluorescence staining was done as previously described (25). Nuclear DNA was detected by mounting slides in Prolong Gold antifade reagent containing DAPI (Invitrogen). Cell images were acquired with a three-dimensional deconvolution imaging system consisting of a Leica DM RXA microscope equipped with a piezoelectric translator (PIFOC, PI) placed at the base of a 63 \times PlanApo 1.4 numerical aperture objective and a 5-MHz Micromax 1300Y inter-line charge-coupled device camera (Roper Instruments).

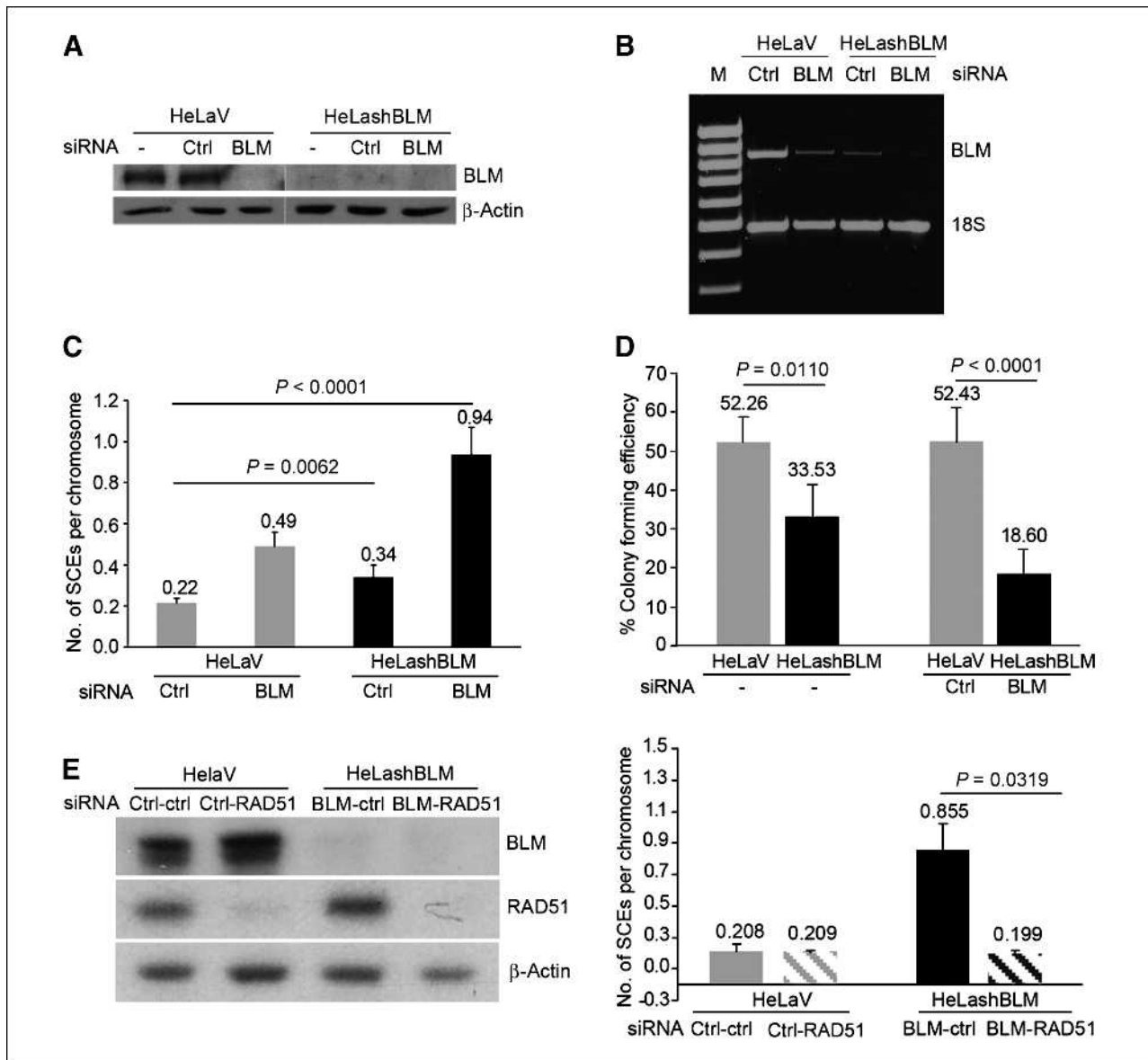


FIGURE 1. BLM-depleted HeLa cells display the cellular features of Bloom's syndrome. A and B, HeLaV and HeLashBLM cells were left untransfected (-) or were transfected with the indicated siRNAs. A, BLM protein levels were assessed by immunoblotting. B, *BLM* gene expression was monitored by reverse transcription-PCR analysis. The 18S probe was used as loading control. C, number of SCEs per chromosome in cells transfected as in A and B. Between 2,245 and 2,642 chromosomes from four independent experiments were analyzed per condition; bars, SEM. D, HeLaV or HeLashBLM cells treated as in A and B were plated in triplicate at three different dilutions (200, 400, and 600 cells). Columns, mean of three independent experiments; bars, SEM. Significance was assessed with Student's *t* tests. E, HeLaV or HeLashBLM cells were cotransfected with the indicated siRNA. BLM and RAD51 protein levels were assessed by immunoblotting (left). Number of SCEs per chromosome in cells transfected as in A. Between 680 and 2,181 chromosomes from two independent experiments were analyzed for each set of condition (right); bars, SEM.

Stacks of conventional fluorescence images were collected automatically at a *Z*-distance of 0.2 μ m (Metamorph software, Molecular Devices). Images were generated from 5 to 12 stacked images with Image J (NIH) software.

Live-Cell Imaging

Cells were imaged in DMEM, in six-well plates, in a humidified atmosphere containing 5% CO₂ at 37°C. Images

were acquired over 0.25 s, every 4 min for 72 h, using one of the following systems: two-dimensional, consisting of a 20 \times /0.4 or 40 \times /0.5 objective on a Leica DMIRBE equipped with a 100-W mercury lamp, GFP-band-pass filter set (Chroma), and a Photometrics CoolSNAP cf camera, or four-/five-dimensional, consisting of a 20 \times /0.4 or 40 \times /0.5 objective on a Leica DMIRBE equipped with a Polychrome IV (Till Photonics) monochromator, GFP-band-pass filter

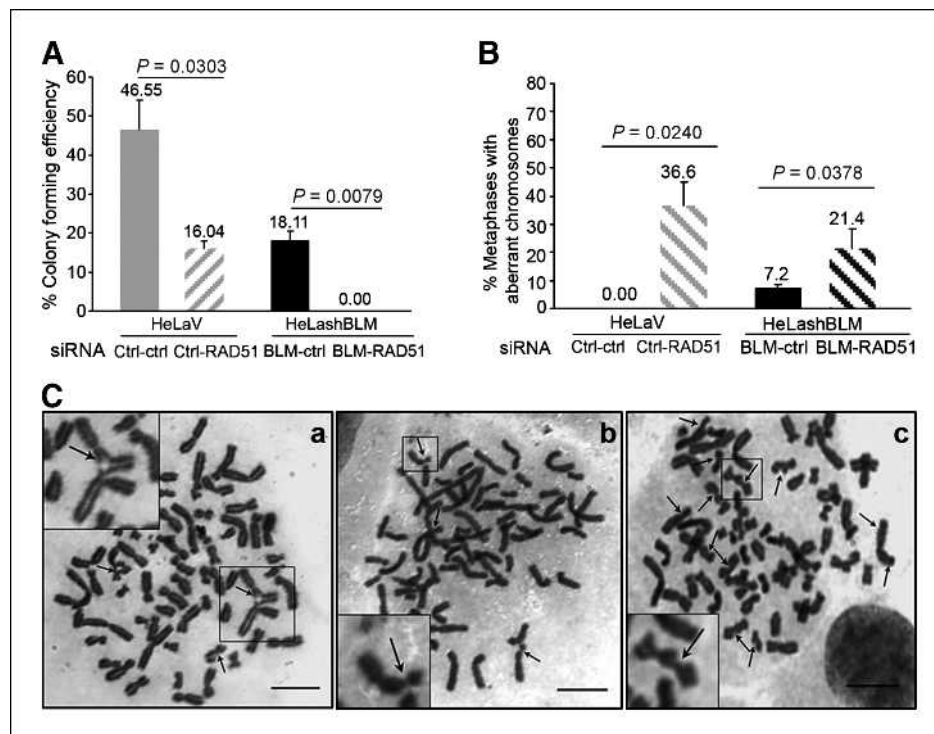


FIGURE 2. RAD51 downregulation in BLM-depleted cells is associated with a complete inhibition of clonal growth and the induction of chromosomal aberrations. A, cells transfected as in Fig. 1A were plated in triplicate at three dilutions (200, 400, and 600 cells). Columns, mean of four independent experiments; bars, SEM. Significance was assessed with Student's *t* test. B, the HeLaV and HeLashBLM cells analyzed in Fig. 1E were used for the analysis of chromosomal aberrations. Between 100 and 165 metaphases were analyzed for each set of conditions. Bars, SEM. Significance was assessed with Student's *t* test. C, typical examples of chromosomal aberrations observed in cells with downregulated RAD51 and/or BLM. Bar, 10 μ m. Radials (a), chromosomal constrictions (b), and gaps (c) are indicated (arrows).

set (Chroma), and a Photometrics CoolSNAP HQ2 camera. Single-fluorescence and single-phase contrast modes were used to follow cells in six fields of view per well. Image J (26) was used for phenotypic analysis.

Statistical Methods

Significance was assessed with Student's *t* tests or χ^2 tests. For all tests, $P < 0.05$ was considered statistically significant.

Results

BLM Depletion in HeLa Cells Reproduces the Cellular Features Associated with Bloom's Syndrome

We developed a new cellular model for Bloom's syndrome, with control cells containing endogenous BLM protein. Because 81% of *BLM* mutations introduce a premature termination codon resulting in an absence of BLM protein (27), we stably downregulated BLM in HeLa cells with a shRNA specific for BLM (shBLM). BLM downregulation was highly efficient as the resulting HeLashBLM cells had no detectable BLM protein (Fig. 1A) and had significantly lower BLM mRNA levels (Fig. 1B) than control cells (HeLaV). However, the only slightly higher frequency of SCE indicated that BLM repression in HeLashBLM

cells was not complete (Fig. 1C). We increased SCE levels further by transiently downregulating *BLM* gene expression in HeLashBLM cells with a pool of siRNAs directed against sequences other than that targeted by shBLM (HeLash-siBLM). This resulted in lower BLM mRNA levels (Fig. 1B) and significantly higher SCE levels (0.94 SCEs per chromosome) than in control cells (HeLaV-sictrl; 0.22 SCEs per chromosome; Fig. 1C). Moreover, both HeLashBLM cells and HeLash-siBLM cells formed colonies less efficiently and grew more slowly than control cells (Fig. 1D and data not shown). Excess SCE in BLM-deficient cells has been shown to be recombination dependent (2, 3). We found that RAD51 downregulation decreased the frequency of SCEs to wild-type levels in BLM-depleted cells (Fig. 1E), showing a strict dependence on RAD51-mediated HR of the increase in SCE in our new Bloom's syndrome cellular model. These characteristics are consistent with the Bloom's syndrome cell phenotype.

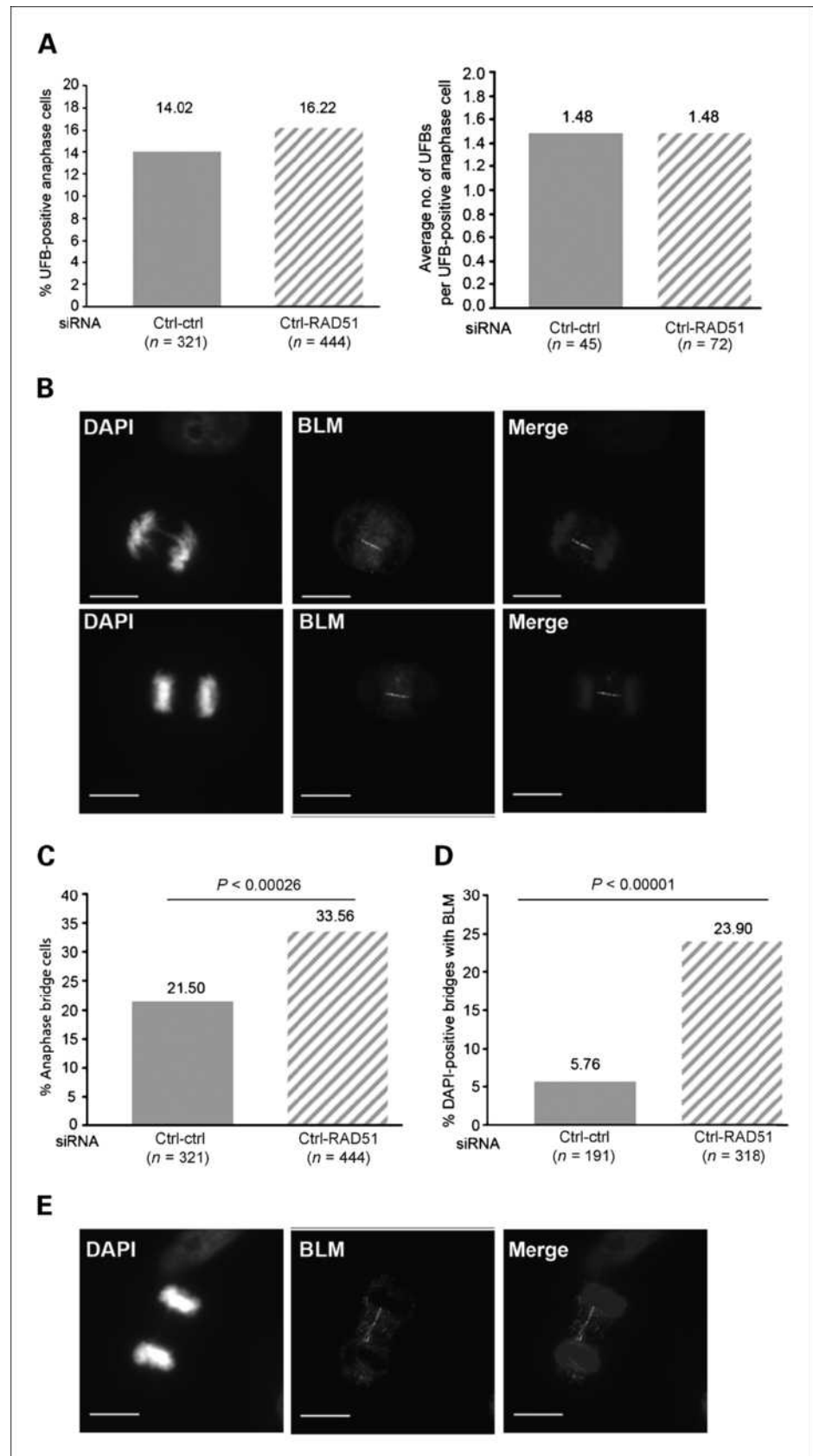
RAD51 Downregulation in BLM-Depleted Cells Is Associated with a Complete Inhibition of Clonal Growth and Acts Upstream from BLM to Prevent Chromosomal Instability

RAD51 is an essential gene in vertebrate cells (20, 28, 29). Because siRNA-mediated RAD51 downregulation

FIGURE 3. RAD51 downregulation is associated with an increase in the frequency of BLM-positive anaphase bridges. HeLaV cells were transfected as in Fig. 2A and fixed as previously described (25). UFBs and DNA bridges were detected by BLM staining.

A, percentage of anaphase control cells ($n = 321$ anaphase cells) and cells displaying RAD51 downregulation ($n = 444$ anaphase cells) containing UFBs (left). Columns, mean number of UFBs per UFB-positive anaphase cell in control cells ($n = 45$ UFB-positive anaphase cells) and in cells in which RAD51 was downregulated ($n = 72$ UFB-positive anaphase cells; right). B, representative examples of Z-projections of multiple stacking images showing the localization of BLM to DAPI-negative DNA bridges, thus revealing UFB-containing anaphase cells. Bar, 10 μ m. C, percentage of control cells ($n = 321$ anaphase cells) and cells displaying RAD51 downregulation ($n = 444$ anaphase cells) containing DAPI-positive anaphase bridges. Significance was determined by carrying out χ^2 test.

D, percentage of DAPI-positive anaphase bridges with BLM in control cells ($n = 191$ DAPI-positive anaphase bridges) and in cells displaying RAD51 downregulation ($n = 391$ DAPI-positive anaphase bridges). Significance was determined by carrying out χ^2 test. E, representative examples of Z-projections of multiple stacking images showing the localization of BLM to DAPI-positive DNA bridges. Bar, 10 μ m.



was not lethal in our experimental conditions but was efficient enough to inhibit completely the increase in SCEs in BLM-depleted cells, we further analyzed the effects of RAD51 downregulation in control cells and BLM-depleted cells. We found that RAD51 downregulation significantly decreased the colony-forming efficiency of HeLa control cells and fully abolished the clonal cell growth ability of BLM-depleted cells (Fig. 2A). Thus, unlike cells in which only one of the two proteins is downregulated, cells in which both BLM and RAD51 are downregulated cannot grow in clonal conditions. The downregulation of both BLM and RAD51 therefore had either synergistic or additive effects on clonal growth.

At the chromosomal level, we found that RAD51 downregulation increased the number of cells presenting chromosomal aberrations in both cell lines (Fig. 2B and C; Supplementary Table S1). RAD51 downregulation induced chromosomal instability more frequently (36.6% of cells) than did BLM downregulation (7.2% of cells; Fig. 2B and C). The downregulation of both RAD51 and BLM yielded a frequency of metaphases showing chromosomal aberrations (21.4%) not significantly different from that observed in the presence of RAD51 downregulation alone (36.6%, $P = 0.18$), indicating that RAD51 acts upstream from BLM to prevent chromosomal instability.

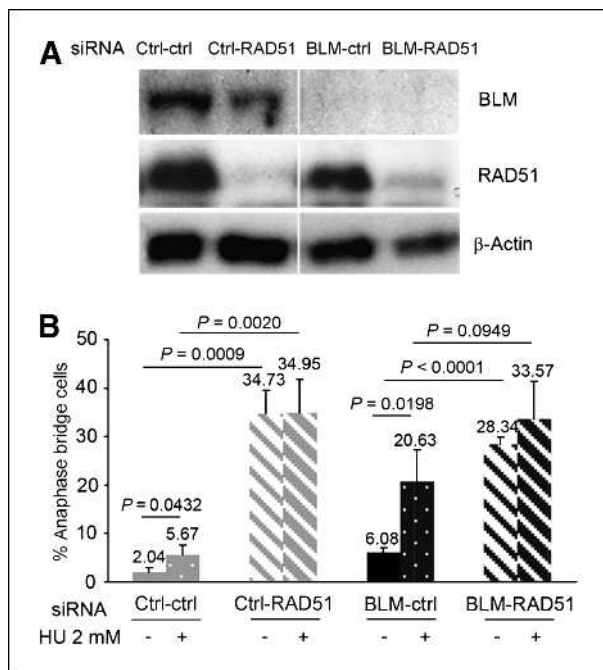


FIGURE 4. BLM and RAD51 act synergistically in cell survival. A, H2BG cells were transfected as in Fig. 2A. BLM and RAD51 protein levels were assessed by immunoblotting. B, H2BG cells were transfected as in Fig. 2A. After 24 h, cells were replated and left untreated (–) or were treated with 2 mmol/L hydroxyurea for 16 h (+). Cells were washed, released into a drug-free medium, and filmed for 72 h. More than 400 mitosis from three independent experiments were analyzed for each set of conditions (a total of 4,803 mitosis analyzed). Cells displaying anaphase bridges were counted. Significance was assessed with Student's *t* tests. Bars, SEM.

With the exception of the radial chromosomes present in our analysis, the chromosomal aberrations we detected in cells with downregulated RAD51 were of a nature and frequency similar to those reported by Schwartz et al. (20), suggesting that at least some of the gaps, breaks, and constrictions occurred at fragile sites.

RAD51 Downregulation Is Associated with an Increase in the Frequency of BLM-Positive Anaphase Bridges

BLM localizes to UFBs and to DAPI-positive anaphase bridges, some of which are associated with fragile sites (17, 19). It has recently been proposed that BLM is required for the resolution of fragile site-associated UFBs and anaphase bridges (19). Because RAD51 downregulation leads to a significant increase in fragile-site expression (20), we investigated its effects on both UFBs and anaphase bridge frequency. The percentage of anaphase cells containing UFBs and the mean number of UFBs per anaphase cell were similar in control cells and cells in which RAD51 was downregulated (Fig. 3A and B). By contrast, the percentage of anaphase cells containing DAPI-positive anaphase bridges was significantly higher in RAD51-downregulated cells than in control cells (Fig. 3C). In these DAPI-positive anaphase bridge cells, RAD51 downregulation was associated with a strong and significant increase in the frequency of BLM-positive anaphase bridges, indicating preferential resolution of the structure of the anaphase bridges formed in response to RAD51 downregulation by BLM (Fig. 3D and E). These data show that RAD51 is required to prevent anaphase bridge formation and that BLM is recruited to anaphase bridges in cells in which RAD51 is downregulated. These results strongly suggest that BLM is required for the suppression or resolution of the anaphase bridges induced by RAD51 downregulation and, thus, that BLM acts downstream from RAD51 to rescue the anaphase bridges resulting from RAD51 deficiency.

BLM and RAD51 Have Synergistic Effects on Cell Survival

We investigated the possible functional consequences of the increase in BLM localization to anaphase bridges in cells with RAD51 downregulation, using a HeLa cell line stably expressing an H2B-GFP (H2BG) transgene (22) for time-lapse live microscopy analysis. We confirmed that the transient downregulation of BLM and/or RAD51 in HeLa H2BG cells (H2BG-siBLM or H2BG-siRAD51 cells) reproduced the features observed in HeLa-siBLM cells (Fig. 4A; Supplementary Fig. S1).

We filmed the cells over 72 hours and found a significantly higher frequency of lagging chromatin and anaphase bridges in H2BG-siBLM cells (3% and 6.08%, respectively) than in control cells (H2BG-siCtrl cells; 1.96% and 2.04%, respectively), as expected (refs. 17, 30; Supplementary Fig. S1C and D). We confirmed that RAD51 downregulation (Fig. 4A) resulted in a significant increase in the frequency of anaphase bridge cells (Fig. 4B). This increase was much more marked in H2BG-siBLM cells than in HeLa-siBLM cells due to the lower frequency of anaphase

bridge-containing cells among cells overexpressing H2B-GFP (data not shown). RAD51 downregulation also resulted in a significantly higher frequency of anaphase bridge cells (34.73%) than did BLM downregulation (6.08%; Fig. 4B). The downregulation of both BLM and RAD51 resulted in a frequency of anaphase bridge cells (28.34%) similar to that for RAD51 downregulation alone (34.73%, $P = 0.097$). Thus, BLM is not required to prevent the formation of anaphase bridges in cells in which RAD51 is downregulated.

We investigated whether the formation of anaphase bridges in cells with RAD51 downregulation could result from structures generated in response to disturbances of replication; we did this by carrying out the same experiments in parallel in H2BG cells treated with hydroxyurea, an inhibitor of ribonucleotide reductase commonly used to induce replicational stress. Hydroxyurea blockade was confirmed by fluorescence-activated cell sorting analysis (data not shown). Hydroxyurea-induced replication stress significantly increased the frequency of anaphase bridges in H2BG-sictrl cells (5.67% versus 2.04%) and H2BG-siBLM cells (20.63% versus 6.08%), but not in cells with RAD51 downregulation (Fig. 4B). In conditions of RAD51 downregulation, the frequency of H2BG-sictrl cells (34.73%) and H2BG-siBLM cells (28.34%) presenting anaphase bridges was not significantly modified by hydroxyurea treatment (34.95% and 33.57%, respectively; Fig. 4B).

These results suggest that the formation of anaphase bridges induced by RAD51 downregulation is not due to abnormal structures resulting from the disturbance of replication, being instead due to constitutive DNA structures that are difficult to replicate in normal conditions, such as fragile sites.

We then followed 853 cells with anaphase bridges (420 untreated and 433 hydroxyurea treated) from a total of 4,803 mitotic cells (2,574 untreated and 2,229 hydroxyurea treated) from three independent experiments until division was completed. All the anaphase bridges in control cells and in cells in which BLM was downregulated, either untreated or treated with hydroxyurea, were resolved during telophase or cytokinesis and were associated with the formation of micronuclei, which are known to be present at high frequency in Bloom's syndrome cells (31). By contrast, the resolution of some of the anaphase bridges resulted in cell death in both untreated and hydroxyurea-treated cells in which RAD51 was downregulated, either alone or together with BLM (Supplementary Movies S1 and S2). Indeed, 7% of anaphase bridge cells downregulated for RAD51 and 18% of anaphase bridge cells downregulated for both BLM and RAD51 died just after dividing. After hydroxyurea treatment, 26% of anaphase bridge cells downregulated for RAD51 and 43% of anaphase bridge cells downregulated for both BLM and RAD51 died after dividing, indicating that anaphase bridge cells downregulated for RAD51 display an increase in sensitivity to hydroxyurea (Table 1). Thus, for anaphase bridge cells, death was significantly more frequent among cells downregulated for both BLM and RAD51 than in cells with RAD51 downregulation only, with no cell

Table 1. Percentage of anaphase bridge cells dying after division

Transfected siRNAs	Percent of anaphase bridge cells dying after division	
	Untreated	After hydroxyurea
Ctrl-ctrl	0	0
BLM-ctrl	0	0
Ctrl-RAD51	7	26
BLM-RAD51	18	43

NOTE: Anaphase cells scored in Fig. 4B were followed until division was completed and the frequency of cell death was determined.

death recorded for BLM downregulation alone. These results show that BLM downregulation increases the cell death levels associated with RAD51 downregulation, indicating that the inhibition of clonal growth we observed in the cells downregulated for both BLM and RAD51 results from a synergistic effect, rather than an additive effect, of the depletion of both proteins (Fig. 2A).

Thus, the downregulation of BLM and RAD51 together clearly had a synergistic effect on cell survival, with BLM limiting the lethality associated with RAD51 downregulation by resolving the anaphase bridges resulting from the RAD51 defect.

Discussion

We studied a new cellular model for Bloom's syndrome consisting of HeLa cells constitutively expressing a shRNA specific for BLM and transiently transfected with a pool of siRNAs directed against sequences other than that targeted by shBLM. These cells display the growth defect, cytogenetic features (high levels of SCE), and mitotic abnormalities (anaphase bridges and lagging chromosomes) typical of Bloom's syndrome cells.

We found that SCE formation in response to BLM depletion was strictly dependent on RAD51, showing an epistatic interaction between the two genes. In mammalian cells, RAD51 involvement has been reported in the formation of induced, but not spontaneous, SCEs (32), suggesting that the SCEs in Bloom's syndrome cells are induced. Thus, the constitutively high levels of RAD51-mediated SCEs in Bloom's syndrome cells are probably induced by the decrease in fork velocity in these cells, which may render them susceptible to DNA breaks (33, 34). RAD51 would then be recruited to the ssDNA leading to a recombination-dependent replication pathway restoring broken forks (15).

Unexpectedly, we found that the increase in chromosomal aberrations or fragile sites induced by RAD51 downregulation was associated with an increase in the frequency of anaphase bridges and of BLM-positive anaphase bridges, but not of BLM-associated UFBs. These results show that UFBs

are not derived from RAD51-dependent recombination intermediates and strongly suggest that BLM is required for the suppression or resolution of the anaphase bridges induced by RAD51 downregulation. This conclusion was further supported by our results showing that cells downregulated for both BLM and RAD51 were unable to grow in clonal conditions, whereas cells downregulated for either of the proteins alone could grow clonally. In nonclonal growth conditions, the frequency of cell death in cells downregulated for both BLM and RAD51 was more than 2.5 times that in cells downregulated for RAD51 alone, no cell death being detected among cells downregulated for BLM alone. These results clearly show a synergistic effect of the downregulation of both BLM and RAD51 on cell survival. They also indicate that BLM downregulation increases the cell death associated with RAD51 downregulation, indi-

cating that BLM limits the lethality associated with RAD51 deficiency. An absence of RAD51 is lethal for mammalian cells (29). However, siRNA-mediated RAD51 downregulation was not lethal in our experimental conditions, indicating that RAD51 was still expressed, but at very low levels. This situation mimics the situation in cells underexpressing RAD51 and may have particularly important implications for these cells. Thus, our findings could be of particular importance in cells underexpressing RAD51. Several lines of evidence suggest potential associations between variants of *RAD51* family genes and specific forms of cancer (35). Moreover, the *RAD51* gene is located at chromosome position 15q15.1 (36), a region displaying a loss of heterozygosity in many cancers (37, 38). Changes in *RAD51* gene expression have also been observed in both primary tumors and cancer cell lines (39). BLM activity is

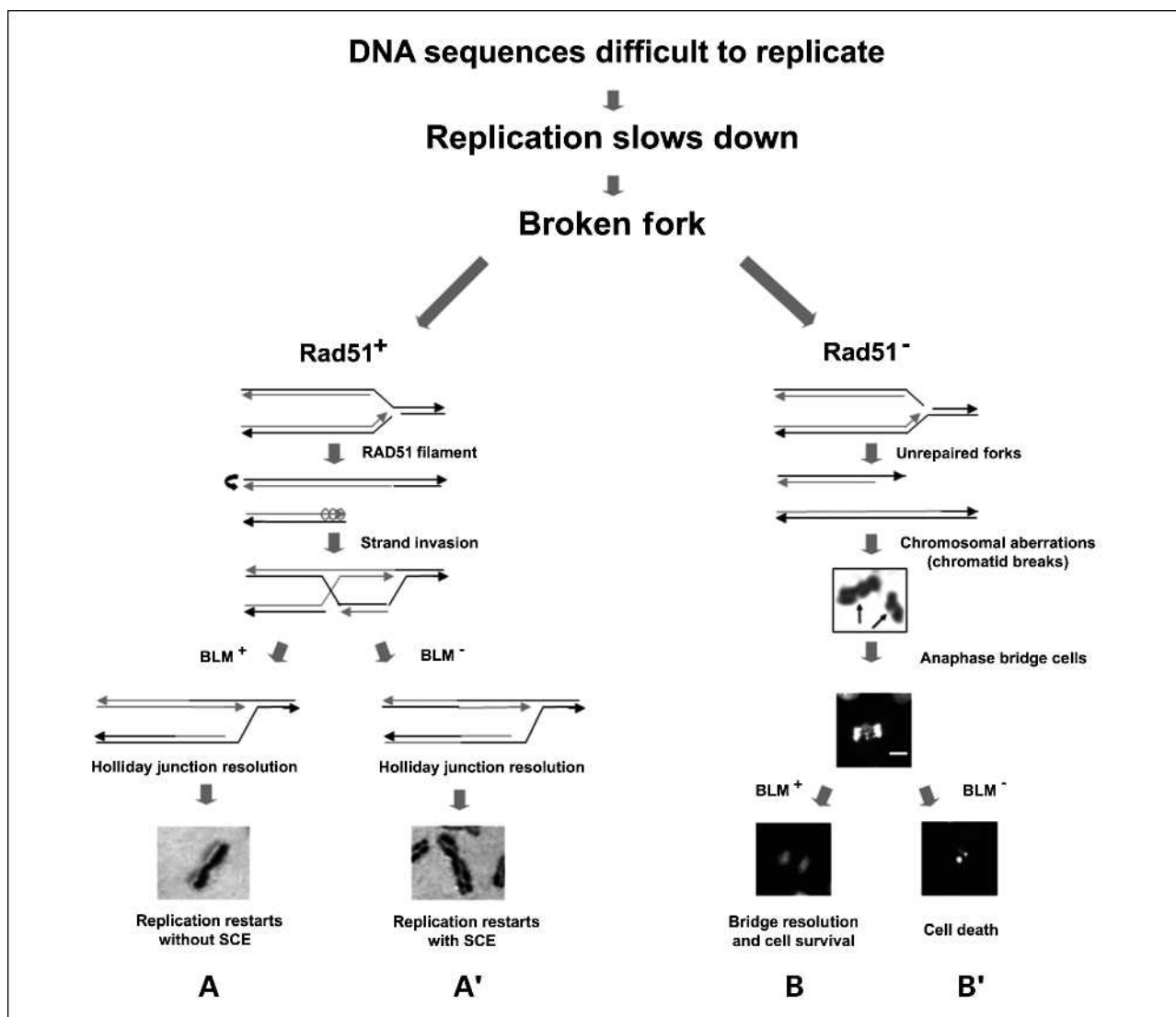


FIGURE 5. A model of the respective roles of RAD51 and BLM at difficult-to-replicate DNA sequences. Black and gray lines, parental template DNA and newly synthesized DNA, respectively. See the text for details.

therefore essential in such situations to counteract RAD51 underexpression.

We propose a model, based on our findings, explaining the genetic interactions between *BLM* and *RAD51* (Fig. 5). The replication fork slows down, tending to stall or collapse at difficult-to-replicate DNA sequences, such as fragile sites, leading to double-strand break formation. In the presence of RAD51 (RAD51⁺), the broken forks may be reactivated or repaired by the RAD51-mediated HR pathway, leading to the formation of a Holliday junction that is resolved by the branch migration activity of BLM (Fig. 5A). In the absence of BLM, the RAD51-mediated Holliday junction may be resolved in part by crossing over between chromatids, leading to SCE (Fig. 5A'). The epistatic interaction between *RAD51* and *BLM* observed here is consistent with this pathway, in which BLM acts downstream from RAD51. In RAD51-deficient cells (RAD51⁻), the broken forks remain unrepaired, leading to chromosome breaks and anaphase bridge formation. BLM, together with other proteins such as topoisomerase III α , Rmi1, and Rmi2, localizes to some of the anaphase bridges formed in response to RAD51 downregulation and resolves them, thereby limiting cell death (Fig. 5B). The absence of BLM results in a higher frequency of cell death in anaphase bridge-containing cells, accounting for the synergistic effect of the downregulation of both RAD51 and BLM (Fig. 5B').

References

- Ellis NA, Groden J, Ye TZ, et al. The Bloom's syndrome gene product is homologous to RecQ helicases. *Cell* 1995;83:655–66.
- Otsuki M, Seki M, Inoue E, et al. Functional interactions between BLM and XRCC3 in the cell. *J Cell Biol* 2007;179:53–63.
- Srivastava V, Modi P, Tripathi V, Mudgal R, De S, Sengupta S. BLM helicase stimulates the ATPase and chromatin-remodeling activities of RAD54. *J Cell Sci* 2009;122:3093–103.
- Sonoda E, Sasaki MS, Morrison C, Yamaguchi-Iwai Y, Takata M, Takeda S. Sister chromatid exchanges are mediated by homologous recombination in vertebrate cells. *Mol Cell Biol* 1999;19:5166–9.
- van Brabant AJ, Ye T, Sanz M, German IJ, Ellis NA, Holloman WK. Binding and melting of D-loops by the Bloom syndrome helicase. *Biochemistry* 2000;39:14617–25.
- Singh TR, Ali AM, Busygina V, et al. BLAP18/RMI2, a novel OB-fold-containing protein, is an essential component of the Bloom helicase-double Holliday junction dissolvosome. *Genes Dev* 2008;22:2856–68.
- Machwe A, Xiao L, Groden J, Orren DK. The Werner and Bloom syndrome proteins catalyze regression of a model replication fork. *Biochemistry* 2006;45:13939–46.
- Xu D, Guo R, Sobock A, et al. RMI1, a new OB-fold complex essential for Bloom syndrome protein to maintain genome stability. *Genes Dev* 2008;22:2843–55.
- Wu LHI. The Bloom's syndrome helicase suppresses crossing over during homologous recombination. *Nature* 2003;426:870–4.
- Ralf C, Hickson ID, Wu L. The Bloom's syndrome helicase can promote the regression of a model replication fork. *J Biol Chem* 2006;281:22839–46.
- Bugreev DV, Yu X, Egelman EH, Mazin AV. Novel pro- and anti-recombination activities of the Bloom's syndrome helicase. *Genes Dev* 2007;21:3085–94.
- Tripathi V, Nagarjuna T, Sengupta S. BLM helicase-dependent and -independent roles of 53BP1 during replication stress-mediated homologous recombination. *J Cell Biol* 2007;178:9–14.
- Ouyang KJ, Woo LL, Zhu J, Huo D, Matunis MJ, Ellis NA. SUMO modification regulates BLM and RAD51 interaction at damaged replication forks. *PLoS Biol* 2009;7:e1000252.
- Bachrati CZHI. RecQ helicases: guardian angels of the DNA replication fork. *Chromosoma* 2008;117:219–33.
- Amor-Gueret M. Bloom syndrome, genomic instability and cancer: the SOS-like hypothesis. *Cancer Lett* 2006;236:1–12.
- Wu L. Role of the BLM helicase in replication fork management. *DNA Repair (Amst)* 2007;6:936–44.
- Chan KL, North PS, Hickson ID. BLM is required for faithful chromosome segregation and its localization defines a class of ultrafine anaphase bridges. *EMBO J* 2007;26:3397–409.
- Bayart E, Dutertre S, Jaulin C, Guo RB, Xi XG, Amor-Gueret M. The Bloom syndrome helicase is a substrate of the mitotic Cdc2 kinase. *Cell Cycle* 2006;5:1681–6.
- Chan KL, Palmal-Pallag T, Ying S, Hickson ID. Replication stress induces sister-chromatid bridging at fragile site loci in mitosis. *Nat Cell Biol* 2009.
- Schwartz M, Zlotorynski E, Goldberg M, et al. Homologous recombination and nonhomologous end-joining repair pathways regulate fragile site stability. *Genes Dev* 2005;19:2715–26.
- Dutertre S, Ababou M, Onclercq R, et al. Cell cycle regulation of the endogenous wild type Bloom's syndrome DNA helicase. *Oncogene* 2000;19:2731–8.
- Kanda T, Sullivan KF, Wahl GM. Histone-GFP fusion protein enables sensitive analysis of chromosome dynamics in living mammalian cells. *Curr Biol* 1998;8:377–85.
- Mergui X, Leteurtre F, Lipinski M, Bénard J, Amor-Gu eret M. Two distinctly altered cellular responses to DNA double-strand breaks in human neuroblastoma. *Biochimie* 2008;90:1656–66.

Disclosure of Potential Conflicts of Interest

No potential conflicts of interest were disclosed.

Acknowledgments

We thank Giuseppe Baldacci for invaluable stimulating discussions and advice and for constant support, Sarah Lambert for critical reading of the manuscript and helpful advice, and all the members of UMR 207 for helpful discussions.

Grant Support

The Institut Curie (PIC), the CNRS, INCa grant PL003, and the ARC, and fellowships from the Canc erop le/R gion Ile-de-France, the ARC, and the Ligue contre le Cancer (Comit  de l'Essonne; K. Lahkim Bennani-Belhaj), the Minist re de la Recherche (S. Rouzeau), and the CNRS (P. Chabosseau).

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked *advertisement* in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

Received 12/09/2009; revised 01/14/2010; accepted 01/15/2010; published OnlineFirst 03/09/2010.

24. Ababou M, Dumaire V, Lecluse Y, Amor-Gueret M. Bloom's syndrome protein response to ultraviolet-C radiation and hydroxyurea-mediated DNA synthesis inhibition. *Oncogene* 2002;21:2079–88.
25. Wu L, Davies SL, North PS, et al. The Bloom's syndrome gene product interacts with topoisomerase III. *J Biol Chem* 2000;275:9636–44.
26. Abramoff MD, Magelhaes PJ, Ram SJ. Image processing with Image. *J Biophotonics International* 2004;11:36–42.
27. German J, Sanz MM, Ciocci S, Ye TZ, Ellis NA. Syndrome-causing mutations of the BLM gene in persons in the Bloom's Syndrome Registry. *Hum Mutat* 2007;28:743–53.
28. Sonoda E, Sasaki MS, Buerstedde JM, et al. Rad51-deficient vertebrate cells accumulate chromosomal breaks prior to cell death. *EMBO J* 1998;17:598–608.
29. Lim DS, Hasty P. A mutation in mouse rad51 results in an early embryonic lethal that is suppressed by a mutation in p53. *Mol Cell Biol* 1996;16:7133–43.
30. German J. Bloom's syndrome. I. Genetical and clinical observations in the first twenty-seven patients. *Am J Hum Genet* 1969;21:196–227.
31. Rosin MP, German J. Evidence for chromosome instability *in vivo* in Bloom syndrome: increased numbers of micronuclei in exfoliated cells. *Hum Genet* 1985;71:187–91.
32. Lambert S, Lopez BS. Role of RAD51 in sister-chromatid exchanges in mammalian cells. *Oncogene* 2001;20:6627–31.
33. Rao VA, Conti C, Guirouilh-Barbat J, et al. Endogenous γ -H2AX-ATM-Chk2 checkpoint activation in Bloom's syndrome helicase deficient cells is related to DNA replication arrested forks. *Mol Cancer Res* 2007;5:713–24.
34. Davies SL, North PS, Hickson ID. Role for BLM in replication-fork restart and suppression of origin firing after replicative stress. *Nat Struct Mol Biol* 2007;14:677–9.
35. Thacker J. The RAD51 gene family, genetic instability and cancer. *Cancer Lett* 2005;219:125–35.
36. Takahashi E, Matsuda Y, Hori T, et al. Chromosome mapping of the human (RECA) and mouse (Reca) homologs of the yeast RAD51 and *Escherichia coli* recA genes to human (15q15.1) and mouse (2F1) chromosomes by direct R-banding fluorescence *in situ* hybridization. *Genomics* 1994;19:376–8.
37. Wick W, Petersen I, Schmutzler RK, et al. Evidence for a novel tumor suppressor gene on chromosome 15 associated with progression to a metastatic stage in breast cancer. *Oncogene* 1996;12:973–8.
38. Gonzalez R, Silva JM, Dominguez G, et al. Detection of loss of heterozygosity at RAD51, RAD52, RAD54 and BRCA1 and BRCA2 loci in breast cancer: pathological correlations. *Br J Cancer* 1999;81:503–9.
39. Yoshikawa K, Ogawa T, Baer R, et al. Abnormal expression of BRCA1 and BRCA1-interactive DNA-repair proteins in breast carcinomas. *Int J Cancer* 2000;88:28–36.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Ababou, M., Dumaire, V., Lecluse, Y., and Amor-Gueret, M. (2002a). Bloom's syndrome protein response to ultraviolet-C radiation and hydroxyurea-mediated DNA synthesis inhibition. *Oncogene* *21*, 2079-2088.
- Ababou, M., Dumaire, V., Lecluse, Y., and Amor-Gueret, M. (2002b). Cleavage of BLM and sensitivity of Bloom's syndrome cells to hydroxyurea and UV-C radiation. *Cell Cycle* *1*, 262-266.
- Adams, M.D., McVey, M., and Sekelsky, J.J. (2003). *Drosophila* BLM in double-strand break repair by synthesis-dependent strand annealing. *Science* *299*, 265-267.
- Agostinho, M., Rino, J., Braga, J., Ferreira, F., Steffensen, S., and Ferreira, J. (2004). Human topoisomerase IIalpha: targeting to subchromosomal sites of activity during interphase and mitosis. *Mol Biol Cell* *15*, 2388-2400.
- Amor-Gueret, M. (2006). Bloom syndrome, genomic instability and cancer: the SOS-like hypothesis. *Cancer Lett* *236*, 1-12.
- Amor-Gu eret, M. (2006). Bloom syndrome, genomic instability and cancer: the SOS-like hypothesis. *Cancer Lett* *236*, 1-12.
- Amor-Gu eret, M., Dubois-d'Enghien, C., Lauge, A., Onclercq-Delic, R., Barakat, A., Chadli, E., Bousfiha, A.A., Benjelloun, M., Flori, E., Doray, B., *et al.* (2008). Three new BLM gene mutations associated with Bloom syndrome. *Genet Test* *12*, 257-261.
- Anderson, D.E., Losada, A., Erickson, H.P., and Hirano, T. (2002). Condensin and cohesin display different arm conformations with characteristic hinge angles. *J Cell Biol* *156*, 419-424.
- Aurias, A., Antoine, J.L., Assathiany, R., Odievre, M., and Dutrillaux, B. (1985). Radiation sensitivity of Bloom's syndrome lymphocytes during S and G2 phases. *Cancer Genet Cytogenet* *16*, 131-136.
- Azuma, Y., Arnaoutov, A., Anan, T., and Dasso, M. (2005). PIASy mediates SUMO-2 conjugation of Topoisomerase-II on mitotic chromosomes. *EMBO J* *24*, 2172-2182.
- Azuma, Y., Arnaoutov, A., and Dasso, M. (2003). SUMO-2/3 regulates topoisomerase II in mitosis. *J Cell Biol* *163*, 477-487.
- Bachant, J., Alcasabas, A., Blat, Y., Kleckner, N., and Elledge, S.J. (2002). The SUMO-1 isopeptidase Smt4 is linked to centromeric cohesion through SUMO-1 modification of DNA topoisomerase II. *Mol Cell* *9*, 1169-1182.
- Bachrati, C.Z., Borts, R.H., and Hickson, I.D. (2006). Mobile D-loops are a preferred substrate for the Bloom's syndrome helicase. *Nucleic Acids Res* *34*, 2269-2279.
- Bachrati, C.Z., and Hickson, I.D. (2003). RecQ helicases: suppressors of tumorigenesis and premature aging. *Biochem J* *374*, 577-606.

- Bachrati, C.Z., and Hickson, I.D. (2008). RecQ helicases: guardian angels of the DNA replication fork. *Chromosoma* *117*, 219-233.
- Barakat, A., Ababou, M., Onclercq, R., Dutertre, S., Chadli, E., Hda, N., Benslimane, A., and Amor-Gueret, M. (2000). Identification of a novel BLM missense mutation (2706T>C) in a Moroccan patient with Bloom's syndrome. *Hum Mutat* *15*, 584-585.
- Bartos, J.D., Wang, W., Pike, J.E., and Bambara, R.A. (2006). Mechanisms by which Bloom protein can disrupt recombination intermediates of Okazaki fragment maturation. *J Biol Chem* *281*, 32227-32239.
- Batram, C., Baddeley, D., Kreth, G., and Cremer, C. (2008). High precision size measurement of centromere 8 and the 8q24/c-myc gene region in metaphase and interphase human fibroblasts indicate differential condensation. *J Struct Biol* *164*, 293-303.
- Baum, M., Ngan, V.K., and Clarke, L. (1994). The centromeric K-type repeat and the central core are together sufficient to establish a functional *Schizosaccharomyces pombe* centromere. *Mol Biol Cell* *5*, 747-761.
- Baumann, C., Korner, R., Hofmann, K., and Nigg, E.A. (2007). PICH, a centromere-associated SNF2 family ATPase, is regulated by Plk1 and required for the spindle checkpoint. *Cell* *128*, 101-114.
- Baxter, J., Sen, N., Martinez, V.L., De Carandini, M.E., Schwartzman, J.B., Diffley, J.F., and Aragon, L. (2011). Positive supercoiling of mitotic DNA drives decatenation by topoisomerase II in eukaryotes. *Science* *331*, 1328-1332.
- Bayart, E., Dutertre, S., Jaulin, C., Guo, R.B., Xi, X.G., and Amor-Gueret, M. (2006). The Bloom syndrome helicase is a substrate of the mitotic Cdc2 kinase. *Cell Cycle* *5*, 1681-1686.
- Ben-Sasson, S.A., Cohen, T., and Voss, R. (1985). Background allelic variants in normal hemopoietic cells and Bloom's syndrome erythrocytes and the possible implication of somatic crossingover. *Cancer Genet Cytogenet* *15*, 237-242.
- Bennett, R.J., Sharp, J.A., and Wang, J.C. (1998). Purification and characterization of the Sgs1 DNA helicase activity of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* *273*, 9644-9650.
- Berger, J.M., Gamblin, S.J., Harrison, S.C., and Wang, J.C. (1996). Structure and mechanism of DNA topoisomerase II. *Nature* *379*, 225-232.
- Bernstein, D.A., and Keck, J.L. (2003). Domain mapping of *Escherichia coli* RecQ defines the roles of conserved N- and C-terminal regions in the RecQ family. *Nucleic Acids Res* *31*, 2778-2785.
- Bernstein, D.A., Zittel, M.C., and Keck, J.L. (2003). High-resolution structure of the *E.coli* RecQ helicase catalytic core. *Embo J* *22*, 4910-4921.

- Bhattacharyya, S., Keirse, J., Russell, B., Kavecansky, J., Lillard-Wetherell, K., Tahmaseb, K., Turchi, J.J., and Groden, J. (2009). Telomerase-associated protein 1, HSP90, and topoisomerase IIalpha associate directly with the BLM helicase in immortalized cells using ALT and modulate its helicase activity using telomeric DNA substrates. *J Biol Chem* 284, 14966-14977.
- 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.
- Black, B.E., and Bassett, E.A. (2008). The histone variant CENP-A and centromere specification. *Curr Opin Cell Biol* 20, 91-100.
- Blower, M.D., Sullivan, B.A., and Karpen, G.H. (2002). Conserved organization of centromeric chromatin in flies and humans. *Dev Cell* 2, 319-330.
- Bolte, S., and Cordelieres, F.P. (2006). A guided tour into subcellular colocalization analysis in light microscopy. *J Microsc* 224, 213-232.
- Bouzinba-Segard, H., Guais, A., and Francastel, C. (2006). Accumulation of small murine minor satellite transcripts leads to impaired centromeric architecture and function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 8709-8714.
- Branzei, D., and Foiani, M. (2009). The checkpoint response to replication stress. *DNA Repair (Amst)* 8, 1038-1046.
- Brill, S.J., DiNardo, S., Voelkel-Meiman, K., and Sternglanz, R. (1987). Need for DNA topoisomerase activity as a swivel for DNA replication for transcription of ribosomal RNA. *Nature* 326, 414-416.
- Brosh, R.M., Jr., Li, J.L., Kenny, M.K., Karow, J.K., Cooper, M.P., Kureekattil, R.P., Hickson, I.D., and Bohr, V.A. (2000). Replication protein A physically interacts with the Bloom's syndrome protein and stimulates its helicase activity. *J Biol Chem* 275, 23500-23508.
- Buchenau, P., Saumweber, H., and Arndt-Jovin, D.J. (1993). Consequences of topoisomerase II inhibition in early embryogenesis of *Drosophila* revealed by in vivo confocal laser scanning microscopy. *J Cell Sci* 104 (Pt 4), 1175-1185.
- Buck, G.R., and Zechiedrich, E.L. (2004). DNA disentangling by type-2 topoisomerases. *J Mol Biol* 340, 933-939.
- Bugreev, D.V., Mazina, O.M., and Mazin, A.V. (2006). Rad54 protein promotes branch migration of Holliday junctions. *Nature* 442, 590-593.
- Bugreev, D.V., Mazina, O.M., and Mazin, A.V. (2009). Bloom syndrome helicase stimulates RAD51 DNA strand exchange activity through a novel mechanism. *J Biol Chem* 284, 26349-26359.

Bugreev, D.V., Rossi, M.J., and Mazin, A.V. (2011). Cooperation of RAD51 and RAD54 in regression of a model replication fork. *Nucleic Acids Res* 39, 2153-2164.

Bugreev, D.V., Yu, X., Egelman, E.H., and Mazin, A.V. (2007). Novel pro- and anti-recombination activities of the Bloom's syndrome helicase. *Genes Dev* 21, 3085-3094.

Bunting, S.F., Callen, E., Wong, N., Chen, H.T., Polato, F., Gunn, A., Bothmer, A., Feldhahn, N., Fernandez-Capetillo, O., Cao, L., *et al.* (2010). 53BP1 inhibits homologous recombination in Brca1-deficient cells by blocking resection of DNA breaks. *Cell* 141, 243-254.

Bussen, W., Raynard, S., Busygina, V., Singh, A.K., and Sung, P. (2007). Holliday junction processing activity of the BLM-Topo IIIalpha-BLAP75 complex. *J Biol Chem* 282, 31484-31492.

Calin, G., Herlea, V., Barbanti-Brodano, G., and Negrini, M. (1998). The coding region of the Bloom syndrome BLM gene and of the CBL proto-oncogene is mutated in genetically unstable sporadic gastrointestinal tumors. *Cancer Res* 58, 3777-3781.

Carroll, C.W., Milks, K.J., and Straight, A.F. (2010). Dual recognition of CENP-A nucleosomes is required for centromere assembly. *J Cell Biol* 189, 1143-1155.

Carroll, C.W., and Straight, A.F. (2006). Centromere formation: from epigenetics to self-assembly. *Trends Cell Biol* 16, 70-78.

Centola, M., and Carbon, J. (1994). Cloning and characterization of centromeric DNA from *Neurospora crassa*. *Mol Cell Biol* 14, 1510-1519.

Chabosseau, P., Buhagiar-Labarchede, G., Onclercq-Delic, R., Lambert, S., Debatisse, M., Brison, O., and Amor-Gueret, M. (2011). Pyrimidine pool imbalance induced by BLM helicase deficiency contributes to genetic instability in Bloom syndrome. *Nat Commun* 2, 368.

Chaganti, R.S., Schonberg, S., and German, J. (1974). A manyfold increase in sister chromatid exchanges in Bloom's syndrome lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 71, 4508-4512.

Chan, K.L., and Hickson, I.D. (2009). On the origins of ultra-fine anaphase bridges. *Cell Cycle* 8, 3065-3066.

Chan, K.L., and Hickson, I.D. (2011). New insights into the formation and resolution of ultra-fine anaphase bridges. *Semin Cell Dev Biol*.

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

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

Cheeseman, I.M., Anderson, S., Jwa, M., Green, E.M., Kang, J., Yates, J.R., 3rd, Chan, C.S., Drubin, D.G., and Barnes, G. (2002). Phospho-regulation of kinetochore-microtubule attachments by the Aurora kinase Ipl1p. *Cell* *111*, 163-172.

Cheeseman, I.M., Chappie, J.S., Wilson-Kubalek, E.M., and Desai, A. (2006). The conserved KMN network constitutes the core microtubule-binding site of the kinetochore. *Cell* *127*, 983-997.

Cheeseman, I.M., and Desai, A. (2008). Molecular architecture of the kinetochore-microtubule interface. *Nat Rev Mol Cell Biol* *9*, 33-46.

Chen, C.Y., Graham, J., and Yan, H. (2001). Evidence for a replication function of FFA-1, the *Xenopus* orthologue of Werner syndrome protein. *J Cell Biol* *152*, 985-996.

Cheok, C.F., Wu, L., Garcia, P.L., Janscak, P., and Hickson, I.D. (2005). The Bloom's syndrome helicase promotes the annealing of complementary single-stranded DNA. *Nucleic Acids Res* *33*, 3932-3941.

Chikashige, Y., Kinoshita, N., Nakaseko, Y., Matsumoto, T., Murakami, S., Niwa, O., and Yanagida, M. (1989). Composite motifs and repeat symmetry in *S. pombe* centromeres: direct analysis by integration of NotI restriction sites. *Cell* *57*, 739-751.

Choo, K.H. (2001). Domain organization at the centromere and neocentromere. *Dev Cell* *1*, 165-177.

Christensen, M.O., Larsen, M.K., Barthelmes, H.U., Hock, R., Andersen, C.L., Kjeldsen, E., Knudsen, B.R., Westergaard, O., Boege, F., and Mielke, C. (2002). Dynamics of human DNA topoisomerases IIalpha and IIbeta in living cells. *J Cell Biol* *157*, 31-44.

Chueh, A.C., Northrop, E.L., Brettingham-Moore, K.H., Choo, K.H., and Wong, L.H. (2009). LINE retrotransposon RNA is an essential structural and functional epigenetic component of a core neocentromeric chromatin. *PLoS Genet* *5*, e1000354.

Ciferri, C., Pasqualato, S., Screpanti, E., Varetto, G., Santaguida, S., Dos Reis, G., Maiolica, A., Polka, J., De Luca, J.G., De Wulf, P., *et al.* (2008). Implications for kinetochore-microtubule attachment from the structure of an engineered Ndc80 complex. *Cell* *133*, 427-439.

Cimini, D. (2008). Merotelic kinetochore orientation, aneuploidy, and cancer. *Biochim Biophys Acta* *1786*, 32-40.

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

Ciosk, R., Zachariae, W., Michaelis, C., Shevchenko, A., Mann, M., and Nasmyth, K. (1998). An ESP1/PDS1 complex regulates loss of sister chromatid cohesion at the metaphase to anaphase transition in yeast. *Cell* *93*, 1067-1076.

- Clarke, D.J., Johnson, R.T., and Downes, C.S. (1993). Topoisomerase II inhibition prevents anaphase chromatid segregation in mammalian cells independently of the generation of DNA strand breaks. *J Cell Sci* *105 (Pt 2)*, 563-569.
- Clarke, L., and Carbon, J. (1980). Isolation of a yeast centromere and construction of functional small circular chromosomes. *Nature* *287*, 504-509.
- Clarke, L., and Carbon, J. (1983). Genomic substitutions of centromeres in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature* *305*, 23-28.
- Clarke, L., and Carbon, J. (1985). The structure and function of yeast centromeres. *Annu Rev Genet* *19*, 29-55.
- Cleaver, J.E. (1981). Correlations between sister chromatid exchange frequencies and replicon sizes. A model for the mechanism of SCE production. *Exp Cell Res* *136*, 27-30.
- Cleveland, D.W., Mao, Y., and Sullivan, K.F. (2003). Centromeres and kinetochores: from epigenetics to mitotic checkpoint signaling. *Cell* *112*, 407-421.
- Clute, P., and Pines, J. (1999). Temporal and spatial control of cyclin B1 destruction in metaphase. *Nat Cell Biol* *1*, 82-87.
- Coelho, P.A., Queiroz-Machado, J., Carmo, A.M., Moutinho-Pereira, S., Maiato, H., and Sunkel, C.E. (2008). Dual role of topoisomerase II in centromere resolution and aurora B activity. *PLoS Biol* *6*, e207.
- Cogoni, C., and Macino, G. (1999). Posttranscriptional gene silencing in *Neurospora* by a RecQ DNA helicase. *Science* *286*, 2342-2344.
- Collins, T.R., Hammes, G.G., and Hsieh, T.S. (2009). Analysis of the eukaryotic topoisomerase II DNA gate: a single-molecule FRET and structural perspective. *Nucleic Acids Res* *37*, 712-720.
- Cooke, C.A., Heck, M.M., and Earnshaw, W.C. (1987). The inner centromere protein (INCENP) antigens: movement from inner centromere to midbody during mitosis. *J Cell Biol* *105*, 2053-2067.
- Copenhaver, G.P., Nickel, K., Kuromori, T., Benito, M.I., Kaul, S., Lin, X., Bevan, M., Murphy, G., Harris, B., Parnell, L.D., *et al.* (1999). Genetic definition and sequence analysis of Arabidopsis centromeres. *Science* *286*, 2468-2474.
- Coux, O. (2002). The 26S proteasome. *Prog Mol Subcell Biol* *29*, 85-107.
- 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.
- Cui, S., Klima, R., Ochem, A., Arosio, D., Falaschi, A., and Vindigni, A. (2003). Characterization of the DNA-unwinding activity of human RECQ1, a helicase specifically stimulated by human replication protein A. *J Biol Chem* *278*, 1424-1432.

Davalos, A.R., Kaminker, P., Hansen, R.K., and Campisi, J. (2004). ATR and ATM-dependent movement of BLM helicase during replication stress ensures optimal ATM activation and 53BP1 focus formation. *Cell Cycle* 3, 1579-1586.

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.

Davies, S.L., North, P.S., and Hickson, I.D. (2007). Role for BLM in replication-fork restart and suppression of origin firing after replicative stress. *Nat Struct Mol Biol* 14, 677-679.

Dawlaty, M.M., Malureanu, L., Jeganathan, K.B., Kao, E., Sustmann, C., Tahk, S., Shuai, K., Grosschedl, R., and van Deursen, J.M. (2008). Resolution of sister centromeres requires RanBP2-mediated SUMOylation of topoisomerase IIalpha. *Cell* 133, 103-115.

De Boeck, G., Forsyth, R.G., Praet, M., and Hogendoorn, P.C. (2009). Telomere-associated proteins: cross-talk between telomere maintenance and telomere-lengthening mechanisms. *J Pathol* 217, 327-344.

Delbruck, M. (1954). On the Replication of Desoxyribonucleic Acid (DNA). *Proc Natl Acad Sci U S A* 40, 783-788.

DeLuca, J.G., Gall, W.E., Ciferri, C., Cimini, D., Musacchio, A., and Salmon, E.D. (2006). Kinetochore microtubule dynamics and attachment stability are regulated by Hec1. *Cell* 127, 969-982.

Depinet, T.W., Zackowski, J.L., Earnshaw, W.C., Kaffe, S., Sekhon, G.S., Stallard, R., Sullivan, B.A., Vance, G.H., Van Dyke, D.L., Willard, H.F., *et al.* (1997). Characterization of neo-centromeres in marker chromosomes lacking detectable alpha-satellite DNA. *Hum Mol Genet* 6, 1195-1204.

Descombes, P., and Nigg, E.A. (1998). The polo-like kinase Plx1 is required for M phase exit and destruction of mitotic regulators in *Xenopus* egg extracts. *EMBO J* 17, 1328-1335.

Diaz-Martinez, L.A., Gimenez-Abian, J.F., Azuma, Y., Guacci, V., Gimenez-Martin, G., Lanier, L.M., and Clarke, D.J. (2006). PIASgamma is required for faithful chromosome segregation in human cells. *PLoS One* 1, e53.

Diaz-Martinez, L.A., Gimenez-Abian, J.F., and Clarke, D.J. (2008). Chromosome cohesion - rings, knots, orcs and fellowship. *J Cell Sci* 121, 2107-2114.

Diaz, A., Vogiatzi, M.G., Sanz, M.M., and German, J. (2006). Evaluation of short stature, carbohydrate metabolism and other endocrinopathies in Bloom's syndrome. *Horm Res* 66, 111-117.

- Dillehay, L.E., Jacobson-Kram, D., and Williams, J.R. (1989). DNA topoisomerases and models of sister-chromatid exchange. *Mutat Res* 215, 15-23.
- Doherty, K.M., Sommers, J.A., Gray, M.D., Lee, J.W., von Kobbe, C., Thoma, N.H., Kureekattil, R.P., Kenny, M.K., and Brosh, R.M., Jr. (2005). Physical and functional mapping of the replication protein A interaction domain of the werner and bloom syndrome helicases. *J Biol Chem* 280, 29494-29505.
- Drake, J.W., Charlesworth, B., Charlesworth, D., and Crow, J.F. (1998). Rates of spontaneous mutation. *Genetics* 148, 1667-1686.
- Draviam, V.M., Xie, S., and Sorger, P.K. (2004). Chromosome segregation and genomic stability. *Curr Opin Genet Dev* 14, 120-125.
- du Sart, D., Cancilla, M.R., Earle, E., Mao, J.I., Saffery, R., Tainton, K.M., Kalitsis, P., Martyn, J., Barry, A.E., and Choo, K.H. (1997). A functional neo-centromere formed through activation of a latent human centromere and consisting of non-alpha-satellite DNA. *Nat Genet* 16, 144-153.
- Du, Y., Topp, C.N., and Dawe, R.K. (2010). DNA binding of centromere protein C (CENPC) is stabilized by single-stranded RNA. *PLoS Genet* 6, e1000835.
- Dutertre, S., Ababou, M., Onclercq, R., Delic, J., Chatton, B., Jaulin, C., and Amor-Gueret, M. (2000). Cell cycle regulation of the endogenous wild type Bloom's syndrome DNA helicase. *Oncogene* 19, 2731-2738.
- Dutertre, S., Sekhri, R., Tintignac, L.A., Onclercq-Delic, R., Chatton, B., Jaulin, C., and Amor-Gueret, M. (2002). Dephosphorylation and subcellular compartment change of the mitotic Bloom's syndrome DNA helicase in response to ionizing radiation. *J Biol Chem* 277, 6280-6286.
- Earnshaw, W.C., and Migeon, B.R. (1985). Three related centromere proteins are absent from the inactive centromere of a stable isodicentric chromosome. *Chromosoma* 92, 290-296.
- Eladad, S., Ye, T.Z., Hu, P., Leversha, M., Beresten, S., Matunis, M.J., and Ellis, N.A. (2005). Intra-nuclear trafficking of the BLM helicase to DNA damage-induced foci is regulated by SUMO modification. *Hum Mol Genet* 14, 1351-1365.
- Ellis, N.A., Ciocci, S., Proytcheva, M., Lennon, D., Groden, J., and German, J. (1998). The Ashkenazic Jewish Bloom syndrome mutation blmAsh is present in non-Jewish Americans of Spanish ancestry. *Am J Hum Genet* 63, 1685-1693.
- Ellis, N.A., Groden, J., Ye, T.Z., Straughen, J., Lennon, D.J., Ciocci, S., Proytcheva, M., and German, J. (1995a). The Bloom's syndrome gene product is homologous to RecQ helicases. *Cell* 83, 655-666.

Ellis, N.A., Lennon, D.J., Proytcheva, M., Alhadeff, B., Henderson, E.E., and German, J. (1995b). Somatic intragenic recombination within the mutated locus BLM can correct the high sister-chromatid exchange phenotype of Bloom syndrome cells. *Am J Hum Genet* 57, 1019-1027.

Emerit, I., and Cerutti, P. (1981). Clastogenic activity from Bloom syndrome fibroblast cultures. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78, 1868-1872.

Eot-Houllier, G., Fulcrand, G., Watanabe, Y., Magnaghi-Jaulin, L., and Jaulin, C. (2008). Histone deacetylase 3 is required for centromeric H3K4 deacetylation and sister chromatid cohesion. *Genes Dev* 22, 2639-2644.

Fang, G. (2002). Checkpoint protein BubR1 acts synergistically with Mad2 to inhibit anaphase-promoting complex. *Mol Biol Cell* 13, 755-766.

Fang, G., Yu, H., and Kirschner, M.W. (1998a). The checkpoint protein MAD2 and the mitotic regulator CDC20 form a ternary complex with the anaphase-promoting complex to control anaphase initiation. *Genes Dev* 12, 1871-1883.

Fang, G., Yu, H., and Kirschner, M.W. (1998b). Direct binding of CDC20 protein family members activates the anaphase-promoting complex in mitosis and G1. *Mol Cell* 2, 163-171.

Feeney, K.M., Wasson, C.W., and Parish, J.L. (2010). Cohesin: a regulator of genome integrity and gene expression. *Biochem J* 428, 147-161.

Ferri, F., Bouzinba-Segard, H., Velasco, G., Hube, F., and Francastel, C. (2009). Non-coding murine centromeric transcripts associate with and potentiate Aurora B kinase. *Nucleic Acids Res* 37, 5071-5080.

Fire, A., Xu, S., Montgomery, M.K., Kostas, S.A., Driver, S.E., and Mello, C.C. (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391, 806-811.

Fitzgerald-Hayes, M., Buhler, J.M., Cooper, T.G., and Carbon, J. (1982). Isolation and subcloning analysis of functional centromere DNA (CEN11) from *Saccharomyces cerevisiae* chromosome XI. *Mol Cell Biol* 2, 82-87.

FitzGerald, J.E., Grenon, M., and Lowndes, N.F. (2009). 53BP1: function and mechanisms of focal recruitment. *Biochem Soc Trans* 37, 897-904.

Florida, G., Zatterale, A., Zuffardi, O., and Tyler-Smith, C. (2000). Mapping of a human centromere onto the DNA by topoisomerase II cleavage. *EMBO Rep* 1, 489-493.

Folco, H.D., Pidoux, A.L., Urano, T., and Allshire, R.C. (2008). Heterochromatin and RNAi are required to establish CENP-A chromatin at centromeres. *Science* 319, 94-97.

- Foucault, F., Vaury, C., Barakat, A., Thibout, D., Planchon, P., Jaulin, C., Praz, F., and Amor-Gueret, M. (1997). Characterization of a new BLM mutation associated with a topoisomerase II alpha defect in a patient with Bloom's syndrome. *Hum Mol Genet* *6*, 1427-1434.
- 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.
- Friedberg, E.C. (2005). Suffering in silence: the tolerance of DNA damage. *Nat Rev Mol Cell Biol* *6*, 943-953.
- Funabiki, H., Yamano, H., Kumada, K., Nagao, K., Hunt, T., and Yanagida, M. (1996). Cut2 proteolysis required for sister-chromatid separation in fission yeast. *Nature* *381*, 438-441.
- Gallant, P., and Nigg, E.A. (1992). Cyclin B2 undergoes cell cycle-dependent nuclear translocation and, when expressed as a non-destructible mutant, causes mitotic arrest in HeLa cells. *J Cell Biol* *117*, 213-224.
- Gangloff, S., de Massy, B., Arthur, L., Rothstein, R., and Fabre, F. (1999). The essential role of yeast topoisomerase III in meiosis depends on recombination. *EMBO J* *18*, 1701-1711.
- 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.
- Garcia, P.L., Liu, Y., Jiricny, J., West, S.C., and Janscak, P. (2004). Human RECQ5beta, a protein with DNA helicase and strand-annealing activities in a single polypeptide. *Embo J* *23*, 2882-2891.
- Gartenberg, M.R., and Wang, J.C. (1992). Positive supercoiling of DNA greatly diminishes mRNA synthesis in yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A* *89*, 11461-11465.
- Gassmann, R., Carvalho, A., Henzing, A.J., Ruchaud, S., Hudson, D.F., Honda, R., Nigg, E.A., Gerloff, D.L., and Earnshaw, W.C. (2004). Borealin: a novel chromosomal passenger required for stability of the bipolar mitotic spindle. *J Cell Biol* *166*, 179-191.
- German, J. (1964). Cytological Evidence for Crossing-over in Vitro in Human Lymphoid Cells. *Science* *144*, 298-301.
- German, J. (1969). Bloom's syndrome. I. Genetical and clinical observations in the first twenty-seven patients. *Am J Hum Genet* *21*, 196-227.
- German, J. (1995). Bloom's syndrome. *Dermatol Clin* *13*, 7-18.
- German, J. (1997). Bloom's syndrome. XX. The first 100 cancers. *Cancer Genet Cytogenet* *93*, 100-106.
- German, J., Archibald, R., and Bloom, D. (1965). Chromosomal Breakage in a Rare and Probably Genetically Determined Syndrome of Man. *Science* *148*, 506-507.

- German, J., Bloom, D., and Passarge, E. (1977a). Bloom's syndrome. V. Surveillance for cancer in affected families. *Clin Genet* 12, 162-168.
- German, J., Bloom, D., and Passarge, E. (1984). Bloom's syndrome XI. Progress report for 1983. *Clin Genet* 25, 166-174.
- German, J., Crippa, L.P., and Bloom, D. (1974). Bloom's syndrome. III. Analysis of the chromosome aberration characteristic of this disorder. *Chromosoma* 48, 361-366.
- German, J., and Passarge, E. (1989). Bloom's syndrome. XII. Report from the Registry for 1987. *Clin Genet* 35, 57-69.
- German, J., Roe, A.M., Leppert, M.F., and Ellis, N.A. (1994). Bloom syndrome: an analysis of consanguineous families assigns the locus mutated to chromosome band 15q26.1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 6669-6673.
- German, J., Sanz, M.M., Ciocci, S., Ye, T.Z., and Ellis, N.A. (2007). Syndrome-causing mutations of the BLM gene in persons in the Bloom's Syndrome Registry. *Hum Mutat* 28, 743-753.
- German, J., Schonberg, S., Louie, E., and Chaganti, R.S. (1977b). Bloom's syndrome. IV. Sister-chromatid exchanges in lymphocytes. *Am J Hum Genet* 29, 248-255.
- Gestaut, D.R., Graczyk, B., Cooper, J., Widlund, P.O., Zelter, A., Wordeman, L., Asbury, C.L., and Davis, T.N. (2008). Phosphoregulation and depolymerization-driven movement of the Dam1 complex do not require ring formation. *Nat Cell Biol* 10, 407-414.
- Gharibyan, V., and Youssoufian, H. (1999). Localization of the Bloom syndrome helicase to punctate nuclear structures and the nuclear matrix and regulation during the cell cycle: comparison with the Werner's syndrome helicase. *Mol Carcinog* 26, 261-273.
- Gimenez-Abian, J.F., Clarke, D.J., Devlin, J., Gimenez-Abian, M.I., De la Torre, C., Johnson, R.T., Mullinger, A.M., and Downes, C.S. (2000). Premitotic chromosome individualization in mammalian cells depends on topoisomerase II activity. *Chromosoma* 109, 235-244.
- Gimenez-Abian, J.F., Clarke, D.J., Mullinger, A.M., Downes, C.S., and Johnson, R.T. (1995). A postprophase topoisomerase II-dependent chromatid core separation step in the formation of metaphase chromosomes. *J Cell Biol* 131, 7-17.
- Glotzer, M., Murray, A.W., and Kirschner, M.W. (1991). Cyclin is degraded by the ubiquitin pathway. *Nature* 349, 132-138.
- Gorbalenya, A.E., Koonin, E.V., Donchenko, A.P., and Blinov, V.M. (1989). Two related superfamilies of putative helicases involved in replication, recombination, repair and expression of DNA and RNA genomes. *Nucleic Acids Res* 17, 4713-4730.

Gorbsky, G.J. (1994). Cell cycle progression and chromosome segregation in mammalian cells cultured in the presence of the topoisomerase II inhibitors ICRF-187 [(+)-1,2-bis(3,5-dioxopiperazinyl-1-yl)propane; ADR-529] and ICRF-159 (Razoxane). *Cancer Res* 54, 1042-1048.

Goto, T., and Wang, J.C. (1985). Cloning of yeast TOP1, the gene encoding DNA topoisomerase I, and construction of mutants defective in both DNA topoisomerase I and DNA topoisomerase II. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82, 7178-7182.

Gray, M.D., Shen, J.C., Kamath-Loeb, A.S., Blank, A., Sopher, B.L., Martin, G.M., Oshima, J., and Loeb, L.A. (1997). The Werner syndrome protein is a DNA helicase. *Nat Genet* 17, 100-103.

Grewal, S.I., and Elgin, S.C. (2007). Transcription and RNA interference in the formation of heterochromatin. *Nature* 447, 399-406.

Gruber, S., Haering, C.H., and Nasmyth, K. (2003). Chromosomal cohesin forms a ring. *Cell* 112, 765-777.

Guacci, V. (2007). Sister chromatid cohesion: the cohesin cleavage model does not ring true. *Genes Cells* 12, 693-708.

Guacci, V., Hogan, E., and Koshland, D. (1994). Chromosome condensation and sister chromatid pairing in budding yeast. *J Cell Biol* 125, 517-530.

Guo, R.B., Rigolet, P., Zargarian, L., Fermandjian, S., and Xi, X.G. (2005). Structural and functional characterizations reveal the importance of a zinc binding domain in Bloom's syndrome helicase. *Nucleic Acids Res* 33, 3109-3124.

Haering, C.H., Lowe, J., Hochwagen, A., and Nasmyth, K. (2002). Molecular architecture of SMC proteins and the yeast cohesin complex. *Mol Cell* 9, 773-788.

Hall, I.M., Shankaranarayana, G.D., Noma, K., Ayoub, N., Cohen, A., and Grewal, S.I. (2002). Establishment and maintenance of a heterochromatin domain. *Science* 297, 2232-2237.

Hanada, K., Budzowska, M., Davies, S.L., van Drunen, E., Onizawa, H., Beverloo, H.B., Maas, A., Essers, J., Hickson, I.D., and Kanaar, R. (2007). The structure-specific endonuclease Mus81 contributes to replication restart by generating double-strand DNA breaks. *Nat Struct Mol Biol* 14, 1096-1104.

Hand, R., and German, J. (1975). A retarded rate of DNA chain growth in Bloom's syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 72, 758-762.

Harmon, F.G., and Kowalczykowski, S.C. (2001). Biochemical characterization of the DNA helicase activity of the escherichia coli RecQ helicase. *J Biol Chem* 276, 232-243.

Hart, C.M., and Laemmli, U.K. (1998). Facilitation of chromatin dynamics by SARs. *Curr Opin Genet Dev* 8, 519-525.

Hartung, F., Plchova, H., and Puchta, H. (2000). Molecular characterisation of RecQ homologues in *Arabidopsis thaliana*. *Nucleic Acids Res* 28, 4275-4282.

Hartung, F., and Puchta, H. (2006). The RecQ gene family in plants. *J Plant Physiol* 163, 287-296.

Hauf, S., Waizenegger, I.C., and Peters, J.M. (2001). Cohesin cleavage by separase required for anaphase and cytokinesis in human cells. *Science* 293, 1320-1323.

Hayakawa, S., Kaneko, H., Fukao, T., Kasahara, K., Matsumoto, T., Furuichi, Y., and Kondo, N. (2000). Characterization of the nuclear localization signal in the DNA helicase responsible for Bloom syndrome. *Int J Mol Med* 5, 477-484.

Hemphill, A.W., Akkari, Y., Newell, A.H., Schultz, R.A., Grompe, M., North, P.S., Hickson, I.D., Jakobs, P.M., Rennie, S., Pauw, D., *et al.* (2009). Topo IIIalpha and BLM act within the Fanconi anemia pathway in response to DNA-crosslinking agents. *Cytogenet Genome Res* 125, 165-175.

Hershman, S.G., Chen, Q., Lee, J.Y., Kozak, M.L., Yue, P., Wang, L.S., and Johnson, F.B. (2008). Genomic distribution and functional analyses of potential G-quadruplex-forming sequences in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res* 36, 144-156.

Heyer, W.D., Li, X., Rolfsmeier, M., and Zhang, X.P. (2006). Rad54: the Swiss Army knife of homologous recombination? *Nucleic Acids Res* 34, 4115-4125.

Hickson, I.D. (2003). RecQ helicases: caretakers of the genome. *Nat Rev Cancer* 3, 169-178.

Hieter, P., Pridmore, D., Hegemann, J.H., Thomas, M., Davis, R.W., and Philippsen, P. (1985). Functional selection and analysis of yeast centromeric DNA. *Cell* 42, 913-921.

Hirano, S., Yamamoto, K., Ishiai, M., Yamazoe, M., Seki, M., Matsushita, N., Ohzeki, M., Yamashita, Y.M., Arakawa, H., Buerstedde, J.M., *et al.* (2005). Functional relationships of FANCC to homologous recombination, translesion synthesis, and BLM. *Embo J* 24, 418-427.

Holloway, S.L., Glotzer, M., King, R.W., and Murray, A.W. (1993). Anaphase is initiated by proteolysis rather than by the inactivation of maturation-promoting factor. *Cell* 73, 1393-1402.

Holm, C., Goto, T., Wang, J.C., and Botstein, D. (1985). DNA topoisomerase II is required at the time of mitosis in yeast. *Cell* 41, 553-563.

Holm, C., Stearns, T., and Botstein, D. (1989). DNA topoisomerase II must act at mitosis to prevent nondisjunction and chromosome breakage. *Mol Cell Biol* 9, 159-168.

Honda, R., Korner, R., and Nigg, E.A. (2003). Exploring the functional interactions between Aurora B, INCENP, and survivin in mitosis. *Mol Biol Cell* 14, 3325-3341.

Hoque, M.T., and Ishikawa, F. (2002). Cohesin defects lead to premature sister chromatid separation, kinetochore dysfunction, and spindle-assembly checkpoint activation. *J Biol Chem* 277, 42306-42314.

Hoyt, M.A., Totis, L., and Roberts, B.T. (1991). *S. cerevisiae* genes required for cell cycle arrest in response to loss of microtubule function. *Cell* 66, 507-517.

Hu, P., Beresten, S.F., van Brabant, A.J., Ye, T.Z., Pandolfi, P.P., Johnson, F.B., Guarente, L., and Ellis, N.A. (2001). Evidence for BLM and Topoisomerase III α interaction in genomic stability. *Hum Mol Genet* 10, 1287-1298.

Huang, C.E., Milutinovich, M., and Koshland, D. (2005). Rings, bracelet or snaps: fashionable alternatives for Smc complexes. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 360, 537-542.

Huber, M.D., Duquette, M.L., Shiels, J.C., and Maizels, N. (2006). A conserved G4 DNA binding domain in RecQ family helicases. *J Mol Biol* 358, 1071-1080.

Huppert, J.L., and Balasubramanian, S. (2005). Prevalence of quadruplexes in the human genome. *Nucleic Acids Res* 33, 2908-2916.

Huppert, J.L., and Balasubramanian, S. (2007). G-quadruplexes in promoters throughout the human genome. *Nucleic Acids Res* 35, 406-413.

Hwang, L.H., Lau, L.F., Smith, D.L., Mistrot, C.A., Hardwick, K.G., Hwang, E.S., Amon, A., and Murray, A.W. (1998). Budding yeast Cdc20: a target of the spindle checkpoint. *Science* 279, 1041-1044.

Inoue, S., and Salmon, E.D. (1995). Force generation by microtubule assembly/disassembly in mitosis and related movements. *Mol Biol Cell* 6, 1619-1640.

Ishida, R., Sato, M., Narita, T., Utsumi, K.R., Nishimoto, T., Morita, T., Nagata, H., and Andoh, T. (1994). Inhibition of DNA topoisomerase II by ICRF-193 induces polyploidization by uncoupling chromosome dynamics from other cell cycle events. *J Cell Biol* 126, 1341-1351.

Ishii, Y., and Bender, M.A. (1980). Effects of inhibitors of DNA synthesis on spontaneous and ultraviolet light-induced sister-chromatid exchanges in Chinese hamster cells. *Mutat Res* 79, 19-32.

Ishimi, Y., Sugawara, K., Hanaoka, F., Eki, T., and Hurwitz, J. (1992). Topoisomerase II plays an essential role as a swivelase in the late stage of SV40 chromosome replication in vitro. *J Biol Chem* 267, 462-466.

Iwabuchi, K., Bartel, P.L., Li, B., Marraccino, R., and Fields, S. (1994). Two cellular proteins that bind to wild-type but not mutant p53. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 6098-6102.

Jackson, J.R., Patrick, D.R., Dar, M.M., and Huang, P.S. (2007). Targeted anti-mitotic therapies: can we improve on tubulin agents? *Nat Rev Cancer* 7, 107-117.

Joglekar, A.P., Bouck, D., Finley, K., Liu, X., Wan, Y., Berman, J., He, X., Salmon, E.D., and Bloom, K.S. (2008). Molecular architecture of the kinetochore-microtubule attachment site is conserved between point and regional centromeres. *J Cell Biol* 181, 587-594.

Johnson, F.B., Lombard, D.B., Neff, N.F., Mastrangelo, M.A., Dewolf, W., Ellis, N.A., Marciniak, R.A., Yin, Y., Jaenisch, R., and Guarente, L. (2000). Association of the Bloom syndrome protein with topoisomerase III α in somatic and meiotic cells. *Cancer Res* *60*, 1162-1167.

Johnson, J.E., Cao, K., Ryvkin, P., Wang, L.S., and Johnson, F.B. (2009). Altered gene expression in the Werner and Bloom syndromes is associated with sequences having G-quadruplex forming potential. *Nucleic Acids Res* *38*, 1114-1122.

Jolly, C., Metz, A., Govin, J., Vigneron, M., Turner, B.M., Khochbin, S., and Vourc'h, C. (2004). Stress-induced transcription of satellite III repeats. *J Cell Biol* *164*, 25-33.

Jun, S., and Mulder, B. (2006). Entropy-driven spatial organization of highly confined polymers: lessons for the bacterial chromosome. *Proc Natl Acad Sci U S A* *103*, 12388-12393.

Kadyk, L.C., and Hartwell, L.H. (1992). Sister chromatids are preferred over homologs as substrates for recombinational repair in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* *132*, 387-402.

Kaneko, H., Inoue, R., Yamada, Y., Sukegawa, K., Fukao, T., Tashita, H., Teramoto, T., Kasahara, K., Takami, T., and Kondo, N. (1996). Microsatellite instability in B-cell lymphoma originating from Bloom syndrome. *Int J Cancer* *69*, 480-483.

Kaneko, H., Orii, K.O., Matsui, E., Shimozawa, N., Fukao, T., Matsumoto, T., Shimamoto, A., Furuichi, Y., Hayakawa, S., Kasahara, K., *et al.* (1997). BLM (the causative gene of Bloom syndrome) protein translocation into the nucleus by a nuclear localization signal. *Biochem Biophys Res Commun* *240*, 348-353.

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.

Karow, J.K., Newman, R.H., Freemont, P.S., and Hickson, I.D. (1999). Oligomeric ring structure of the Bloom's syndrome helicase. *Curr Biol* *9*, 597-600.

Katis, V.L., Galova, M., Rabitsch, K.P., Gregan, J., and Nasmyth, K. (2004). Maintenance of cohesin at centromeres after meiosis I in budding yeast requires a kinetochore-associated protein related to MEI-S332. *Curr Biol* *14*, 560-572.

Ke, Y., Huh, J.W., Warrington, R., Li, B., Wu, N., Leng, M., Zhang, J., Ball, H.L., and Yu, H. (2011a). PICH and BLM limit histone association with anaphase centromeric DNA threads and promote their resolution. *EMBO J*.

- Ke, Y., Huh, J.W., Warrington, R., Li, B., Wu, N., Leng, M., Zhang, J., Ball, H.L., and Yu, H. (2011b). PICH and BLM limit histone association with anaphase centromeric DNA threads and promote their resolution. *EMBO J* 30, 3309-3321.
- Kellermayer, R. (2006). The versatile RECQL4. *Genet Med* 8, 213-216.
- Kenney, R.D., and Heald, R. (2006). Essential roles for cohesin in kinetochore and spindle function in *Xenopus* egg extracts. *J Cell Sci* 119, 5057-5066.
- Kerrebrock, A.W., Miyazaki, W.Y., Birnby, D., and Orr-Weaver, T.L. (1992). The *Drosophila* mei-S332 gene promotes sister-chromatid cohesion in meiosis following kinetochore differentiation. *Genetics* 130, 827-841.
- Kim, S.H., Lin, D.P., Matsumoto, S., Kitazono, A., and Matsumoto, T. (1998). Fission yeast Slp1: an effector of the Mad2-dependent spindle checkpoint. *Science* 279, 1045-1047.
- Kitajima, T.S., Kawashima, S.A., and Watanabe, Y. (2004). The conserved kinetochore protein shugoshin protects centromeric cohesion during meiosis. *Nature* 427, 510-517.
- Kitao, S., Shimamoto, A., Goto, M., Miller, R.W., Smithson, W.A., Lindor, N.M., and Furuichi, Y. (1999). Mutations in RECQL4 cause a subset of cases of Rothmund-Thomson syndrome. *Nat Genet* 22, 82-84.
- Klein, U.R., Nigg, E.A., and Gruneberg, U. (2006). Centromere targeting of the chromosomal passenger complex requires a ternary subcomplex of Borealin, Survivin, and the N-terminal domain of INCENP. *Mol Biol Cell* 17, 2547-2558.
- Kolodner, R.D., Putnam, C.D., and Myung, K. (2002). Maintenance of genome stability in *Saccharomyces cerevisiae*. *Science* 297, 552-557.
- Koshland, D., and Hartwell, L.H. (1987). The structure of sister minichromosome DNA before anaphase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Science* 238, 1713-1716.
- Kostriken, R., Strathern, J.N., Klar, A.J., Hicks, J.B., and Heffron, F. (1983). A site-specific endonuclease essential for mating-type switching in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell* 35, 167-174.
- Kotani, S., Tugendreich, S., Fujii, M., Jorgensen, P.M., Watanabe, N., Hoog, C., Hieter, P., and Todokoro, K. (1998). PKA and MPF-activated polo-like kinase regulate anaphase-promoting complex activity and mitosis progression. *Mol Cell* 1, 371-380.
- Kotwaliwale, C., and Biggins, S. (2006). Microtubule capture: a concerted effort. *Cell* 127, 1105-1108.
- Kuhn, E.M. (1980). Effects of X-irradiation in G1 and G2 on Bloom's Syndrome and normal chromosomes. *Hum Genet* 54, 335-341.
- Kusunoki, Y., Hayashi, T., Hirai, Y., Kushiro, J., Tatsumi, K., Kurihara, T., Zghal, M., Kamoun, M.R., Takebe, H., Jeffreys, A., *et al.* (1994). Increased rate of spontaneous mitotic recombination

in T lymphocytes from a Bloom's syndrome patient using a flow-cytometric assay at HLA-A locus. *Jpn J Cancer Res* 85, 610-618.

Lachaud, A.A., Auclair-Vincent, S., Massip, L., Audet-Walsh, E., Lebel, M., and Anderson, A. (2009). Werner's syndrome helicase participates in transcription of phenobarbital-inducible CYP2B genes in rat and mouse liver. *Biochem Pharmacol* 79, 463-470.

Lahkim Bennani-Belhaj, K., Rouzeau, S., Buhagiar-Labarchede, G., Chabosseau, P., Onclercq-Delic, R., Bayart, E., Cordelieres, F., Couturier, J., and Amor-Gueret, M. (2010a). The Bloom syndrome protein limits the lethality associated with RAD51 deficiency. *Mol Cancer Res* 8, 385-394.

Lahkim Bennani-Belhaj, K., Buhagiar-Labarchede, G., Jmari, N., Onclercq-Delic, R., and Amor-Gueret, M. (2010b). BLM deficiency is not associated with sensitivity to hydroxyurea-induced replication stress. *J Nucleic Acids*

Lam, A.L., Boivin, C.D., Bonney, C.F., Rudd, M.K., and Sullivan, B.A. (2006). Human centromeric chromatin is a dynamic chromosomal domain that can spread over noncentromeric DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 4186-4191.

Lamarche, B.J., Orazio, N.I., and Weitzman, M.D. (2010). The MRN complex in double-strand break repair and telomere maintenance. *FEBS Lett.*

Latt, S.A. (1973). Microfluorometric detection of deoxyribonucleic acid replication in human metaphase chromosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 70, 3395-3399.

Laursen, L.V., Bjergback, L., Murray, J.M., and Andersen, A.H. (2003). RecQ helicases and topoisomerase III in cancer and aging. *Biogerontology* 4, 275-287.

Lee, J.H., and Paull, T.T. (2007). Activation and regulation of ATM kinase activity in response to DNA double-strand breaks. *Oncogene* 26, 7741-7748.

Lee, K.H., Abe, S., Yanabe, Y., Matsuda, I., and Yoshida, M.C. (1990). Superoxide dismutase activity and chromosome damage in cultured chromosome instability syndrome cells. *Mutat Res* 244, 251-256.

Leng, M., Chan, D.W., Luo, H., Zhu, C., Qin, J., and Wang, Y. (2006). MPS1-dependent mitotic BLM phosphorylation is important for chromosome stability. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 11485-11490.

Li, R., and Murray, A.W. (1991). Feedback control of mitosis in budding yeast. *Cell* 66, 519-531.

Li, X., and Heyer, W.D. (2008). Homologous recombination in DNA repair and DNA damage tolerance. *Cell Res* 18, 99-113.

Lillard-Wetherell, K., Machwe, A., Langland, G.T., Combs, K.A., Behbehani, G.K., Schonberg, S.A., German, J., Turchi, J.J., Orren, D.K., and Groden, J. (2004). Association and regulation of the BLM helicase by the telomere proteins TRF1 and TRF2. *Hum Mol Genet* *13*, 1919-1932.

Lindqvist, A., Rodriguez-Bravo, V., and Medema, R.H. (2009). The decision to enter mitosis: feedback and redundancy in the mitotic entry network. *J Cell Biol* *185*, 193-202.

Liu, D., Vleugel, M., Backer, C.B., Hori, T., Fukagawa, T., Cheeseman, I.M., and Lampson, M.A. (2010). Regulated targeting of protein phosphatase 1 to the outer kinetochore by KNL1 opposes Aurora B kinase. *J Cell Biol* *188*, 809-820.

Liu, J., and Marians, K.J. (1999). PriA-directed assembly of a primosome on D loop DNA. *J Biol Chem* *274*, 25033-25041.

Liu, J.L., Rigolet, P., Dou, S.X., Wang, P.Y., and Xi, X.G. (2004). The zinc finger motif of *Escherichia coli* RecQ is implicated in both DNA binding and protein folding. *J Biol Chem* *279*, 42794-42802.

Liu, Y., and West, S.C. (2008). More complexity to the Bloom's syndrome complex. *Genes Dev* *22*, 2737-2742.

Lonn, U., Lonn, S., Nylen, U., Winblad, G., and German, J. (1990). An abnormal profile of DNA replication intermediates in Bloom's syndrome. *Cancer Res* *50*, 3141-3145.

Losada, A. (2007). Cohesin regulation: fashionable ways to wear a ring. *Chromosoma* *116*, 321-329.

Losada, A., Hirano, M., and Hirano, T. (2002). Cohesin release is required for sister chromatid resolution, but not for condensin-mediated compaction, at the onset of mitosis. *Genes Dev* *16*, 3004-3016.

Luca, F.C., Shibuya, E.K., Dohrmann, C.E., and Ruderman, J.V. (1991). Both cyclin A delta 60 and B delta 97 are stable and arrest cells in M-phase, but only cyclin B delta 97 turns on cyclin destruction. *EMBO J* *10*, 4311-4320.

Lukas, C., Savic, V., Bekker-Jensen, S., Doil, C., Neumann, B., Pedersen, R.S., Grofte, M., Chan, K.L., Hickson, I.D., Bartek, J., *et al.* (2011). 53BP1 nuclear bodies form around DNA lesions generated by mitotic transmission of chromosomes under replication stress. *Nat Cell Biol* *13*, 243-253.

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

Machwe, A., Lozada, E.M., Xiao, L., and Orren, D.K. (2006). Competition between the DNA unwinding and strand pairing activities of the Werner and Bloom syndrome proteins. *BMC Mol Biol* 7, 1.

Malmanche, N., Maia, A., and Sunkel, C.E. (2006). The spindle assembly checkpoint: preventing chromosome mis-segregation during mitosis and meiosis. *FEBS Lett* 580, 2888-2895.

Mandell, J.G., Goodrich, K.J., Bahler, J., and Cech, T.R. (2005). Expression of a RecQ helicase homolog affects progression through crisis in fission yeast lacking telomerase. *J Biol Chem* 280, 5249-5257.

Mankouri, H.W., and Hickson, I.D. (2007). The RecQ helicase-topoisomerase III-Rmi1 complex: a DNA structure-specific 'dissolvasome'? *Trends Biochem Sci* 32, 538-546.

Maresca, T.J., Groen, A.C., Gatlin, J.C., Ohi, R., Mitchison, T.J., and Salmon, E.D. (2009). Spindle assembly in the absence of a RanGTP gradient requires localized CPC activity. *Curr Biol* 19, 1210-1215.

Maresca, T.J., and Salmon, E.D. (2010). Welcome to a new kind of tension: translating kinetochore mechanics into a wait-anaphase signal. *J Cell Sci* 123, 825-835.

May, B.P., Lippman, Z.B., Fang, Y., Spector, D.L., and Martienssen, R.A. (2005). Differential regulation of strand-specific transcripts from Arabidopsis centromeric satellite repeats. *PLoS Genet* 1, e79.

Mazin, A.V., Mazina, O.M., Bugreev, D.V., and Rossi, M.J. (2010). Rad54, the motor of homologous recombination. *DNA Repair (Amst)* 9, 286-302.

McDaniel, L.D., and Schultz, R.A. (1992). Elevated sister chromatid exchange phenotype of Bloom syndrome cells is complemented by human chromosome 15. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 7968-7972.

McGrew, J., Diehl, B., and Fitzgerald-Hayes, M. (1986). Single base-pair mutations in centromere element III cause aberrant chromosome segregation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 6, 530-538.

McGuinness, B.E., Hirota, T., Kudo, N.R., Peters, J.M., and Nasmyth, K. (2005). Shugoshin prevents dissociation of cohesin from centromeres during mitosis in vertebrate cells. *PLoS Biol* 3, e86.

McVey, M., Larocque, J.R., Adams, M.D., and Sekelsky, J.J. (2004). Formation of deletions during double-strand break repair in *Drosophila* DmBlm mutants occurs after strand invasion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 15694-15699.

- 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.
- Mills, M., Lacroix, L., Arimondo, P.B., Leroy, J.L., Francois, J.C., Klump, H., and Mergny, J.L. (2002). Unusual DNA conformations: implications for telomeres. *Curr Med Chem Anticancer Agents* 2, 627-644.
- Mitchison, T., and Kirschner, M. (1984). Dynamic instability of microtubule growth. *Nature* 312, 237-242.
- Mohaghegh, P., Karow, J.K., Brosh, R.M., Jr., Bohr, V.A., and Hickson, I.D. (2001). The Bloom's and Werner's syndrome proteins are DNA structure-specific helicases. *Nucleic Acids Res* 29, 2843-2849.
- Moldovan, G.L., and D'Andrea, A.D. (2009). How the fanconi anemia pathway guards the genome. *Annu Rev Genet* 43, 223-249.
- Mondal, N., and Parvin, J.D. (2001). DNA topoisomerase IIalpha is required for RNA polymerase II transcription on chromatin templates. *Nature* 413, 435-438.
- Mondal, N., Zhang, Y., Jonsson, Z., Dhar, S.K., Kannapiran, M., and Parvin, J.D. (2003). Elongation by RNA polymerase II on chromatin templates requires topoisomerase activity. *Nucleic Acids Res* 31, 5016-5024.
- Morozov, V., Mushegian, A.R., Koonin, E.V., and Bork, P. (1997). A putative nucleic acid-binding domain in Bloom's and Werner's syndrome helicases. *Trends Biochem Sci* 22, 417-418.
- Murray, A.W. (2004). Recycling the cell cycle: cyclins revisited. *Cell* 116, 221-234.
- Murray, A.W., Solomon, M.J., and Kirschner, M.W. (1989). The role of cyclin synthesis and degradation in the control of maturation promoting factor activity. *Nature* 339, 280-286.
- Musacchio, A., and Hardwick, K.G. (2002). The spindle checkpoint: structural insights into dynamic signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3, 731-741.
- Musacchio, A., and Salmon, E.D. (2007). The spindle-assembly checkpoint in space and time. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8, 379-393.
- Naim, V., and Rosselli, F. (2009). The FANCD1 pathway and BLM collaborate during mitosis to prevent micro-nucleation and chromosome abnormalities. *Nat Cell Biol* 11, 761-768.
- Nakajima, M., Kumada, K., Hatakeyama, K., Noda, T., Peters, J.M., and Hirota, T. (2007). The complete removal of cohesin from chromosome arms depends on separase. *J Cell Sci* 120, 4188-4196.
- Nakayama, K., Irino, N., and Nakayama, H. (1985). The recQ gene of Escherichia coli K12: molecular cloning and isolation of insertion mutants. *Mol Gen Genet* 200, 266-271.

Nasmyth, K., and Haering, C.H. (2009). Cohesin: its roles and mechanisms. *Annu Rev Genet* 43, 525-558.

Nezi, L., and Musacchio, A. (2009). Sister chromatid tension and the spindle assembly checkpoint. *Curr Opin Cell Biol* 21, 785-795.

Nicklas, R.B. (1997). How cells get the right chromosomes. *Science* 275, 632-637.

Nicotera, T., Thusu, K., and Dandona, P. (1993). Elevated production of active oxygen in Bloom's syndrome cell lines. *Cancer Res* 53, 5104-5107.

Nicotera, T.M. (1991). Molecular and biochemical aspects of Bloom's syndrome. *Cancer Genet Cytogenet* 53, 1-13.

Nicotera, T.M., Notaro, J., Notaro, S., Schumer, J., and Sandberg, A.A. (1989). Elevated superoxide dismutase in Bloom's syndrome: a genetic condition of oxidative stress. *Cancer Res* 49, 5239-5243.

Nigg, E.A. (2001). Mitotic kinases as regulators of cell division and its checkpoints. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2, 21-32.

Nimonkar, A.V., Ozsoy, A.Z., Genschel, J., Modrich, P., and Kowalczykowski, S.C. (2008). Human exonuclease 1 and BLM helicase interact to resect DNA and initiate DNA repair. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 16906-16911.

Nitiss, J.L. (2009). DNA topoisomerase II and its growing repertoire of biological functions. *Nat Rev Cancer* 9, 327-337.

Norbury, C., and Nurse, P. (1990). Controls of cell proliferation in yeast and animals. *Ciba Found Symp* 150, 168-177; discussion 177-183.

Nousiainen, M., Sillje, H.H., Sauer, G., Nigg, E.A., and Korner, R. (2006). Phosphoproteome analysis of the human mitotic spindle. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 5391-5396.

Null, A.P., Hudson, J., and Gorbsky, G.J. (2002). Both alpha and beta isoforms of mammalian DNA topoisomerase II associate with chromosomes in mitosis. *Cell Growth Differ* 13, 325-333.

Oliveira, R.A., Hamilton, R.S., Pauli, A., Davis, I., and Nasmyth, K. (2010). Cohesin cleavage and Cdk inhibition trigger formation of daughter nuclei. *Nat Cell Biol* 12, 185-192.

Onclercq-Delic, R., Calsou, P., Delteil, C., Salles, B., Papadopoulo, D., and Amor-Gueret, M. (2003). Possible anti-recombinogenic role of Bloom's syndrome helicase in double-strand break processing. *Nucleic Acids Res* 31, 6272-6282.

Opresko, P.L., von Kobbe, C., Laine, J.P., Harrigan, J., Hickson, I.D., and Bohr, V.A. (2002). Telomere-binding protein TRF2 binds to and stimulates the Werner and Bloom syndrome helicases. *J Biol Chem* 277, 41110-41119.

- Osman, F., and Whitby, M.C. (2007). Exploring the roles of Mus81-Eme1/Mms4 at perturbed replication forks. *DNA Repair (Amst)* 6, 1004-1017.
- Ouyang, K.J., Woo, L.L., Zhu, J., Huo, D., Matunis, M.J., and Ellis, N.A. (2009). SUMO modification regulates BLM and RAD51 interaction at damaged replication forks. *PLoS Biol* 7, e1000252.
- Ozsoy, A.Z., Ragonese, H.M., and Matson, S.W. (2003). Analysis of helicase activity and substrate specificity of *Drosophila* RECQ5. *Nucleic Acids Res* 31, 1554-1564.
- Painter, R.B. (1980). A replication model for sister-chromatid exchange. *Mutat Res* 70, 337-341.
- Palmer, D.K., O'Day, K., Wener, M.H., Andrews, B.S., and Margolis, R.L. (1987). A 17-kD centromere protein (CENP-A) copurifies with nucleosome core particles and with histones. *J Cell Biol* 104, 805-815.
- Passmore, L.A. (2004). The anaphase-promoting complex (APC): the sum of its parts? *Biochem Soc Trans* 32, 724-727.
- Pearson, C.G., Maddox, P.S., Salmon, E.D., and Bloom, K. (2001). Budding yeast chromosome structure and dynamics during mitosis. *J Cell Biol* 152, 1255-1266.
- Perpelescu, M., and Fukagawa, T. (2011). The ABCs of CENPs. *Chromosoma*.
- Peter, B.J., Ullsperger, C., Hiasa, H., Marians, K.J., and Cozzarelli, N.R. (1998). The structure of supercoiled intermediates in DNA replication. *Cell* 94, 819-827.
- Petermann, E., and Helleday, T. (2010). Pathways of mammalian replication fork restart. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11, 683-687.
- Petermann, E., Orta, M.L., Issaeva, N., Schultz, N., and Helleday, T. (2010). Hydroxyurea-stalled replication forks become progressively inactivated and require two different RAD51-mediated pathways for restart and repair. *Mol Cell* 37, 492-502.
- Pichierri, P., Franchitto, A., and Rosselli, F. (2004). BLM and the FANCD1 proteins collaborate in a common pathway in response to stalled replication forks. *Embo J* 23, 3154-3163.
- Pidoux, A.L., and Allshire, R.C. (2004). Kinetochores and heterochromatin domains of the fission yeast centromere. *Chromosome Res* 12, 521-534.
- Pines, J. (1995). Cyclins and cyclin-dependent kinases: a biochemical view. *Biochem J* 308 (Pt 3), 697-711.
- Pommier, Y., Zwillig, L.A., Kao-Shan, C.S., Whang-Peng, J., and Bradley, M.O. (1985). Correlations between intercalator-induced DNA strand breaks and sister chromatid exchanges, mutations, and cytotoxicity in Chinese hamster cells. *Cancer Res* 45, 3143-3149.
- Porter, A.C., and Farr, C.J. (2004). Topoisomerase II: untangling its contribution at the centromere. *Chromosome Res* 12, 569-583.

Raff, J.W., Jeffers, K., and Huang, J.Y. (2002). The roles of Fzy/Cdc20 and Fzr/Cdh1 in regulating the destruction of cyclin B in space and time. *J Cell Biol* 157, 1139-1149.

Rao, V.A., Conti, C., Guirouilh-Barbat, J., Nakamura, A., Miao, Z.H., Davies, S.L., Sacca, B., Hickson, I.D., Bensimon, A., and Pommier, Y. (2007). Endogenous gamma-H2AX-ATM-Chk2 checkpoint activation in Bloom's syndrome helicase deficient cells is related to DNA replication arrested forks. *Mol Cancer Res* 5, 713-724.

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.

Rattner, J.B., Hendzel, M.J., Furbee, C.S., Muller, M.T., and Bazett-Jones, D.P. (1996). Topoisomerase II alpha is associated with the mammalian centromere in a cell cycle- and species-specific manner and is required for proper centromere/kinetochore structure. *J Cell Biol* 134, 1097-1107.

Raynard, S., Bussen, W., and Sung, P. (2006). A double Holliday junction dissolvasome comprising BLM, topoisomerase IIIalpha, and BLAP75. *J Biol Chem* 281, 13861-13864.

Raynard, S., Zhao, W., Bussen, W., Lu, L., Ding, Y.Y., Busygina, V., Meetei, A.R., and Sung, P. (2008). Functional role of BLAP75 in BLM-topoisomerase IIIalpha-dependent holliday junction processing. *J Biol Chem* 283, 15701-15708.

Richard, D.J., Bolderson, E., and Khanna, K.K. (2009). Multiple human single-stranded DNA binding proteins function in genome maintenance: structural, biochemical and functional analysis. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 44, 98-116.

Rieder, C.L. (1982). The formation, structure, and composition of the mammalian kinetochore and kinetochore fiber. *Int Rev Cytol* 79, 1-58.

Roa, B.B., Savino, C.V., and Richards, C.S. (1999). Ashkenazi Jewish population frequency of the Bloom syndrome gene 2281 delta 6ins7 mutation. *Genet Test* 3, 219-221.

Roca, J., Berger, J.M., Harrison, S.C., and Wang, J.C. (1996). DNA transport by a type II topoisomerase: direct evidence for a two-gate mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 4057-4062.

Roca, J., Ishida, R., Berger, J.M., Andoh, T., and Wang, J.C. (1994). Antitumor bisdioxopiperazines inhibit yeast DNA topoisomerase II by trapping the enzyme in the form of a closed protein clamp. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 1781-1785.

Roca, J., and Wang, J.C. (1992). The capture of a DNA double helix by an ATP-dependent protein clamp: a key step in DNA transport by type II DNA topoisomerases. *Cell* 71, 833-840.

Rong, S.B., Valiaho, J., and Vihinen, M. (2000). Structural basis of Bloom syndrome (BS) causing mutations in the BLM helicase domain. *Mol Med* 6, 155-164.

- Rothstein, R., Michel, B., and Gangloff, S. (2000). Replication fork pausing and recombination or "gimme a break". *Genes Dev* *14*, 1-10.
- Ruchaud, S., Carmena, M., and Earnshaw, W.C. (2007). Chromosomal passengers: conducting cell division. *Nat Rev Mol Cell Biol* *8*, 798-812.
- Rudert, F., Bronner, S., Garnier, J.M., and Dolle, P. (1995). Transcripts from opposite strands of gamma satellite DNA are differentially expressed during mouse development. *Mamm Genome* *6*, 76-83.
- Rudner, A.D., and Murray, A.W. (2000). Phosphorylation by Cdc28 activates the Cdc20-dependent activity of the anaphase-promoting complex. *J Cell Biol* *149*, 1377-1390.
- Russell, B., Bhattacharyya, S., Keirse, J., Sandy, A., Grierson, P., Perchiniak, E., Kavecansky, J., Acharya, S., and Groden, J. (2011). Chromosome breakage is regulated by the interaction of the BLM helicase and topoisomerase IIalpha. *Cancer Res* *71*, 561-571.
- Ryan, D.P., and Owen-Hughes, T. (2011). Snf2-family proteins: chromatin remodellers for any occasion. *Curr Opin Chem Biol*.
- Saintigny, Y., Delacote, F., Vares, G., Petitot, F., Lambert, S., Averbek, D., and Lopez, B.S. (2001). Characterization of homologous recombination induced by replication inhibition in mammalian cells. *EMBO J* *20*, 3861-3870.
- Sakaguchi, A., and Kikuchi, A. (2004). Functional compatibility between isoform alpha and beta of type II DNA topoisomerase. *J Cell Sci* *117*, 1047-1054.
- Sakamoto Hojo, E.T., van Diemen, P.C., Darroudi, F., and Natarajan, A.T. (1995). Spontaneous chromosomal aberrations in Fanconi anaemia, ataxia telangiectasia fibroblast and Bloom's syndrome lymphoblastoid cell lines as detected by conventional cytogenetic analysis and fluorescence in situ hybridisation (FISH) technique. *Mutat Res* *334*, 59-69.
- Sakuno, T., Tada, K., and Watanabe, Y. (2009). Kinetochores geometry defined by cohesion within the centromere. *Nature* *458*, 852-858.
- Sampath, S.C., Ohi, R., Leismann, O., Salic, A., Pozniakovski, A., and Funabiki, H. (2004). The chromosomal passenger complex is required for chromatin-induced microtubule stabilization and spindle assembly. *Cell* *118*, 187-202.
- Sano, K., Miyaji-Yamaguchi, M., Tsutsui, K.M., and Tsutsui, K. (2008). Topoisomerase IIbeta activates a subset of neuronal genes that are repressed in AT-rich genomic environment. *PLoS One* *3*, e4103.
- Santaguida, S., and Musacchio, A. (2009). The life and miracles of kinetochores. *EMBO J* *28*, 2511-2531.

Sanyal, K., Baum, M., and Carbon, J. (2004). Centromeric DNA sequences in the pathogenic yeast *Candida albicans* are all different and unique. *Proc Natl Acad Sci U S A* *101*, 11374-11379.

Sanz, M.M., Proytcheva, M., Ellis, N.A., Holloman, W.K., and German, J. (2000). BLM, the Bloom's syndrome protein, varies during the cell cycle in its amount, distribution, and co-localization with other nuclear proteins. *Cytogenet Cell Genet* *91*, 217-223.

Savino, T.M., Gebrane-Younes, J., De Mey, J., Sibarita, J.B., and Hernandez-Verdun, D. (2001). Nucleolar assembly of the rRNA processing machinery in living cells. *J Cell Biol* *153*, 1097-1110.

Schueler, M.G., Higgins, A.W., Rudd, M.K., Gustashaw, K., and Willard, H.F. (2001). Genomic and genetic definition of a functional human centromere. *Science* *294*, 109-115.

Schueler, M.G., and Sullivan, B.A. (2006). Structural and functional dynamics of human centromeric chromatin. *Annu Rev Genomics Hum Genet* *7*, 301-313.

Schultz, L.B., Chehab, N.H., Malikzay, A., and Halazonetis, T.D. (2000). p53 binding protein 1 (53BP1) is an early participant in the cellular response to DNA double-strand breaks. *J Cell Biol* *151*, 1381-1390.

Screpanti, E., De Antoni, A., Alushin, G.M., Petrovic, A., Melis, T., Nogales, E., and Musacchio, A. (2011). Direct binding of Cenp-C to the Mis12 complex joins the inner and outer kinetochore. *Curr Biol* *21*, 391-398.

Sengupta, S., Linke, S.P., Pedoux, R., Yang, Q., Farnsworth, J., Garfield, S.H., Valerie, K., Shay, J.W., Ellis, N.A., Wasylyk, B., *et al.* (2003). BLM helicase-dependent transport of p53 to sites of stalled DNA replication forks modulates homologous recombination. *Embo J* *22*, 1210-1222.

Sengupta, S., Robles, A.I., Linke, S.P., Sinogeeva, N.I., Zhang, R., Pedoux, R., Ward, I.M., Celeste, A., Nussenzweig, A., Chen, J., *et al.* (2004). Functional interaction between BLM helicase and 53BP1 in a Chk1-mediated pathway during S-phase arrest. *J Cell Biol* *166*, 801-813.

Shimamoto, A., Nishikawa, K., Kitao, S., and Furuichi, Y. (2000). Human RecQ5beta, a large isomer of RecQ5 DNA helicase, localizes in the nucleoplasm and interacts with topoisomerases 3alpha and 3beta. *Nucleic Acids Res* *28*, 1647-1655.

Shimura, T., Torres, M.J., Martin, M.M., Rao, V.A., Pommier, Y., Katsura, M., Miyagawa, K., and Aladjem, M.I. (2008). Bloom's syndrome helicase and Mus81 are required to induce transient double-strand DNA breaks in response to DNA replication stress. *J Mol Biol* *375*, 1152-1164.

Sitonen, H.A., Kopra, O., Kaariainen, H., Haravuori, H., Winter, R.M., Saamanen, A.M., Peltonen, L., and Kestila, M. (2003). Molecular defect of RAPADILINO syndrome expands the phenotype spectrum of RECQL diseases. *Hum Mol Genet* *12*, 2837-2844.

Singh, T.R., Ali, A.M., Busygina, V., Raynard, S., Fan, Q., Du, C.H., Andreassen, P.R., Sung, P., and Meetei, A.R. (2008). BLAP18/RMI2, a novel OB-fold-containing protein, is an essential

component of the Bloom helicase-double Holliday junction dissolvasome. *Genes Dev* 22, 2856-2868.

Sirover, M.A., Vollberg, T.M., and Seal, G. (1990). DNA repair and the molecular mechanisms of Bloom's syndrome. *Crit Rev Oncog* 2, 19-33.

Skibbens, R.V., Skeen, V.P., and Salmon, E.D. (1993). Directional instability of kinetochore motility during chromosome congression and segregation in mitotic newt lung cells: a push-pull mechanism. *J Cell Biol* 122, 859-875.

Sofueva, S., Osman, F., Lorenz, A., Steinacher, R., Castagnetti, S., Ledesma, J., and Whitby, M.C. (2011). Ultrafine anaphase bridges, broken DNA and illegitimate recombination induced by a replication fork barrier. *Nucleic Acids Res* 39, 6568-6584.

Sonoda, E., Sasaki, M.S., Morrison, C., Yamaguchi-Iwai, Y., Takata, M., and Takeda, S. (1999). Sister chromatid exchanges are mediated by homologous recombination in vertebrate cells. *Mol Cell Biol* 19, 5166-5169.

Sorensen, C.S., Lukas, C., Kramer, E.R., Peters, J.M., Bartek, J., and Lukas, J. (2000). Nonperiodic activity of the human anaphase-promoting complex-Cdh1 ubiquitin ligase results in continuous DNA synthesis uncoupled from mitosis. *Mol Cell Biol* 20, 7613-7623.

Spence, J.M., Critcher, R., Ebersole, T.A., Valdivia, M.M., Earnshaw, W.C., Fukagawa, T., and Farr, C.J. (2002). Co-localization of centromere activity, proteins and topoisomerase II within a subdomain of the major human X alpha-satellite array. *EMBO J* 21, 5269-5280.

Srivastava, V., Modi, P., Tripathi, V., Mudgal, R., De, S., and Sengupta, S. (2009). BLM helicase stimulates the ATPase and chromatin-remodeling activities of RAD54. *J Cell Sci* 122, 3093-3103.

Stavropoulos, D.J., Bradshaw, P.S., Li, X., Pasic, I., Truong, K., Ikura, M., Ungrin, M., and Meyn, M.S. (2002). The Bloom syndrome helicase BLM interacts with TRF2 in ALT cells and promotes telomeric DNA synthesis. *Hum Mol Genet* 11, 3135-3144.

Straight, A.F., and Murray, A.W. (1997). The spindle assembly checkpoint in budding yeast. *Methods Enzymol* 283, 425-440.

Sudakin, V., Ganoth, D., Dahan, A., Heller, H., Hershko, J., Luca, F.C., Ruderman, J.V., and Hershko, A. (1995). The cyclosome, a large complex containing cyclin-selective ubiquitin ligase activity, targets cyclins for destruction at the end of mitosis. *Mol Biol Cell* 6, 185-197.

Sullivan, B.A., and Schwartz, S. (1995). Identification of centromeric antigens in dicentric Robertsonian translocations: CENP-C and CENP-E are necessary components of functional centromeres. *Hum Mol Genet* 4, 2189-2197.

Sumara, I., Vorlaufer, E., Gieffers, C., Peters, B.H., and Peters, J.M. (2000). Characterization of vertebrate cohesin complexes and their regulation in prophase. *J Cell Biol* 151, 749-762.

Sumner, A.T. (1996). The distribution of topoisomerase II on mammalian chromosomes. *Chromosome Res* 4, 5-14.

Sun, H., Karow, J.K., Hickson, I.D., and Maizels, N. (1998). The Bloom's syndrome helicase unwinds G4 DNA. *J Biol Chem* 273, 27587-27592.

Sun, X., Le, H.D., Wahlstrom, J.M., and Karpen, G.H. (2003). Sequence analysis of a functional *Drosophila* centromere. *Genome Res* 13, 182-194.

Sundin, O., and Varshavsky, A. (1980). Terminal stages of SV40 DNA replication proceed via multiply intertwined catenated dimers. *Cell* 21, 103-114.

Sundin, O., and Varshavsky, A. (1981). Arrest of segregation leads to accumulation of highly intertwined catenated dimers: dissection of the final stages of SV40 DNA replication. *Cell* 25, 659-669.

Surana, U., Amon, A., Dowzer, C., McGrew, J., Byers, B., and Nasmyth, K. (1993). Destruction of the CDC28/CLB mitotic kinase is not required for the metaphase to anaphase transition in budding yeast. *EMBO J* 12, 1969-1978.

Suski, C., and Marians, K.J. (2008). Resolution of converging replication forks by RecQ and topoisomerase III. *Mol Cell* 30, 779-789.

Symington, L.S. (2002). Role of RAD52 epistasis group genes in homologous recombination and double-strand break repair. *Microbiol Mol Biol Rev* 66, 630-670, table of contents.

Taagepera, S., Rao, P.N., Drake, F.H., and Gorbsky, G.J. (1993). DNA topoisomerase II alpha is the major chromosome protein recognized by the mitotic phosphoprotein antibody MPM-2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 8407-8411.

Tan, T.L., Kanaar, R., and Wyman, C. (2003). Rad54, a Jack of all trades in homologous recombination. *DNA Repair (Amst)* 2, 787-794.

Taylor, J.H. (1960). Nucleic acid synthesis in relation to the cell division cycle. *Ann N Y Acad Sci* 90, 409-421.

Terada, Y., Tatsuka, M., Suzuki, F., Yasuda, Y., Fujita, S., and Otsu, M. (1998). AIM-1: a mammalian midbody-associated protein required for cytokinesis. *EMBO J* 17, 667-676.

Terranova, R., Sauer, S., Merkschlager, M., and Fisher, A.G. (2005). The reorganisation of constitutive heterochromatin in differentiating muscle requires HDAC activity. *Exp Cell Res* 310, 344-356.

Tirnauer, J.S. (2002). Coupled zones of f-actin and microtubule movement in polarized cells. *Dev Cell* 3, 152-153.

Topp, C.N., Zhong, C.X., and Dawe, R.K. (2004). Centromere-encoded RNAs are integral components of the maize kinetochore. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 15986-15991.

- Toyoda, Y., and Yanagida, M. (2006). Coordinated requirements of human topo II and cohesin for metaphase centromere alignment under Mad2-dependent spindle checkpoint surveillance. *Mol Biol Cell* 17, 2287-2302.
- Tripathi, V., Kaur, S., and Sengupta, S. (2008). Phosphorylation-dependent interactions of BLM and 53BP1 are required for their anti-recombinogenic roles during homologous recombination. *Carcinogenesis* 29, 52-61.
- Tripathi, V., Nagarjuna, T., and Sengupta, S. (2007). BLM helicase-dependent and -independent roles of 53BP1 during replication stress-mediated homologous recombination. *J Cell Biol* 178, 9-14.
- Turley, H., Wu, L., Canamero, M., Gatter, K.C., and Hickson, I.D. (2001). The distribution and expression of the Bloom's syndrome gene product in normal and neoplastic human cells. *Br J Cancer* 85, 261-265.
- Uemura, T., Ohkura, H., Adachi, Y., Morino, K., Shiozaki, K., and Yanagida, M. (1987). DNA topoisomerase II is required for condensation and separation of mitotic chromosomes in *S. pombe*. *Cell* 50, 917-925.
- Uemura, T., and Yanagida, M. (1984). Isolation of type I and II DNA topoisomerase mutants from fission yeast: single and double mutants show different phenotypes in cell growth and chromatin organization. *EMBO J* 3, 1737-1744.
- Uhlmann, F., Wernic, D., Poupert, M.A., Koonin, E.V., and Nasmyth, K. (2000). Cleavage of cohesin by the CD clan protease separin triggers anaphase in yeast. *Cell* 103, 375-386.
- Umezū, K., and Nakayama, H. (1993). RecQ DNA helicase of *Escherichia coli*. Characterization of the helix-unwinding activity with emphasis on the effect of single-stranded DNA-binding protein. *J Mol Biol* 230, 1145-1150.
- Vagnarelli, P., Morrison, C., Dodson, H., Sonoda, E., Takeda, S., and Earnshaw, W.C. (2004). Analysis of Scc1-deficient cells defines a key metaphase role of vertebrate cohesin in linking sister kinetochores. *EMBO Rep* 5, 167-171.
- Valerie, K., and Povirk, L.F. (2003). Regulation and mechanisms of mammalian double-strand break repair. *Oncogene* 22, 5792-5812.
- van Brabant, A.J., Stan, R., and Ellis, N.A. (2000a). DNA helicases, genomic instability, and human genetic disease. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 1, 409-459.
- van Brabant, A.J., Ye, T., Sanz, M., German, I.J., Ellis, N.A., and Holloman, W.K. (2000b). Binding and melting of D-loops by the Bloom syndrome helicase. *Biochemistry* 39, 14617-14625.
- Viard, T., and de la Tour, C.B. (2007). Type IA topoisomerases: a simple puzzle? *Biochimie* 89, 456-467.

Vinciguerra, P., Godinho, S.A., Parmar, K., Pellman, D., and D'Andrea, A.D. (2010). Cytokinesis failure occurs in Fanconi anemia pathway-deficient murine and human bone marrow hematopoietic cells. *J Clin Invest* 120, 3834-3842.

Vindigni, A., and Hickson, I.D. (2009). RecQ helicases: multiple structures for multiple functions? *Hfsp J* 3, 153-164.

Vispe, S., Cazaux, C., Lesca, C., and Defais, M. (1998). Overexpression of Rad51 protein stimulates homologous recombination and increases resistance of mammalian cells to ionizing radiation. *Nucleic Acids Res* 26, 2859-2864.

Vologodskii, A.V., Zhang, W., Rybenkov, V.V., Podtelezhnikov, A.A., Subramanian, D., Griffith, J.D., and Cozzarelli, N.R. (2001). Mechanism of topology simplification by type II DNA topoisomerases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 3045-3049.

Volpe, T.A., Kidner, C., Hall, I.M., Teng, G., Grewal, S.I., and Martienssen, R.A. (2002). Regulation of heterochromatic silencing and histone H3 lysine-9 methylation by RNAi. *Science* 297, 1833-1837.

Waizenegger, I.C., Hauf, S., Meinke, A., and Peters, J.M. (2000). Two distinct pathways remove mammalian cohesin from chromosome arms in prophase and from centromeres in anaphase. *Cell* 103, 399-410.

Walker, J.E., Saraste, M., Runswick, M.J., and Gay, N.J. (1982). Distantly related sequences in the alpha- and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *Embo J* 1, 945-951.

Wang, J.C. (2002). Cellular roles of DNA topoisomerases: a molecular perspective. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3, 430-440.

Wang, L.H., Mayer, B., Stemmann, O., and Nigg, E.A. (2010). Centromere DNA decatenation depends on cohesin removal and is required for mammalian cell division. *J Cell Sci* 123, 806-813.

Wang, L.H., Schwarzbraun, T., Speicher, M.R., and Nigg, E.A. (2008). Persistence of DNA threads in human anaphase cells suggests late completion of sister chromatid decatenation. *Chromosoma* 117, 123-135.

Wang, W., Seki, M., Narita, Y., Sonoda, E., Takeda, S., Yamada, K., Masuko, T., Katada, T., and Enomoto, T. (2000). Possible association of BLM in decreasing DNA double strand breaks during DNA replication. *Embo J* 19, 3428-3435.

Warburton, P.E., Greig, G.M., Haaf, T., and Willard, H.F. (1991). PCR amplification of chromosome-specific alpha satellite DNA: definition of centromeric STS markers and polymorphic analysis. *Genomics* 11, 324-333.

Warburton, P.E., Cooke, C.A., Bourassa, S., Vafa, O., Sullivan, B.A., Stetten, G., Gimelli, G., Warburton, D., Tyler-Smith, C., Sullivan, K.F., *et al.* (1997). Immunolocalization of CENP-A suggests a distinct nucleosome structure at the inner kinetochore plate of active centromeres. *Curr Biol* 7, 901-904.

Wassmann, K., and Benezra, R. (1998). Mad2 transiently associates with an APC/p55Cdc complex during mitosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 11193-11198.

Watson, J.D., and Crick, F.H. (1953). Genetical implications of the structure of deoxyribonucleic acid. *Nature* 171, 964-967.

Watt, P.M., Louis, E.J., Borts, R.H., and Hickson, I.D. (1995). Sgs1: a eukaryotic homolog of *E. coli* RecQ that interacts with topoisomerase II *in vivo* and is required for faithful chromosome segregation. *Cell* 81, 253-260.

Wechsler, T., Newman, S., and West, S.C. (2011). Aberrant chromosome morphology in human cells defective for Holliday junction resolution. *Nature* 471, 642-646.

Weinstock, D.M., Richardson, C.A., Elliott, B., and Jasin, M. (2006). Modeling oncogenic translocations: distinct roles for double-strand break repair pathways in translocation formation in mammalian cells. *DNA Repair (Amst)* 5, 1065-1074.

Weksberg, R., Smith, C., Anson-Cartwright, L., and Maloney, K. (1988). Bloom syndrome: a single complementation group defines patients of diverse ethnic origin. *Am J Hum Genet* 42, 816-824.

Willis, A.E., Spurr, N.K., and Lindahl, T. (1989). Concomitant reversion of the characteristic phenotypic properties of a cell line of Bloom's syndrome origin. *Carcinogenesis* 10, 217-219.

Wong, K.A., Kim, R., Christofk, H., Gao, J., Lawson, G., and Wu, H. (2004). Protein inhibitor of activated STAT Y (PIASy) and a splice variant lacking exon 6 enhance sumoylation but are not essential for embryogenesis and adult life. *Mol Cell Biol* 24, 5577-5586.

Wong, L.H., Brettingham-Moore, K.H., Chan, L., Quach, J.M., Anderson, M.A., Northrop, E.L., Hannan, R., Saffery, R., Shaw, M.L., Williams, E., *et al.* (2007). Centromere RNA is a key component for the assembly of nucleoproteins at the nucleolus and centromere. *Genome Res* 17, 1146-1160.

Wong, N.C., Wong, L.H., Quach, J.M., Canham, P., Craig, J.M., Song, J.Z., Clark, S.J., and Choo, K.H. (2006). Permissive transcriptional activity at the centromere through pockets of DNA hypomethylation. *PLoS Genet* 2, e17.

Woodage, T., Prasad, M., Dixon, J.W., Selby, R.E., Romain, D.R., Columbano-Green, L.M., Graham, D., Rogan, P.K., Seip, J.R., Smith, A., *et al.* (1994). Bloom syndrome and maternal uniparental disomy for chromosome 15. *Am J Hum Genet* 55, 74-80.

- Wu, L. (2007). Role of the BLM helicase in replication fork management. *DNA Repair (Amst)* 6, 936-944.
- Wu, L., Bachrati, C.Z., Ou, J., Xu, C., Yin, J., Chang, M., Wang, W., Li, L., Brown, G.W., and Hickson, I.D. (2006). BLAP75/RMI1 promotes the BLM-dependent dissolution of homologous recombination intermediates. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 4068-4073.
- 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., Davies, S.L., North, P.S., Goulaouic, H., Riou, J.F., Turley, H., Gatter, K.C., and Hickson, I.D. (2000). The Bloom's syndrome gene product interacts with topoisomerase III. *J Biol Chem* 275, 9636-9644.
- Wu, L., and Hickson, I.D. (2003). The Bloom's syndrome helicase suppresses crossing over during homologous recombination. *Nature* 426, 870-874.
- Xu, D., Guo, R., Soback, A., Bachrati, C.Z., Yang, J., Enomoto, T., Brown, G.W., Hoatlin, M.E., Hickson, I.D., and Wang, W. (2008). RMI, a new OB-fold complex essential for Bloom syndrome protein to maintain genome stability. *Genes Dev* 22, 2843-2855.
- Xu, X., and Liu, Y. (2009). Dual DNA unwinding activities of the Rothmund-Thomson syndrome protein, RECQ4. *Embo J* 28, 568-577.
- Yanagida, M. (2009). Clearing the way for mitosis: is cohesin a target? *Nat Rev Mol Cell Biol* 10, 489-496.
- Yang, J., Bachrati, C.Z., Ou, J., Hickson, I.D., and Brown, G.W. (2010). Human topoisomerase IIIalpha is a single-stranded DNA decatenase that is stimulated by BLM and RMI1. *J Biol Chem* 285, 21426-21436.
- Yang, W. (2010). Topoisomerases and site-specific recombinases: similarities in structure and mechanism. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 45, 520-534.
- Yankiwski, V., Marciniak, R.A., Guarente, L., and Neff, N.F. (2000). Nuclear structure in normal and Bloom syndrome cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 5214-5219.
- Yankiwski, V., Noonan, J.P., and Neff, N.F. (2001). The C-terminal domain of the Bloom syndrome DNA helicase is essential for genomic stability. *BMC Cell Biol* 2, 11.
- Yin, J., Soback, A., Xu, C., Meetei, A.R., Hoatlin, M., Li, L., and Wang, W. (2005). BLAP75, an essential component of Bloom's syndrome protein complexes that maintain genome integrity. *Embo J* 24, 1465-1476.
- Yuen, K.W., Montpetit, B., and Hieter, P. (2005). The kinetochore and cancer: what's the connection? *Curr Opin Cell Biol* 17, 576-582.

- Zechiedrich, E.L., and Osheroff, N. (1990). Eukaryotic topoisomerases recognize nucleic acid topology by preferentially interacting with DNA crossovers. *EMBO J* 9, 4555-4562.
- Zhong, S., Hu, P., Ye, T.Z., Stan, R., Ellis, N.A., and Pandolfi, P.P. (1999). A role for PML and the nuclear body in genomic stability. *Oncogene* 18, 7941-7947.
- Zou, Y., Liu, Y., Wu, X., and Shell, S.M. (2006). Functions of human replication protein A (RPA): from DNA replication to DNA damage and stress responses. *J Cell Physiol* 208, 267-273.
- Zur, A., and Brandeis, M. (2001). Securin degradation is mediated by fzy and fzr, and is required for complete chromatid separation but not for cytokinesis. *EMBO J* 20, 792-801.

Role of the BLM protein in maintaining the integrity of the centromere: implications in the phenotype associated with Bloom's syndrome

Bloom syndrome (BS) is a rare genetic disease characterized by a sharp increase in the rate of sister chromatid exchanges, chromosome segregation abnormalities and a predisposition to the development of all types of cancers. This syndrome is caused by mutations in both copies of the *BLM* gene, which encodes BLM, a RecQ 3'-5' DNA helicase. The specific function(s) of BLM remain unclear, but the data from the literature converge towards a role for BLM in mechanisms monitoring and / or maintaining genome integrity. The BLM protein may be involved in restarting stalled replication forks during S phase and necessary to resolve anaphase bridges in mitosis, including particular bridges called "Ultrafine Anaphase Bridges" (UFBs). These UFBs, which link sister chromatids together, are not detectable by conventional stains and their presence can only be revealed by the detection of the proteins PICH (PLK1-interacting checkpoint helicase) or BLM. In untreated cells, UFBs originate mostly from centromeres (cUFBs).

The challenge of my project was to determine whether BLM was also involved in preventing the formation of cUFBs and so, if it played a role before anaphase.

We showed that BLM is recruited at centromeres from G2 phase to mitosis. BLM, in cooperation with PICH, is required for (1) structural organization of centromeric DNA, (2) completion of centromere disjunction, independently of the cohesin pathway, suggesting an involvement of these proteins in centromere decatenation process, and (3) recruitment of active topoisomerase II α (Topo II α) to centromeres. Thus, we report a new localization and a new function of BLM at centromeres, revealing for the first time a new role for BLM and PICH in a previously unknown centromeric decatenation mechanism, crucial for complete centromere disjunction.

We propose that the combined action of BLM and PICH promotes, through their helicase and chromatin remodelling activities, respectively, the organization of centromeric chromatin, thereby rendering some centromeric catenates accessible to Topo II α before the onset of anaphase. The failure of this mechanism may lead to the persistence of some centromeric catenations not resolved before anaphase. Thus, the increase in the frequency of centromeric UFBs in BLM-deficient cells has two different origins: cUFBs arising from catenations not resolved before anaphase and physiological cUFBs not processed at anaphase onset. To distinguish the two cUFB origins, we defined the former as supernumerary centromeric UFBs (SC-UFBs).

Rôle de la protéine BLM dans le maintien de l'intégrité du centromère : implications dans le phénotype associé au syndrome de Bloom

Le syndrome de Bloom (BS) est une maladie génétique rare caractérisée par une forte augmentation du taux d'échanges entre chromatides soeurs, des anomalies de ségrégation des chromosomes et une prédisposition au développement de tous types de cancers. Ce syndrome est la conséquence de mutations dans les deux copies du gène *BLM*, codant pour une 3'-5' ADN hélicase de type RecQ. La ou les fonctions de la protéine BLM sont encore mal définies mais les données de la littérature convergent vers un rôle de BLM dans des mécanismes de surveillance et/ou maintien de l'intégrité du génome. La protéine BLM serait impliquée dans le redémarrage de fourches de réplication bloquées pendant la phase S et serait nécessaire à la résolution de ponts anaphasiques en mitose, notamment de ponts particuliers appelées « UltraFine anaphase Bridges » (UFBs). Ces UFBs, qui relient les chromatides soeurs entre elles, ne sont pas détectables par les colorants classiques et leur présence ne peut-être révélée que par la détection des protéines PICH (Plk1-Interacting Checkpoint Helicase) ou BLM. A l'état basal, ces UFBs sont essentiellement d'origine centromérique (cUFBs).

Tout l'enjeu de mon projet était de déterminer si BLM était également impliquée dans la prévention de la formation de ces cUFBs et donc si BLM jouait un rôle avant l'anaphase.

Nous avons montré que BLM est recrutée aux centromères de la phase G2 jusqu'en mitose. BLM, en coopération avec la protéine PICH, est nécessaire (1) à l'organisation structurale de l'ADN centromérique, (2) à la disjonction complète des centromères, indépendamment de la voie des cohésines, suggérant une implication de ces protéines dans le processus de décaténation des centromères et (3) au recrutement de la topoisomérase IIa (Topo IIa) active aux centromères. Nos résultats révèlent ainsi une nouvelle localisation et une nouvelle fonction de la protéine BLM aux centromères et montrent pour la première fois l'implication des protéines BLM et PICH dans la décaténation centromérique avant l'anaphase. Nous proposons que BLM et PICH, par leurs activités respectives hélicase et de remodelage de la chromatine, modifient la structure des centromères pendant la pré-métaphase, rendant ainsi certaines caténations accessibles à la Topo IIa avant l'anaphase. La défaillance de ce mécanisme entraînerait la persistance de caténations centromériques non résolues avant l'anaphase. Ainsi, dans les cellules BS, la fréquence élevée de cUFBs aurait deux origines différentes : une partie correspondrait à des cUFBs formés du fait d'une décaténation défaillante des centromères avant l'anaphase, et l'autre partie correspondrait à des cUFBs « physiologiques » non résolus en anaphase. Afin de distinguer l'origine des cUFBs, nous avons appelé ceux issus de caténations non résolues avant l'anaphase les UFBs centromériques surnuméraires (SC-UFBs pour Supernumerary Centromeric UFBs).