



HAL
open science

Relation entre la réponse aux dommages à l'ADN et la dynamique de réplication chez les mammifères : rôle du point de contrôle intra-S

Hervé Techer

► **To cite this version:**

Hervé Techer. Relation entre la réponse aux dommages à l'ADN et la dynamique de réplication chez les mammifères : rôle du point de contrôle intra-S. Génétique. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2012. Français. NNT : 2012PAO66472 . tel-00839141

HAL Id: tel-00839141

<https://theses.hal.science/tel-00839141>

Submitted on 27 Jun 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.

THESE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE

Spécialité : **Génétique**
Ecole doctorale : **Complexité du vivant**

**Présentée par
Hervé Técher**

Pour obtenir le grade de
DOCTEUR de l'UNIVERSITÉ PIERRE ET MARIE CURIE

Sujet de la thèse :
**Relation entre la réponse aux dommages à l'ADN et la
dynamique de réplication chez les mammifères : rôle du
point de contrôle intra-S.**

soutenue le 27 septembre 2012

devant le jury composé de :

Pr Pierre Netter	Président
Dr Philippe Pasero	Rapporteur
Dr Filippo Rosselli	Rapporteur
Dr Geneviève Almouzni	Examineur
Dr Benoît Arcangioli	Examineur
Dr Étienne Schwob	Examineur
Pr Michelle Debatisse	Directrice de thèse

Remerciements

Je tiens à remercier tout premièrement ma directrice de thèse, le Pr Michelle Debatisse, pour son encadrement très impliqué dans mon travail de thèse et pour les moyens qu'elle donne à son équipe – et donc à moi - pour travailler dans les meilleures conditions. Je la remercie tout particulièrement pour les heures qu'elle a consacrées à la correction de ce manuscrit.

Je voudrais ensuite remercier les membres de mon jury pour avoir accepté de participer à cette soutenance de thèse. Je suis honoré par la présence du Pr Pierre Netter, un professeur que j'appréciais énormément à l'époque à laquelle je fréquentais les amphithéâtres de Jussieu. Je tiens également à remercier mes rapporteurs, le Dr Philippe Pasero et le Dr Filippo Rosselli, pour le temps qu'ils acceptent de me consacrer. Je remercie mes examinateurs, le Dr Benoît Arcangioli, et le Dr Étienne Schwob, qui m'ont suivis au cours de ma thèse, je pense aux superbes GDR, mes comités de thèse et autres congrès.

Je voudrais remercier le Dr Bernard Lopez pour nos collaborations concernant l'étude des mutants déficients pour les voies de recombinaison homologue.

Au laboratoire nous profitons des séjours réguliers du Pr Rodney Rothstein, il a participé à de nombreuses discussions, réunions de laboratoire et réécritures d'articles qui ont été très importantes au cours de ma thèse. Thank you Rodney.

Au sein de notre équipe, je tiens à remercier le Dr Olivier Brison toujours disponible pour partager sa riche expérience du monde de la recherche. Je souhaite également remercier le Dr Sylvain Courbet qui m'a initié à l'expérimentation, et notamment enseigné le peignage moléculaire lors de mon stage de Master 2. Je remercie tout particulièrement les Dr Gaël Millot et Benoît Le Tallec pour les riches discussions et l'énergie qu'ils apportent au sein de notre laboratoire. Je remercie mille fois Sandra Carignon pour sa gentillesse et son investissement dans les expériences qu'elle a réalisées pour mon projet de thèse. Je remercie le Dr Therese Wilhelm pour son aide et nos collaborations. Merci au Dr Anne Letessier et à Dana Azar pour la superbe cohabitation dans le bureau. Je remercie le Dr Stéphane Koundrioukoff pour les nombreuses discussions techniques - ou pas - que nous avons eu. Merci au Dr Sophie Gay, toujours à l'écoute, patiente, gentille, les Milanais ont de la chance. Merci à Zhang Jing, que j'ai eu le plaisir d'encadrer pour son stage de Master 1. Je profite également de cet espace de liberté pour partager le bonheur et déjà la nostalgie que je ressens après les années passées au laboratoire. Malgré les difficultés d'un travail de

thèse, et le stress qui va et vient, j'ai passé des moments fort agréables et enrichissants dans le laboratoire de Michelle Debatisse, ceci grâce à la bonne ambiance qu'apportent tous les membres de l'équipe. Je remercie donc tous les membres, passés et présents, de notre équipe pour la communication et la bonne entente qui règne au sein du laboratoire. Merci à Sophie, Anne, Sandra, Marie-France, Anne-Marie, Stéphane, Sylvain, Lamine, Claire, Aurélie, Benoît, Dana, Therese, Marion, Jing, Olivier et Michelle.

Je tiens aussi à remercier tout les membres de notre unité 3244 (anciennement 7147). Je pense aussi à mes amis Fang Ming, Jang Suk-Min et Aurèle Piazza qui soutiennent leur thèse également durant le mois de septembre. Et à Maxime Wéry pour l'humour belge et les sessions guitares.

Je voudrais enfin remercier ma famille. Merci Papa, merci Maman. Merci Mémère. Merci à mon clone Jérémy et à ma grande sœur Isabelle. Merci à ma nièce Charlie, qui, sans un mot – car elle ne sait pas encore vraiment parler – a su me réchauffer le cœur et me donner le sourire. Merci à ma femme Sharina que j'aime, et qui me supporte quotidiennement, et ce n'est pas facile à faire. 谢谢我的爱人。 Je pense à ma famille à la Réunion et en métropole, ainsi qu'à ma belle famille en Mongolie intérieure, qui me manquent beaucoup. Mi aime zot' toute !

我也想我的中国家人和朋友，在内蒙古 (Bao Hongchang, Liu Yuzhi, Manda Ge, Chen Y'er...), 在法国巴黎有很多 (Yu Qian, Tian Yuyang aka « Youyou », Chaoyang, Yinan...), 在北京 (Chang Jin), 在清华大学也有 (Chang laoshi's lab)。大家我想你们。我想要回来中国玩儿一点儿。

J'ai une pensée émue pour Zhang Yuanjiang, un scientifique au cœur tendre, un ami, qui nous a quittés bien trop tôt.

Je tiens à dédier ce travail de thèse à la mémoire de ma mémé Iris. « Na lontan' le temps la passé, ne reste plus qu'un doux souvenir » (extrait de la chanson traditionnelle Réunionnaise : Petite Fleur Fanée).

Table des matières

<u>Remerciements</u>	2
<u>Table des matières</u>	4
<u>Liste des figures</u>	7
<u>Abréviations</u>	8
<u>Résumé</u>	10
<u>Introduction</u>	12
<u>1. Préambule</u>	12
<u>1.A Le cycle cellulaire et la réplicon</u>	12
<u>1.B La nature des origines de réplication est incomprise chez les métazoaires</u>	15
<u>2. Les origines de réplication chez les Eucaryotes</u>	16
<u>2.A Le choix des origines potentielles : le chargement du complexe pré-RC</u>	16
<u>2.B Comment une séquence sur laquelle le pré-RC est assemblé devient-elle une origine active ?</u>	19
<u>2.C Étude de la dynamique de réplication par peignage moléculaire</u>	21
<u>2.D Les « pool de dNTP et le programme de réplication</u>	24
<u>3. La réponse aux dommages à l'ADN chez les Eucaryotes</u>	29
<u>3.A La réponse aux dommages à l'ADN</u>	30
<u>3.B La réponse aux fourches bloquées : ATR et Chk1</u>	33
<u>3.C Influence du « checkpoint » et des facteurs de DDR sur la dynamique de réplication</u>	37
<u>3.D La réponse aux dommages à l'ADN et les « pools » de dNTP</u>	40
<u>Résultats et discussion</u>	44
<u>Liste des publications</u>	44
<u>1. La déficience pour Chk1 ou Rad51 perturbe la dynamique de réplication via une modulation de la disponibilité en dNTP dépendante de la DDR (Publication #1)</u>	46
A. Contexte.....	46
B. Résultats et discussion.....	47
B-1 <i>La vitesse des fourches de réplication détermine la densité d'événements d'initiation, indépendamment de Chk1</i>	47
B-2 <i>La réponse aux dommages à l'ADN, par la sur-expression de p53R2, entraîne le ralentissement des fourches de réplication dans des cellules déficientes pour Chk1 ou Rad51</i>	48
C. Modèle et perspectives.....	49

2. La recombinaison homologue protège des catastrophes mitotiques causées par un stress réplicatif endogène (Publication #2)	54
A. Contexte.....	54
B. Résultats et discussion.....	54
B-1 <i>Le traitement de cellules contrôles par de faibles doses d'hydroxyurée mime le ralentissement des fourches et l'activation d'origines latentes observé dans des cellules déficientes pour la HR</i>	54
B-2 <i>Le stress réplicatif induit par l'hydroxyurée ou les déficiences pour des facteurs de HR conduit à des problèmes mitotiques</i>	55
B-3 <i>Les erreurs mitotiques sont la conséquence du ralentissement des fourches de réplication</i>	55
3. Activation progressive du checkpoint des dommages à l'ADN sous stress réplicatif croissant : impact sur l'intégrité des sites fragiles communs (Publication #3)	56
A. Les sites fragiles communs.....	56
B. Résultats et discussion.....	57
B-1 <i>Des ralentissements de fourches modérés ne suffisent pas à activer toute la cascade du « checkpoint » de phase S</i>	57
B-2 <i>ATR, mais pas Chk1, stabilise les sites fragiles communs</i>	59
<u>Conclusion et perspectives</u>	60
1. Quelles sont les origines recrutées par le mécanisme de compensation ?.....	60
2. Par quels mécanismes les défauts mitotiques surviennent dans des cellules déficientes pour Chk1 ?.....	62
3. « Channeling » ou compartimentation du pool de nucléotides ?.....	62
4. ATR intervient-elle dans le « channeling » ?.....	66
5. Cancer(s) et réplication.....	67
6. SFC et réarrangements dans les cancers.....	71
<u>Références</u>	74
<u>Annexes</u>	92
1. Le choix des origines fonctionnelles et leur programme spatio-temporel d'activation	94
1.A <u>Chez les métazoaires, séquence origine ou chromatine origine ?</u>	94
1.A.a L'origine de réplication chez la levure <i>Saccharomyces cerevisiae</i> : l'exception qui ne fait pas la règle.....	94
1.A.b Avant l'avènement du « genome wide ».....	95
1.A.c À la pêche aux origines potentielles : l'immuno-précipitation du pré-RC à la chromatine.....	95
1.A.d À la pêche aux origines actives (ou sites d'initiation)	97
1.A.e L'origine n'est pas uniquement déterminée par un facteur de séquence.....	103

1.B <u>Le programme spatio-temporel de réplication</u>	104
1.B.a La réplication est un processus dynamique contrôlé dans l'espace et le temps.....	104
1.B.b Le programme de réplication est défini au cours du développement et de la différenciation.....	108
2. Publication #1	110
3. Publication #2	148
4. Publication #3	192

Liste des figures

Figure 1 : Le cycle cellulaire du point de vue de la réplication.

Figure 2 : Le modèle du réplicon est le paradigme de la réplication chez les procaryotes.

Figure 3 : L'ADN est compacté en fibres de chromatine.

Figure 4 : Chargement du pré-RC sur les origines de réplication potentielles.

Figure 5 : Initiation de la réplication.

Figure 6 : Les quatre niveaux de contrôle du choix des origines.

Figure 7 : Les voies de biosynthèse des dNTP.

Figure 8 : Les voies ATR et ATM.

Figure 9 : Divers dommages et voies de réparation.

Figure 10 : Les voies de réparation des DSB.

Figure 11 : Activation du « checkpoint intra-S ».

Figure 12 : Résumé des résultats de la publication #1.

Figure 13 : Modèle de relocalisation de la RNR suite aux dommages survenant spontanément dans des cellules déficientes pour Rad51 ou Chk1.

Figure 14 : Le traitement de cellules JEFF 24 heures à la doxorubicine induit l'accumulation de p53R2 et le ralentissement des fourches de réplication.

Figure 15 : La déplétion de p53R2 atténue l'effet de la doxorubicine sur la progression des fourches de réplication.

Figure 16 : Le programme de réplication détermine la fragilité de FRA3B.

Figure 17 : L'induction d'un ralentissement des fourches modéré par un traitement au HU n'entraîne pas la phosphorylation de Chk1 dans des cellules JEFF.

Figure 18 : La déplétion d'ATR n'entraîne pas l'apparition de dommages à l'ADN et le ralentissement des fourches n'est pas compensé par l'ajout de dNs.

Figure 19 : Les caractéristiques communes aux cancers.

Figure 20 : Le modèle du stress réplcatif.

Figure 21. Le stress réplcatif induit par l'activation des oncogènes conduit à des réarrangements au niveau des SFC.

Figure 22. Les techniques pour identifier les origines actives à l'échelle du génome.

Figure 23 : Les éléments de séquence associés aux origines de réplication.

Figure 24 : L'attachement à la matrice nucléaire est associé à l'efficacité des origines.

Figure 25 : Les foyers de réplication au cours de la phase S.

Figure 26 : Techniques d'analyse du « timing » à l'échelle du génome.

Abréviations

ACS : « ARS Consensus Sequence »
ADN : acide désoxyribonucléique
ADNc : ADN complémentaire
ADNsb : ADN simple-brin
AMPD2 : Adénosine Monophosphate déaminase 2
ARN : acide ribonucléique
ARS : séquence de réplication autonome (« Autonomously Replicating Sequence »)
ATM : « Ataxia Telangiectasia Mutated »
ATP : Adénosine Tri-Phosphate
ATPases AAA+ : ATPases Associées avec de nombreuses Activités cellulaires (« ATPases Associated with various cellular Activities »)
ATR : « ATM and Rad3 Related »
ATRIP : « ATR Interacting Protein »
BRCA : « Breast Cancer »
BrdU : bromo-déoxyuridine
BSA : Albumine de sérum bovin ou « Bovin Serum Albumin »
Cdc : « cell division cycle »
CDK : kinase dépendante de cycline (« Cyclin dependent kinase »)
Cdt1 : « cdc10 dependent transcript »
ChIP : Immuno-Précipitation de la Chromatine
CHEF : fibroblaste embryonnaire de hamster Chinois (« Chinese Hamster Embryonic Fibroblast »)
Chk : « checkpoint kinase »
CHO : cellule d'ovaire de hamster Chinois (« Chinese Hamster Ovary »)
CldU : Chloro-déoxyuridine
CpGi : îlot CpG
CPT : camptothécine
Cy : cyanine
Dbf4 : « dumb bell former 4 »
dCK : déoxycytidine kinase
DDK : kinase dépendante de Dbf4 (« Dbf4 dependent kinase »)
DDR : réponse aux dommages à l'ADN (« DNA Damage Response »)
DHFR : dihydrofolate réductase
DIO : distance inter-origines
DNA-PK : « DNA-Protein Kinase »
dNDP : déoxyribonucléotide diphosphate
dNs : déoxyribonucléosides
dNTP : déoxyribonucléotide triphosphate
Dpb11 : « DNA Polymerase B Possible subunit »
DSB : cassure double-brin de l'ADN (« Double-Strand Break »)
DTT : DiThioThréitol
DUE : « DNA Unwinding Element »
EBV : Virus d'Epstein-Barr
EDTA : acide éthylène diamine tetra acétique
ENCODE : « Encyclopedia Of DNA

Elements »
ESc : Cellules souches embryonnaires (« Embryonic Stem cells »)
FACS : Cytomètre en flux, « Fluorescence Activated Cell Sorting »
FISH : hybridation in situ fluorescente (« fluorescent *in situ* hybridization »)
FRET : « Förster/Fluorescence Resonance Energy Transfer »
GAPDH : glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase
GINs : acronyme pour Go-Ichi-Ni-San - 5, 1, 2, 3 en japonais - tirés du nom des 4 protéines du complexe : Sld5, Psf1, Psf2, Psf3
GNAI3 : protéine G alpha 3 (« guanine nucleotide binding protein, alpha inhibiting 3 »)
GST : gène suppresseur de tumeur
G4 : G-quadruplexe
HBO1 : « Histone deacetylase binding to Orc1 »
HPRT : Hypoxanthine-guanine Phospho-Ribosyl-Transférase
HR : recombinaison homologue
HU : hydroxyurée
IdU : Iodo-déoxyuridine
IF : immuno-fluorescence
iPS : cellules pluripotentes obtenues par manipulation génétique de cellules différenciées (« induced-Pluripotent Stem cells »)
kb : kilobase
kb/min : kilobase par minute
KO : « knock-out »
LIG : ligase
MAR : séquence d'attachement à la matrice nucléaire (« Matrix Attachment Region »)
Mb : mégabase
MCM : « mini-chromosome maintenance »
MEM : Minimum Essential Medium
MRN : complexe en charge de la reconnaissance et de la résection des DSB, « Mre11-Rad50-Nbs1 »
MYC : homologue de v-myc (oncogène viral de la myelocytomatosis)
NDP : ribonucléotide diphosphate
NDPK : Nucléotide Diphosphate Kinase
NFR : région pauvre en nucléosomes (« Nucleosome Free Region »)
NMPK : Nucléotide Monophosphate Kinase
NP-40 : Nodidet P-40 (octyl-phenoxy-poly-éthoxyéthanol)
NTP : ribonucléotide triphosphate
OGRE : motif riche en G retrouvé au niveau des brins naissants (« origin G-rich repeated element »)
ORC : complexe de reconnaissance des origines (« Origin Recognition Complex »)
Ori : origine de réplication
PARP : Poly (ADP-ribose) polymérase
pb : paire de base

PBS : « Phosphate Buffer Saline »
PCNA : « proliferating cell nuclear antigen »
PCR : Réaction de Polymérisation en chaîne.
PIKK : « Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase protein Kinase »
PMSF : Phényl-Méthyl-Sulfonyl-Fluoride
pol : ARN polymérase
pré-RC : complexe de pré-réplication
pré-IC : complexe de pré-initiation
Rad : mutant sensible aux radiations
RB : rétinoblastome
RNR : ribonucléotide réductase
ROS : espèces réactives de l'oxygène (« Reactive Oxygene Species »)
RPA : « Replication Protein A »
RPMI : milieu de culture cellulaire (« Roswell Park Memorial Institute medium »)
Rpd3 : « Reduced Potassium Deficiency 3 »
RT-qPCR : Rétro-transcription suivie d'une analyse par PCR quantitative
SDS : Sodium Dodécyl Sulfate
SFC : site fragile commun
siRNA : « Silencing RNA »

Sld : synthétique lethal avec Dpb1
SNS : brin naissant court (« short nascent strand »)
SSB : cassure simple-brin de l'ADN (« Single-Strand Break »)
SSC : tampon Salin de Citrate de Sodium
TBP : « TATA-box binding protein »
TDP : étape de sélection des domaines de réplication précoce (« Timing Decision Point »)
TK : Thymidine Kinase
TMPK : Thymidilate Kinase
TopBP1 : « Topoisomerase II Binding Protein 1 »
Topo1 : Topoisomérase I
TSA : Trichostatine A
TS : Thymidilate Synthase
TSS : site de démarrage de la transcription (« Transcription Start Site »)
UV : Ultra-Violet
γH2AX : phosphorylation du variant d'histone H2AX sur sa sérine 139

Résumé

Au cours de ma thèse au sein du laboratoire du Professeur Michelle Debatisse, je me suis intéressé aux mécanismes maintenant la stabilité du génome et contrôlant la dynamique de réplication dans les cellules de mammifères. J'ai étudié le rôle des kinases ATR (« Ataxia Telangiectasia and Rad3 related ») et Chk1 (« Checkpoint Kinase 1 »), du point de contrôle intra-S (« checkpoint »), dans le contrôle de la dynamique de réplication. Cette première étude m'a amené à étudier la relation entre les dommages à l'ADN et la dynamique de réplication, dans des modèles cellulaires déficients pour des facteurs de la réponse aux dommages à l'ADN (DDR), appartenant soit au « checkpoint », soit à la voie de réparation par recombinaison homologue (HR), tels que Rad51 et BRCA2.

Je montre ici, que le ralentissement des fourches de réplication et l'augmentation de la densité d'événements d'initiation, observés dans des cellules déficientes pour Chk1 ou Rad51, sont la conséquence indirecte des lésions apparaissant spontanément dans de telles cellules. Le ralentissement des fourches dans ces cellules dépend d'une perturbation de la disponibilité en précurseurs de nucléotides qui dépend de la sur-expression et/ou de la re-localisation de la sous-unité p53R2 de la ribonucléotide réductase (RNR). De plus, contrairement à ce qui était proposé, je montre que Chk1 n'a pas de rôle actif dans la répression des origines latentes, mais que c'est la vitesse des fourches qui détermine l'espacement entre les origines actives, par un mécanisme de compensation découvert auparavant au laboratoire ([Anglana, 2003](#) ; [Coubet, 2008](#)). L'ensemble de mes résultats permet de proposer un mécanisme général de communication entre la réplication et la réparation. Ce mécanisme confère un avantage aux cellules, puisque le ralentissement des fourches stabilise la machinerie de réplication qui voyage sur une matrice endommagée, et l'activation d'origines latentes procure une source de sauvetage pour les fourches bloquées.

En collaboration avec le laboratoire de Bernard Lopez, nous montrons que les catastrophes mitotiques qui surviennent dans des cellules déficientes pour Rad51 ou BRCA2, sont la conséquence du stress réplicatif induit par le mécanisme décrit ci-dessus.

J'ai aussi contribué à étudier le rôle des kinases du « checkpoint » dans les mécanismes d'instabilité des sites fragiles communs (SFC). Nous montrons qu'ATR, mais pas Chk1, protège activement les SFC, lorsque les cellules sont soumises à un stress réplicatif.

Introduction

1. Préambule

1.A Le cycle cellulaire et la réplication.

1. Le cycle cellulaire.

Le cycle cellulaire, du point de vue de la réplication, peut être simplifié comme ceci : le matériel génétique d'une cellule mère, contenu dans les chromosomes, est dupliqué, une et une seule fois, pour être transmis lors de la division cellulaire à deux cellules filles génétiquement identiques. Ainsi, la vie d'une cellule en croissance peut se découper en une succession d'étapes, appelées phases, qui permettent à une cellule mère de se diviser en deux cellules filles (voir (Diffley and Labib, 2002) pour revue). La phase G1 est une phase de préparation à la réplication, la phase S est la phase de synthèse de l'ADN, la phase G2 est une phase de préparation à la ségrégation des chromosomes puis à la division cellulaire, qui se déroulent en phase M (mitose) (voir schéma [figure 1a](#)).

2. Le modèle du réplicon.

La réplication se subdivise en trois étapes : l'initiation qui, par l'ouverture de l'ADN au niveau des origines, permet le recrutement de la machinerie de polymérisation et le démarrage de la synthèse de l'ADN, l'élongation qui correspond à la poursuite de la synthèse, et la terminaison qui consiste en la fusion de deux fourches convergentes ([figure 1b](#)). Ce processus a été modélisé comme ceci : une protéine initiateur interagit en *trans* avec une séquence spécifique (réplicateur). Cette association initiateur-réplicateur permet d'ouvrir l'ADN localement et de déclencher la réplication. Ce modèle dit du réplicon (voir [figure 2a](#)) proposé en 1963 par François Jacob, François Cuzin et Sydney Brenner (Jacob and Brenner, 1963), est le paradigme de la réplication des chromosomes circulaires procaryotes. Après élongation bidirectionnelle, le chromosome circulaire est répliqué par les fourches provenant de l'unique réplicateur (origine), qui convergent au site de terminaison. Un réplicon, le chromosome dans ce cas, est la séquence d'ADN répliquée à partir d'une origine donnée. Il a par la suite été montré que chez la bactérie *Escherichia coli*, la liaison de la protéine dnaA (initiateur) au niveau de la séquence origine oriC (réplicateur) permet le recrutement de divers facteurs qui, *in fine*, déclenchent l'initiation (Chakraborty et al., 1982; Yasuda and Hirota, 1977) (voir (Messer, 2002) pour revue) (voir [figure 2b](#)).

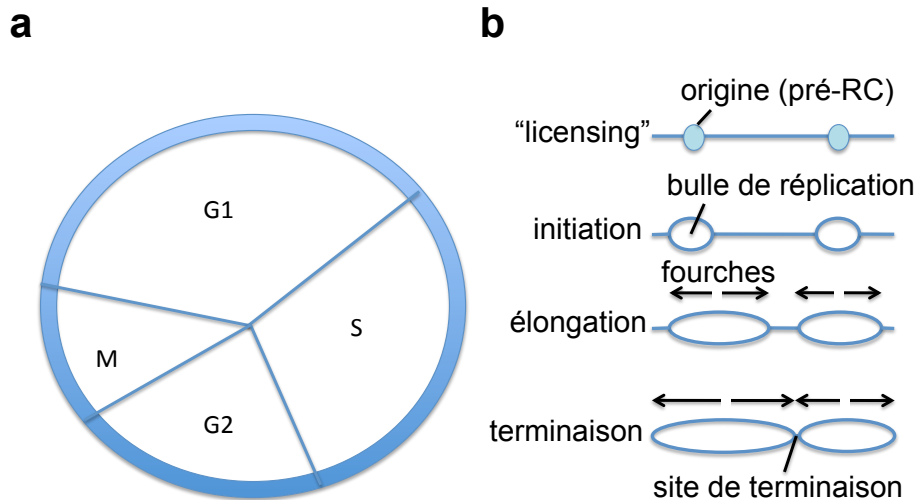


Figure 1 : Le cycle cellulaire du point de vue de la réplication. (a) Le cycle cellulaire est divisé en quatre phases : G1, S, G2 et M. La phase S est la phase de synthèse de l'ADN. (b) À la fin de la mitose (M) et au début de G1, les origines potentielles sont chargées par le complexe pré-RC, cette étape rend l'ADN compétent à initier la réplication (« licensing »). À l'entrée en phase S et pendant la phase S, l'initiation de la réplication au niveau d'une origine, ouvre la double hélice d'ADN pour permettre aux polymérases de synthétiser. Cette ouverture de l'ADN forme une bulle de réplication. L'élongation est la synthèse effectuée par les fourches de réplication. La terminaison de la réplication se fait par la rencontre et la fusion de deux fourches.

Toutefois, la structure et la taille des génomes imposent une toute autre complexité du programme de réplication chez les eucaryotes. Voici quelques considérations importantes qu'il faut garder à l'esprit quant il s'agit de réplication chez ces organismes.

3. Le matériel génétique des eucaryotes.

Comparé aux 4,6 millions de paires de bases (pb) de l'unique chromosome circulaire d'*E. coli*, les génomes des eucaryotes, notamment ceux des métazoaires, sont gigantesques et distribués sur plusieurs chromosomes linéaires. Le génome humain, par exemple, est composé de 6,4 milliards de pb réparties sur 23 paires de chromosomes, rendant nécessaire la mise en place d'un grand nombre d'origines pour assurer sa réplication.

4. Les chromosomes eucaryotes : un ensemble structuré de protéines et d'ADN.

Nos chromosomes ne sont pas constitués d'ADN nu, mais d'un ensemble complexe et structuré d'ADN et de protéines appelé chromatine. En effet, les quelques deux mètres d'ADN du génome humain doivent impérativement être compactés pour tenir dans un noyau

d'environ 10 μm de diamètre. Le nucléosome est l'unité de base de la fibre de chromatine, il est formé d'un hétéro-octamère d'histones autour duquel s'enroule la double hélice d'ADN. Cette fibre peut être surenroulée, conduisant à des niveaux de compaction supérieurs (voir [figure 3a](#)) (voir (Fierz and Muir, 2012) pour revue). La détermination des sites origines et la synthèse de l'ADN se font donc dans le contexte de la chromatine, qui apporte des contraintes physiques supplémentaires pour l'ouverture de l'hélice. La chromatine est aussi une source d'information dite épigénétique, portée par les modifications post-traductionnelles des histones. On distingue l'hétérochromatine qui est peu ou pas transcrite, compacte (peu accessible), et l'euchromatine, « ouverte », qui contient les gènes transcrits (voir [figure 3b](#)). Au cours de la réplication la chromatine doit être désassemblée avant le passage de la fourche, puis réassemblée après son passage. La réplication confère aux cellules une opportunité pour maintenir ou effacer les marques épigénétiques au passage de la fourche et ainsi moduler la structure de la chromatine et le devenir des cellules (voir (Groth et al., 2007) pour revue).

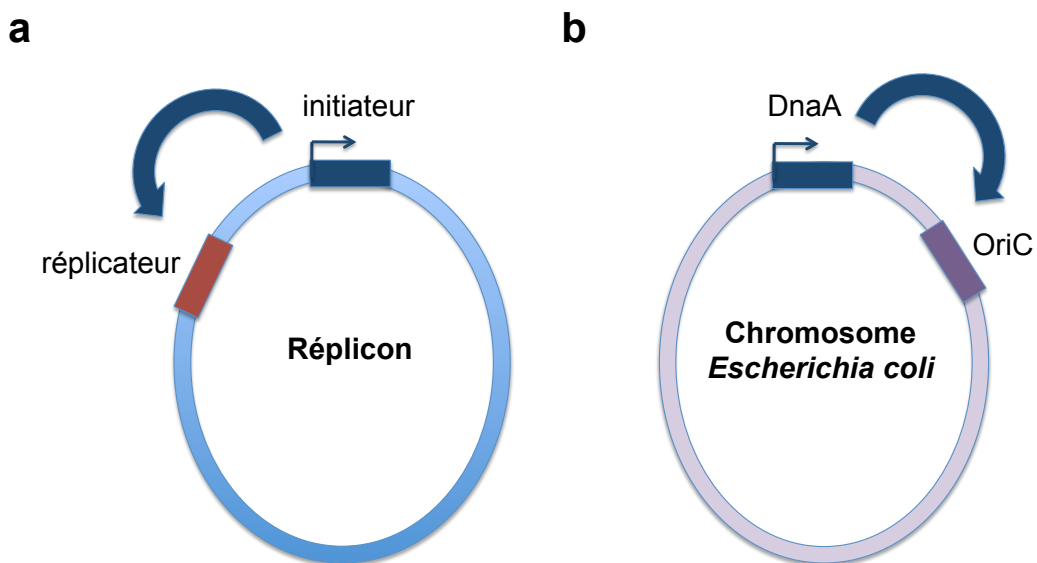


Figure 2 : Le modèle du réplicon est le paradigme de la réplication chez les procaryotes. (a) Schéma du modèle du réplicon. Une protéine dite initiateur se fixe sur la séquence origine dite réplicateur, déclenchant l'initiation de la réplication. (b) Le chromosome d'E. coli possède une séquence origine unique OriC, reconnue spécifiquement par la protéine DnaA en charge de l'initiation.

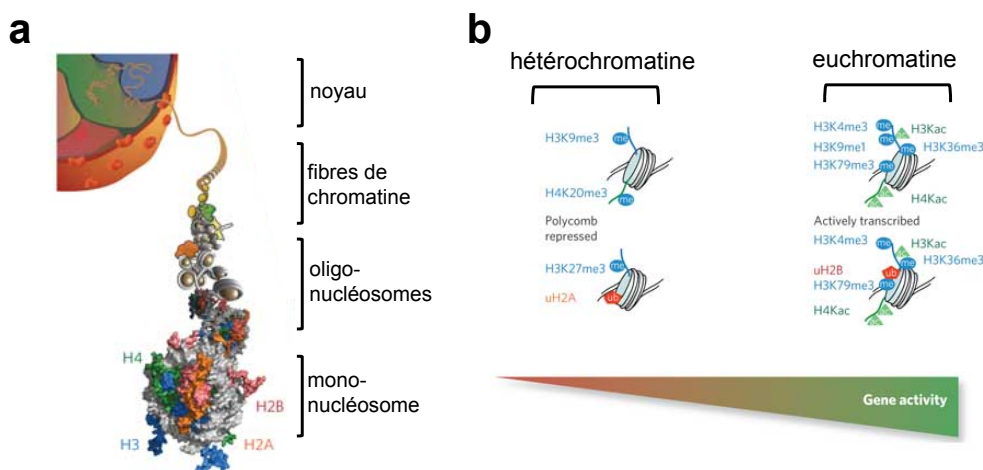


Figure 3 : L'ADN est compacté en fibres de chromatine. (a) Schéma de la chromatine à différentes échelles. L'unité de base de la chromatine est le mono-nucléosome, les nucléosomes forment des fibres de chromatine. Ces fibres s'organisent dans l'espace nucléaire pour former des territoires chromosomiques. Chaque nucléosome est un hétéro-octamère d'histones H4, H3, H2A et H2B autour duquel est entouré l'ADN. (b) L'hétérochromatine peu transcrite porte les marques épigénétiques de fermeture de la chromatine. L'euchromatine qui est transcrite, est caractérisée par des marques épigénétiques d'ouverture. Les marques épigénétiques qui structurent la chromatine sont des modifications post-traductionnelles des histones, comme les méthylations (me) ou les acétylations (ac). Figure adaptée de Fierz 2012.

5. Génétiquement identiques : copie conforme ?

Nos chromosomes doivent être répliqués sans erreurs, une et une seule fois par cycle. Les cellules possèdent des systèmes de contrôle complexes pour spécifier les origines, choisir celles qui seront activées au cours d'un cycle donné, et ne pas permettre de réinitier dans les régions déjà répliquées (discuté en partie 1 des annexes). Les cellules possèdent en outre des mécanismes de protection et de surveillance, en charge de maintenir la stabilité du génome en cours de répllication, qui constituent une barrière anti-tumorale. L'instabilité des génomes et les moyens que possède la cellule pour s'en protéger sont discutés dans la partie 3 de mon introduction.

1.B La nature des origines de répllication est incomprise chez les métazoaires.

Chez les métazoaires, comme chez *E. coli*, l'initiation comporte trois étapes clé, (i) les origines sont reconnues par un complexe initiateur, (ii) le complexe de pré-répllication (pré-RC) est assemblé sur le complexe initiateur fixé sur les origines, (iii) le pré-RC est activé et la double-hélice d'ADN est ouverte, permettant le recrutement de nouveaux facteurs dont les

polymérasés qui initient la synthèse de l'ADN. Les origines de réplication des métazoaires ne sont pas strictement définies par un motif nucléotidique, mais plutôt par un ensemble de caractéristiques, certaines liées à la structure de la chromatine, qui permettent le recrutement des complexes protéiques en charge de l'initiation (voir (Gilbert, 2004) pour revue). La nature des origines de réplication chez les métazoaires reste donc mal comprise (l'état actuel de nos connaissances est décrit en partie 1 des annexes).

Contrairement à la situation observée chez *E. coli*, le complexe initiateur et le pré-RC sont recrutés, au cours de la phase G1, sur de nombreuses origines potentielles dont une fraction seulement sera réellement activée au cours d'une phase S donnée. De plus, le moment (« timing ») et l'efficacité d'activation de ces origines sont très variables, et sont influencés par de nombreux paramètres. Parmi eux, trois ont particulièrement focalisé mon attention : la voie de réponse aux dommages à l'ADN et les kinases du point de contrôle de phase S (ATR et Chk1), les perturbations de la progression des fourches de réplication, et le métabolisme des déoxyribonucléotides (dNTP). Ces trois paramètres sont intimement liés car, comme vous le verrez, la disponibilité des dNTP contrôle la vitesse de progression des fourches, laquelle module la densité des origines actives. Les dommages à l'ADN conduisent aussi à ralentir les fourches, voir à les bloquer.

Mon introduction n'a pas pour but de fournir une vision exhaustive de la réplication, mais a pour simple prétention de donner un nombre d'information suffisant pour comprendre et critiquer les résultats obtenus lors de ma thèse.

2. Les origines de réplication chez les Eucaryotes.

2.A Le choix des origines potentielles : le chargement du complexe pré-RC.

Les origines potentielles sont déterminées par l'ancrage d'un complexe multi-protéique à la chromatine. Les étapes de formation de ce complexe sont décrites dans la [figure 4](#). Si, comme je l'ai évoqué dans le préambule, la nature des origines de réplication est encore mal connue, les complexes protéiques en charge de l'initiation sont bien décrits et apparaissent fonctionnellement conservés chez les eucaryotes.

2.A.a La découverte du complexe initiateur ORC.

Le complexe ORC (« Origin Recognition Complex ») a été identifié en 1992 chez *Saccharomyces cerevisiae*, les seules cellules eucaryotes possédant un motif de séquence spécifique des origines (ARS, « Autonomously Replicating Sequences »). L'identification de ce complexe résulte de la purification des protéines fixées sur les séquences ARS identifiées au préalable (Bell and Stillman, 1992). La nature de l'ARS est décrite dans la partie 1.A.a des annexes.

Le complexe hétéro hexamérique ORC1-6 est le seul complexe protéique connu à ce jour pour spécifier les origines de réplication chez l'ensemble des eucaryotes (voir (Bell, 2002) pour revue). Il est conservé chez les métazoaires qui, malgré l'absence de séquence origine, utilisent ce même complexe initiateur. Chez *S. cerevisiae* la fixation d'ORC à l'ADN nécessite l'hydrolyse de l'ATP, assurée par un domaine ATPase de type AAA+ (Bell and Stillman, 1992). Le domaine ATPase AAA+ est retrouvé chez les métazoaires (voir (Davey et al., 2002) pour revue). La fixation d'ORC, qui a lieu en fin de mitose et au début de la phase G1, constitue la première étape de l'établissement d'une origine fonctionnelle.

Comme je le rappellerai par la suite, il est maintenant connu que le complexe ORC n'est pas seulement un facteur d'initiation de la réplication, mais il intervient aussi dans l'établissement de certaines structures de la chromatine et dans plusieurs processus qui coordonnent la réplication à d'autres étapes du cycle cellulaire (voir (Scholefield et al., 2011) pour revue). Les sites de fixation du complexe ORC ne sont donc pas obligatoirement voués à devenir des origines potentielles.

2.A.b L'assemblage du pré-RC ou « licensing ».

1. Chargement du pré-RC

Le complexe ORC fixé sur la chromatine peut servir de plateforme pour l'assemblage séquentiel du pré-RC (voir figure 4). Les premiers facteurs chargés sont Cdt1 et Cdc6, permettant le recrutement du complexe MCM2-7 (« mini-chromosome maintenance »). Ce complexe MCM2-7 possède une activité hélicase, caractérisée *in vitro* mais pas encore démontrée *in vivo* (Bochman and Schwacha, 2008), faisant de MCM2-7 l'hélicase répllicative putative. De plus, chez *Xenopus laevis* MCM9 a été récemment identifiée au sein du pré-RC et assiste sa formation (Lutzmann and Mechali, 2008). La réplication bi-directionnelle est assurée par le positionnement de MCM de chaque côté du complexe ORC (Evryn et al., 2009; Gambus et al., 2011; Remus et al., 2009). Si, en théorie, deux complexes MCM sont suffisants pour initier la réplication de manière bidirectionnelle, un excès de complexes est

chargé sur l'ADN (comparé au nombre de complexes ORC) (Edwards et al., 2002; Mahbubani et al., 1997). De plus, des expériences d'immuno-précipitation de la chromatine (ChIP) dans des cellules Hela montrent que les complexes ORC et MCM sont distants d'environ 0,5 à 1 kb (Ritzi et al., 1998). Le « paradoxe MCM » (voir (Laskey and Madine, 2003) pour revue) pourrait s'expliquer par le fait qu'un excès de MCM favoriserait l'initiation d'origines de secours lorsque les cellules sont soumises à un stress réplicatif (Chuang et al., 2010; Ge et al., 2007; Ibarra et al., 2008).

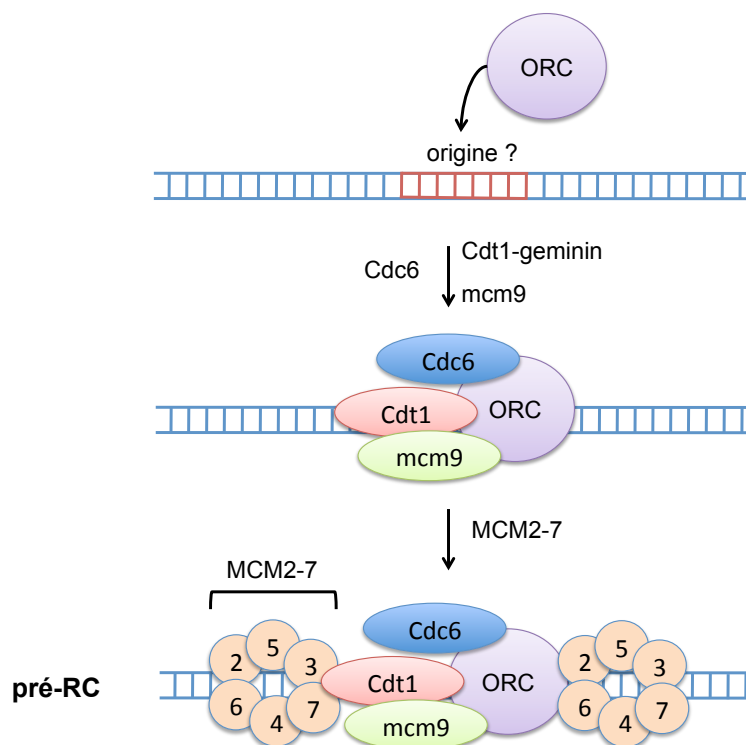


Figure 4 : Chargement du pré-RC sur les origines potentielles. L'origine, dont on ignore la nature chez les métazoaires, est reconnue par l'hétéro-hexamère ORC1-6. Le complexe ORC est reconnu par Cdt1 et Cdc6. MCM9 a été récemment découvert chez le Xénope, il intervient dans le chargement de l'hétéro-hexamère MCM2-7. Deux complexes MCM sont associés à ORC. Le complexe de pré-réplication (pré-RC) est assemblé en G1, et rend le site fixé compétent à initier la réplication. Figure adaptée de Méchali 2010.

2. Inhibition du « re-licensing ».

Le chargement du pré-RC constitue l'étape de « licensing » (autorisation), qui rend les chromosomes compétents pour l'initiation de la réplication. Cette étape n'est permise qu'une seule fois au cours du cycle cellulaire, en phase G1. En effet, l'augmentation de l'activité des

CDK (kinases dépendantes de cyclines) de phase S (S-CDK) conduit à la phosphorylation des membres du pré-RC et à leur inactivation. Par exemple, la phosphorylation de Cdc6 par les S-CDK chez les vertébrés conduit à son export hors du noyau, cette phosphorylation n'ayant pas d'effet sur la fraction de Cdc6 déjà fixée à la chromatine. En plus de sa dégradation programmée au cours du cycle, la protéine Cdt1 est régulée négativement par la géminine qui empêche le «re-licensing» d'une origine au cours de la phase S ou en G2 (De Marco et al., 2009; Lee et al., 2004; Lutzmann et al., 2006).

2.B Comment une séquence sur laquelle le pré-RC est assemblé devient-elle une origine active ?

1. L'initiation de la réplication.

Le pré-RC n'a pas la capacité d'initier la réplication. Au passage de la transition G1/S, l'activité des S-CDK augmente et déclenche le recrutement d'un autre groupe de facteurs qui va permettre l'ouverture de la double hélice d'ADN. En effet, l'hélicase MCM2-7 chargée en G1 reste inactive tant qu'elle n'est pas associée avec le complexe GINS et CDC45 (Ilves et al., 2010; Moyer et al., 2006). L'ensemble Cdc45-MCM-GINS, nommé CMG, a une activité ADN hélicase et ATPase supérieure au complexe MCM *in vitro*. De plus, GINS et CDC45 favorisent l'interaction de MCM avec l'ADN. Le complexe CMG est actuellement reconnu comme l'hélicase répliquative *in vivo*, son activation permet l'ouverture de la double hélice d'ADN et le chargement des ADN polymérase. L'initiation proprement dite est régulée par l'action de deux kinases, Cdc7-Dbf4 (« Dbf4-dependent kinase », DDK) et la S-CDK Cdk2, associé aux cyclines A ou E (voir (Tanaka and Araki, 2010) pour revue) (voir [figure 5](#)).

2. Quelles sont les cibles de ces kinases ?

Chez *S. cerevisiae*, les cibles des S-CDK (les cibles de DDK sont encore mal connues) sont Sld2 et Sld3 (Tanaka et al., 2007; Zegerman and Diffley, 2007). Ces facteurs sont essentiels pour le recrutement et l'activation de GINS et de CDC45. De plus, avec Dpb11, Sld2 et Sld3 permettent le chargement de l'ADN polymérase ϵ (Pol ϵ). Chez les métazoaires, les orthologues de Sld2 et Dpb11 sont respectivement RecQ4 et TopBP1 mais leur rôle dans l'initiation n'est pas connu. La fonction de Sld3 pourrait être portée par les facteurs d'initiation nouvellement découverts, Treslin, DUE-B ou GEMC1 (Balestrini et al., 2010; Boos et al., 2011; Kumagai et al., 2010). Néanmoins ces facteurs ne peuvent compléter le mutant *sld3* de *S. pombe* (Wang et al., 2012). Les étapes moléculaires qui aboutissent à l'initiation de la réplication chez les métazoaires sont donc encore mal connues.

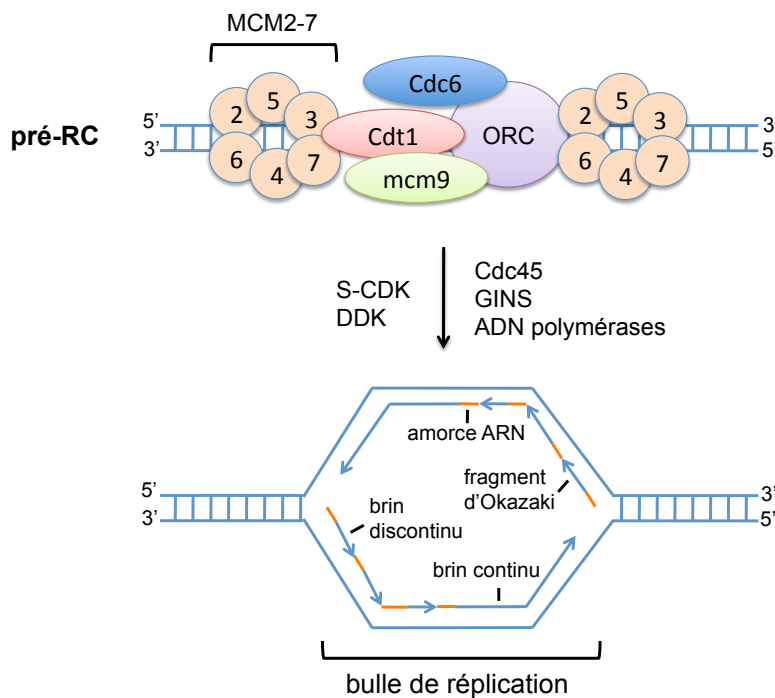


Figure 5 : Initiation de la réplication. Le complexe pré-RC est converti en complexe de pré-initiation par le recrutement de Cdc45, GINS, qui forment avec MCM l'hélicase répliquative. L'activation de ce complexe et donc l'ouverture de l'ADN se fait au passage de la transition G1/S par l'activité des kinases de la phase S : S-CDK et de Cdc7-Dbf4 (DDK). L'ouverture de l'ADN permet le recrutement des ADN polymérase et donc l'initiation de la réplication. Figure adaptée de Méchali 2010.

3. Les quatre niveaux de contrôle du choix des origines.

Comme nous venons de le voir l'établissement d'une origine de réplication fonctionnelle résulte du recrutement séquentiel de facteurs de réplication et de leur activation. Chez les métazoaires, les paramètres qui régulent ces recrutements en *cis* restent incompris. Par exemple, la nature des sites (séquence d'ADN et/ou structure de la chromatine) reconnus par le complexe ORC est mal connue. Le complexe ORC sert ensuite de plateforme de recrutement pour le chargement du pré-RC. Cependant, un pré-RC n'est pas constitué sur tous les sites où ORC est fixé, notamment parce que ce complexe possède des fonctions indépendantes de l'initiation de la réplication (voir (Scholefield et al., 2011) pour revue). Les facteurs qui déterminent la capacité qu'a un site de fixation d'ORC à charger le pré-RC ne sont pas connus. Comme précédemment mentionné, les sites chargés par le pré-RC constituent des origines potentielles car seule une fraction de ces sites initie effectivement la

réplication. Les paramètres qui gouvernent le choix des origines actives restent également à déterminer. Enfin, le moment d'activation des origines au cours de la phase S (« timing ») est très variable d'une origine à l'autre. Ces quatre niveaux de contrôle du choix des origines et de leur programme spatio-temporel d'activation sont décrits dans la partie 1 des annexes (voir schéma en [figure 6](#)).

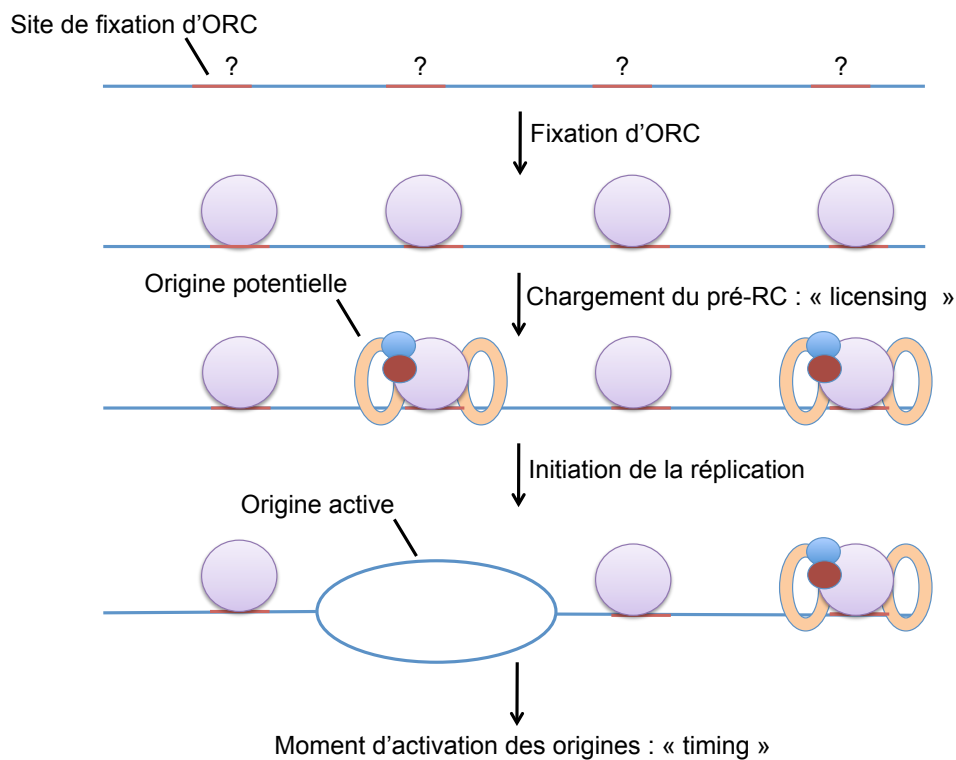


Figure 6 : Les quatre niveaux de contrôle du choix des origines. (i) Le complexe ORC se fixe à l'ADN. La nature des sites de fixation d'ORC est mal connue (symbolisé par un point d'interrogation). (ii) Le « licensing », par l'assemblage du pré-RC, rend compétent un site de fixation d'ORC pour initier la réplication. Les sites chargés par le pré-RC sont des origines potentielles. (iii) Parmi la multitude de sites chargés par le pré-RC seulement une partie est activée. On parle de sites d'initiation ou d'origines actives. (iiii) Le moment d'activation des origines au cours de la phase S est variable, on parle de « timing ».

2.C Étude de la dynamique de réplication par peignage moléculaire.

Avant l'avènement des techniques d'étude à l'échelle du génome, l'initiation avait été analysée seulement au niveau de quelques loci chez les métazoaires. Deux catégories de profils avaient été trouvées, les origines « classiques » où l'initiation survient à un site précis (comme celles trouvées aux loci lamine B2, MYC, β -globine, AMPD2), et les « zones » où

l'initiation survient de façon aléatoire dans de larges régions, souvent intergéniques (comme les loci : IgH ou DHFR) (voir (Aladjem, 2007) pour revue). Le peu de loci décrits ne permettraient cependant ni de comprendre l'organisation globale du programme d'initiation ni de déterminer les paramètres qui différencient les origines ponctuelles des zones d'initiation.

1. Les « clusters » d'origines.

Certaines de ces questions ont été résolues par le développement de la technique de peignage moléculaire qui permet l'étude de molécules d'ADN uniques (Michalet et al., 1997). Par marquage de l'ADN en cours de synthèse avec des analogues de thymidine, il est possible de visualiser les événements d'initiation sur les fibres d'ADN peignées (Herrick and Bensimon, 1999) (voir (Tuduri et al., 2010b) pour revue). Contrairement aux autres techniques de biologie moléculaire, qui donnent une vision des événements survenant à l'échelle de la population cellulaire, le peignage moléculaire permet de visualiser l'organisation spatiale des sites d'initiation sur une même fibre d'ADN, donc le long d'un même locus. Bien que l'on ne connaisse pas la localisation génomique des fibres d'ADN étudiées, de nombreuses informations peuvent être obtenues concernant l'organisation des événements d'initiation à l'échelle du génome. Il a ainsi été largement montré que ces événements sont généralement groupés spatialement, en « clusters », dans lesquels l'initiation survient de façon relativement synchrone (Anglana et al., 2003 ; Conti et al., 2007a; Courbet et al., 2008; Lebofsky et al., 2006; Norio et al., 2005; Pasero et al., 2002). Chez les mammifères, la distance séparant deux événements dans ces clusters est comprise entre 100 et 150 kb (voir (Tuduri et al., 2010b) pour revue).

2. Étude d'un locus unique par peignage moléculaire.

La technique de peignage moléculaire permet également d'étudier l'organisation de la réplication à un locus donné par hybridation de sondes (FISH) sur les molécules d'ADN peignées. Il a ainsi été montré chez *S.cerevisiae* qu'au sein du locus codant les ARN ribosomiques (ADNr), la réplication est assurée par des origines organisées en « clusters » séparés par de larges régions dépourvues d'initiation. Cette absence d'initiation a été corrélée à la structure de la chromatine (Pasero et al., 2002). Chez le hamster Chinois, le locus AMPD2 (adénosine monophosphate désaminase 2) est répliqué à partir d'une origine très efficace nommée oriGNAI3. Lorsque les cellules subissent des changements métaboliques (je reviendrai en partie 2.D sur la nature de ces changements), les événements d'initiation sont distribués sur 5 origines au sein du locus (Anglana et al., 2003; Courbet et al., 2008). La réplication du locus AMPD2 est donc assurée par un « cluster » d'origines au sein duquel oriGNAI3 est utilisée très préférentiellement en conditions normales. Ce travail souligne que l'utilisation des origines au sein d'un locus donné est

plastique et permet aux cellules de s'adapter aux variations métaboliques. L'étude du locus IgH chez l'homme a aussi révélé l'existence de clusters, dont l'organisation est corrélée à l'organisation de la chromatine (Norio et al., 2005). Enfin, l'étude d'une région de 1,5 Mb en position 14q11.2 du génome humain a mis en évidence de nombreuses zones d'initiation localisées dans des régions intergéniques (Lebofsky et al., 2006). Le rôle de la séquence, de la transcription et de la structure de la chromatine dans l'initiation de la réplication sont discutés dans la partie 1 des annexes.

La découverte des « clusters » d'origines par l'analyse de molécules uniques suggère qu'il n'y a pas de réelle différence entre les origines ponctuelles et les larges zones d'initiation. En effet, les zones détectées par les techniques de biologie moléculaire classique sont probablement des régions possédant de nombreuses origines potentielles dont seule une petite fraction, variable d'une cellule et d'un cycle à l'autre, est activée. À l'échelle de la population, l'initiation semble donc aléatoire (ou répartie) au sein de la zone. Les origines ponctuelles, quant à elles, correspondent aux cas où une origine potentielle est activée dans chaque cellule et à chaque cycle, du moins dans certaines conditions, les origines potentielles avoisinantes restant latentes (voir le modèle proposé par (Cayrou et al., 2011)).

3. La vitesse de progression des fourches de réplication

Grace à l'étirement régulier des molécules d'ADN, le peignage moléculaire a aussi permis de mesurer la vitesse de progression des fourches au sein de diverses populations cellulaires. Il a été trouvé que la vitesse moyenne des fourches fluctue entre 1 et 2 kb/min (voir (Jones and Petermann, 2012; Tuduri et al., 2010b) pour revues). De plus, la vitesse moyenne des fourches varie d'une lignée cellulaire à une autre, indiquant que des facteurs génétiques et/ou épigénétiques influencent la progression des fourches. La distribution de la vitesse des fourches est une gaussienne. C'est à dire qu'une majorité de fourches progresse à la vitesse moyenne, mais de nombreuses fourches sont plus lentes ou plus rapides que la moyenne. Ces différences de vitesse peuvent avoir plusieurs origines, soit la vitesse de progression des fourches est variable d'une cellule à l'autre, soit elle est variable au sein d'une même cellule, avec des régions génomiques traversées par des fourches lentes et d'autres par des fourches rapides, soit ces deux paramètres interviennent ensemble.

L'analyse de la vitesse des fourches le long d'un locus donné a montré, pour tous les loci étudiés à ce jour, que la vitesse varie d'une molécule d'ADN à l'autre comme au niveau du génome global (Lebofsky et al., 2006; Letessier et al., 2011; Ozeri-Galai et al., 2011). Ces résultats montrent que les fluctuations de vitesse ne sont pas spécifiques de locus, et suggèrent une hétérogénéité entre cellules et/ou entre allèles.

Le taux de synthèse a aussi été mesuré à partir de réplisomes reconstitués *in vitro* et progressant sur une matrice identique. De telles expériences montrent que la distribution du taux de synthèse est aussi une gaussienne, certains réplisomes progressant plus rapidement que d'autres. Cette variabilité de progression est liée à des cycles de déchargement et de rechargement des polymérase à la fourche (Yao et al., 2009). Ces expériences *in vitro* soulignent le caractère stochastique de la progression des fourches, et suggèrent que les fourches progressent à différentes vitesses au sein d'une même cellule. L'ensemble de ces résultats indique que la vitesse des fourches varie d'une cellule à l'autre et probablement aussi au sein d'une même cellule.

2.D Les « pools » de dNTP et le programme de réplication.

La synthèse des dNTP, essentielle pour la réplication et la réparation de l'ADN (voir partie 3.D), est complexe et dépend de deux voies : la synthèse *de novo* et la voie de sauvetage (schématisées en [figure 7](#)).

1. Les voies de synthèse des dNTP

Au cœur de la voie de synthèse *de novo* se trouve la ribonucléotide réductase (RNR) qui convertit les ribonucléotides diphosphates (NDP) en déoxyribonucléotides diphosphates (dNDP) (voir (Nordlund and Reichard, 2006) pour revue). La RNR produit quatre dNDP : dADP, dGDP, dCDP et dUDP. L'étape ultime de phosphorylation qui permet la formation des dNTP est assurée par la nucléotide diphosphate kinase (NDPK). L'étape catalysée par la RNR est limitante et constitue donc une étape critique pour l'approvisionnement des cellules en dNTP. La synthèse du dTTP est particulière puisque la RNR ne peut former du dTDP. Le dTTP peut être synthétisé par la thymidilate synthase (TS) à partir du dUMP, lequel provient soit de la pyrophospholyse du dUTP par la dUTPase soit de la désamination du dCMP. La thymidilate kinase (TMPK) convertit ensuite le dTMP en dTDP (voir (Reichard, 1985; Saada, 2009) pour revues) (voir [figure 7](#)). Alternativement, la thymidine peut être phosphorylée par la thymidine kinase (TK), une enzyme de la voie de sauvetage. La voie de sauvetage permet aussi de convertir les autres dNs (déoxyribonucléosides) en dNTP par l'action en séquence de la dCK (déoxycytidine kinase), de la NMPK et de la NDPK.

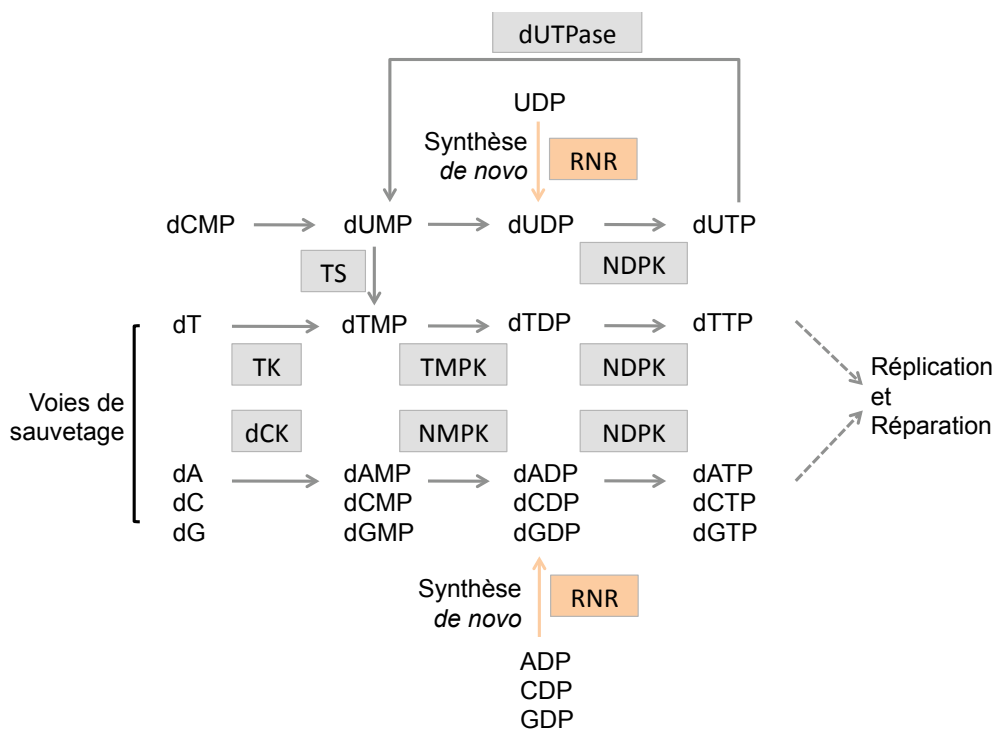


Figure 7 : Les voies de synthèse des dNTP. La voie de synthèse *de novo* utilise la ribonucléotide réductase (RNR), pour convertir les ribo- en déoxyribo-nucléotides (dNTP). Cette voie est colorée en jaune. Les voies de sauvetage sont les voies qui permettent aux cellules de récupérer les déoxyribonucléosides (dNs) pour les convertir en dNTP sans intervention de la RNR. Les enzymes intervenant sont encadrées en gris. TS : thymidilate synthase, TK : thymidine kinase, dCK : deoxycytidine kinase, TMPK : thymidilate kinase, NMPK : kinase des nucléosides monophosphate, NDPK : kinase des nucléosides diphosphates. Les substrats sont les différents dérivés des purines (Adénine, A et Guanine, G) et des pyrimidines (Thymine, T, Uridine, U et Cytosine, C). L'ensemble de ces voies approvisionne la cellule en dNTP pour la réplication et la réparation de l'ADN.

2. La régulation de l'activité de la RNR chez les mammifères

Trois sous-unités de la RNR ont été décrites chez les mammifères: une grande sous-unité catalytique R1 (connue sous le nom de RNR1, codée par le gène RRM1), et deux petites sous-unités régulatrices, la R2 (connue sous le nom de RNR2, codée par RRM2) et la p53R2 (codée par RRM2B). La RNR est un hétéro-tétramère composé de deux grandes sous-unités R1 et de deux petites sous-unités R2 ou p53R2 (voir (Thelander, 2007) pour revue). La RNR est fortement régulée au cours du cycle *via* l'expression de RRM2, qui augmente en phase S, et la dégradation de la R2 en G2 (Chabes et al., 2004; Chabes et al., 2003; D'Angiolella et al., 2012; Engstrom et al., 1985). R1 et p53R2 sont stables au cours du cycle, p53R2 étant présente à un niveau basal. La déplétion de p53R2 n'a d'effet ni sur la

progression dans le cycle cellulaire ni sur la taille des « pools » (réserve) de dNTP de cellules proliférantes, suggérant un rôle mineur de cette sous-unité lors de la phase S (Pontarin et al., 2007). Ceci s'explique par le fait que la R2 est beaucoup plus abondante que la p53R2 dans des cellules en phase S, c'est donc le complexe R2-R1 qui approvisionne la machinerie de réplication. En phase G1 ou lorsque les cellules sont en quiescence, la sous-unité p53R2 approvisionne en précurseurs la machinerie de réparation et la réplication mitochondriale (Pontarin et al., 2007; Pontarin et al., 2011). Illustrant la fonction de maintenance mitochondriale exclusive à p53R2, des mutations de cette sous-unité sont responsables de maladies mitochondriales chez l'Homme (Bourdon et al., 2007) et dans des modèles murins (Kimura et al., 2003). De plus la RNR est soumise à une régulation allostérique qui permet d'ajuster l'activité de l'enzyme en fonction de l'abondance relative des différents dNTP ou des NTP (Fairman et al., 2011; Kashlan and Cooperman, 2003). Il est généralement admis que la RNR est majoritairement cytoplasmique chez les mammifères et que les précurseurs diffusent librement du cytoplasme vers le noyau (Pontarin et al., 2008). Des données récentes suggèrent cependant que, comme chez les levures, la localisation des sous-unités de la RNR dans les différents compartiments cellulaires joue un rôle physiologique important (voir (Niida et al., 2010b) pour revue) (ce rôle est discuté en partie 3.D). Ces régulations sont essentielles pour constituer un « pool » de dNTP équilibré et suffisant pour répliquer et réparer le génome.

3. Les « pools » de dNTP et la dynamique de réplication.

Il a été largement établi, notamment par l'étude de molécules uniques, qu'une carence modérée en dNTP entraîne un ralentissement des fourches de réplication et influence le programme d'activation des origines. L'hydroxyurée (HU) est un inhibiteur de la RNR qui carence les cellules en précurseurs, préférentiellement en dATP et dGTP et provoque un ralentissement des fourches proportionnel à la réduction des « pools » puriques (Nicander and Reichard, 1985; Poli et al., 2012; Skoog and Nordenskjold, 1971) (voir partie 1 des résultats).

La taille des « pools » de dNTP peut être modulée sous l'influence de nombreux facteurs. La première mise en évidence de ce phénomène provient de travaux de JH. Taylor sur des cellules CHO (« Chinese Hamster Ovary ») synchronisées en phase S précoce par de la fluorodéoxyuridine (FdU) (Taylor, 1977). La FdU inhibe la conversion du dUMP en dTMP et carence donc les cellules en thymidine. L'observation de molécules d'ADN au microscope électronique a montré que plus la carence en thymidine est sévère, plus les fourches ralentissent et plus la densité des événements d'initiation est élevée. Par la suite, il a été montré par peignage moléculaire que la dynamique de réplication varie de façon importante

dans différents mutants de hamster Chinois amplifiés pour le locus AMPD2. En effet, dans certains clones la progression des fourches est rapides (1,6 kb/min en moyenne) et la densité des événements d'initiation faible (un tous les 100 kb environ). Dans d'autres clones, les fourches sont nettement plus lentes (0,6 kb/min en moyenne) et la densité des événements d'initiation plus élevée (1 tous les 40 kb environ). L'addition de précurseurs de nucléotides dans le milieu de culture de cellules à fourches « lentes » provoque à la fois une progression rapide des fourches et une diminution de la densité d'initiation (Anglana et al., 2003). Si l'on traite des cellules à fourches « rapides » au HU ou à l'aphidicoline (un inhibiteur des ADN polymérase répliquatives qui n'affecte pas les « pools »), les fourches ralentissent et la densité d'événements d'initiation augmente (Courbet et al., 2008). L'ensemble de ces résultats montre que la vitesse des fourches dépend de la taille ou de l'équilibre des « pools » de dNTP, et que l'espacement entre les origines actives est positivement corrélé à la vitesse des fourches. Ce phénomène a été appelé « compensation » puisqu'il permet de maintenir constant le taux de synthèse de l'ADN mesuré sur molécule unique. Cette compensation pourrait être due au fait que le ralentissement des fourches laisse le temps à des origines latentes de s'activer, de façon passive. Néanmoins un mécanisme actif peut aussi être envisagé, le stress provoqué par le ralentissement des fourches pourrait activer une voie de signalisation qui influencerait en retour l'activation des origines (discuté en partie 3.C). Ces mécanismes sont sans doute spécifiques des métazoaires puisque le traitement de *S. cerevisiae* au HU ralentit globalement le programme de répllication sans influencer ni l'ordre d'activation des origines, ni leur nombre (Alvino et al., 2007).

De manière similaire le traitement de cellules de mammifères à la TSA (trichostatine A), un inhibiteur des histones déacétylases, ralentit les fourches de répllication et augmente le nombre d'origines actives (Gay et al., 2010). La TSA, en modifiant le niveau d'acétylation des histones, altère le niveau d'expression de nombreux gènes. Notamment, les gènes codant la thymidilate synthase et la CTP synthétase sont sous exprimées, aboutissant à une carence en dCTP et dTTP. Cette carence en nucléotides est directement responsable du ralentissement des fourches observé après traitement à la TSA puisque, comme dans les exemples précédents, l'ajout de précurseurs permet de compenser l'effet de la drogue sur la dynamique de répllication. Pareillement, la déficience pour l'hélicase du Syndrome de Bloom (BLM) est associée à une dérégulation de la cytidine désaminase, conduisant à un déséquilibre des pools pyrimidiques (Chabosseau et al., 2011). Le ralentissement des fourches observé dans ces cellules peut aussi être compensé par addition des précurseurs adéquats dans le milieu de culture. Dernièrement, il a été montré que la surexpression de certains oncogènes induit un stress répllicatif. Ce phénomène a été corrélé à un déséquilibre

du pool de dNTP, entraînant le ralentissement des fourches et l'augmentation du nombre d'origines actives (Bester et al., 2011) (voir partie conclusion et perspectives). Ce stress réplicatif peut aussi être supprimé par addition de précurseurs dans le milieu de culture. L'ensemble de ces résultats indique que les dérégulations de la voie de biosynthèse des nucléotides constituent une source majeure de ralentissement des fourches. De plus, le fait que les cellules soient capables d'utiliser les précurseurs exogènes nous offre un moyen simple et efficace pour déterminer quels paramètres de la dynamique de réplication dépendent de la taille des pools de dNTP.

4. La compensation réorganise les foyers de réplication.

Si la compensation maintient le taux de synthèse de l'ADN constant, la quantité de dNTP consommée reste également constante. Cette conclusion peut paraître paradoxale lorsque la compensation survient dans des cellules carencées en précurseurs. Une explication est suggérée par les résultats d'analyse des foyers de réplication. Il a en effet été montré que, dans des cellules traitées au HU, le nombre de foyers diminue alors que le nombre de fourches par foyer augmente. Ce dernier résultat montre que le nombre de fourches actives est plastique au sein d'un même foyer de réplication (Ge and Blow, 2010). L'augmentation du nombre de fourches par foyer de réplication pourrait accroître la consommation locale de facteurs limitants, notamment des dNTP. Plutôt qu'une carence globale, cette surconsommation locale pourrait être la cause majeure du ralentissement des fourches. En faveur de cette hypothèse, il a été montré par peignage moléculaire que les fourches émanant d'une même origine - fonctionnant donc au sein d'un même foyer - progressent à la même vitesse (Conti et al., 2007a; Lebofsky et al., 2006). L'ensemble des résultats suggère que la progression des fourches de réplication dépend de la concentration locale des dNTP au sein des foyers de réplication.

5. Facteurs limitants et compensation.

La relation entre la vitesse des fourches de réplication et la densité d'origines actives est encore controversée. En effet, on peut envisager soit qu'une vitesse faible des fourches permet d'activer plus d'origines par l'un ou l'autre des mécanismes proposés précédemment, soit que l'augmentation du nombre d'origines actives conduit à une surconsommation d'un facteur limitant, provoquant un ralentissement des fourches. En faveur de la seconde hypothèse, l'analyse des effets de l'inhibition partielle de Cdc7 (par la molécule PHA-767491) montre que le traitement entraîne, comme attendu, une augmentation de la distance inter-origines dans des cellules humaines en culture et, *moins évident a priori*, une augmentation de la vitesse de progression des fourches (Montagnoli et al., 2008). Ce résultat suggère qu'un ou plusieurs facteurs limitent la progression des fourches dans des

cellules en culture. Ce facteur étant moins consommé lorsque le nombre d'origines actives diminue, ce facteur est moins limitant et les fourches progressent plus rapidement. Il a été observé que l'ajout de précurseurs exogènes augmente la vitesse de progression des fourches dans certains modèles cellulaires de mammifères (Anglana et al., 2003; Malinsky et al., 2001). En accord avec ce résultat la surexpression de la RNR chez *S. cerevisiae* entraîne l'augmentation de la vitesse de progression des fourches (Poli et al., 2012), suggérant que dans certaines cellules le facteur limitant pourrait être la disponibilité en dNTP.

3. La réponse aux dommages à l'ADN chez les Eucaryotes.

Il a été estimé que le génome d'une cellule est soumis à des stress variés, d'origine endogène ou exogène, pouvant former jusqu'à 100 000 lésions par jour (voir (Ciccia and Elledge, 2010) pour revue). Ces lésions sont prises en charge par un ensemble complexe de voies de signalisation connu sous le nom de réponse aux dommages à l'ADN (DDR) (voir (Lord and Ashworth, 2012; Smith et al., 2010) pour revues). La DDR permet de prévenir l'apparition des lésions, et, en cas d'échec, de reconnaître et de réparer les dommages. L'étude de la DDR chez la levure a été à la base de la majeure partie des découvertes concernant cette voie de signalisation (voir (Pasero et al., 2003) (Branzei and Foiani, 2010; Friedel et al., 2009) pour revues). Cependant, l'étendue des travaux publiés est telle que je fais ici le choix de décrire essentiellement l'état de nos connaissances chez les métazoaires.

Les lésions à l'ADN sont de natures très différentes et apparaissent à différents moments du cycle cellulaire. Par exemple, l'ADN peut être endommagé par certains produits du métabolisme cellulaire comme les espèces réactives de l'oxygène (« Reactive Oxygen Species », ROS), qui oxydent les bases et induisent des cassures. L'ADN peut être altéré par des facteurs exogènes, notamment par les rayons ultra-violet (UV) de la lumière, qui forment des dimères de pyrimidines. La gestion de telles liaisons intra-brins se fait par le système de réparation par excision de nucléotides (NER, « nucleotide excision repair »). D'autres lésions inter-brins (« interstrand cross-links », ICL), qui sont générées directement par des molécules anti-cancéreuses et indirectement par le stress oxydatif, est assurée par la voie FANC (Fanconi anemia) (voir (Mace et al., 2005) pour revue). En réponse à leur diversité, la prise en charge de ces lésions est effectuée par un ensemble de voies de signalisation qui ont chacune une spécificité et/ou une fenêtre temporelle d'action

particulière. La DDR comprend notamment les voies ATM-Chk2 et ATR-Chk1, qui répondent respectivement aux cassures double-brin de l'ADN (DSB) et à l'accumulation d'ADN simple-brin (ADNsb) généré au niveau des fourches de réplication bloquées (voir [figure 8](#)). Toutefois, comme nous le verrons par la suite, la séparation entre ces deux voies est une simplification.

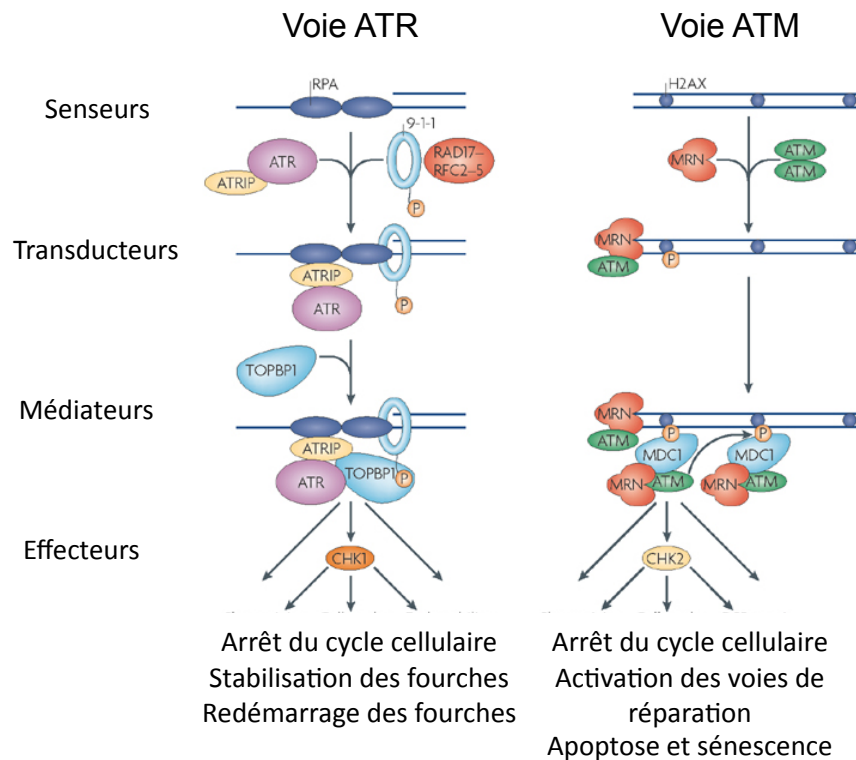


Figure 8 : Les voies ATR et ATM. La voie ATR est activée en réponse à l'accumulation de l'ADN simple brin (ADNsb), principalement au niveau des fourches bloquées, mais aussi au niveau des cassures double-brin de l'ADN (DSB). Le senser de l'ADNsb est RPA. Qui permet le recrutement d'ATR par l'intermédiaire d'ATRIP. Avec l'aide de médiateurs ATR active Chk1. La voie ATM répond principalement aux DSB, par le senser MRN. ATM phosphoryle l'histone H2AX, et active Chk2. Les réponses de ces voies sont principalement l'arrêt du cycle cellulaire. Figure adaptée de Cimprich 2008.

3.A La réponse aux dommages à l'ADN.

L'ADN peut être cassé au niveau d'un brin (SSB), ou des deux brins (DSB), ces deux dernières catégories de lésions représentent des menaces importantes pour le génome (voir [\(Aguilera and Gomez-Gonzalez, 2008; Lord and Ashworth, 2012\)](#) pour revues) (voir [figure 9](#)).

La reconnaissance d'un type de dommage par son senseur spécifique est essentielle pour une gestion adéquate des dommages, et donc l'intégrité du génome (voir [figures 8 et 9](#)).

1. La réparation des SSB.

La famille PARP (poly(ADP-ribose) polymérase) est activée en réponse aux SSB, PARP1 et PARP2 sont recrutées au site de dommage dans les secondes qui suivent l'apparition de la lésion. Leur activité permet la synthèse de chaînes de poly(ADP-ribose) sur les histones H1 et H2B (voir [\(Schreiber et al., 2006\)](#) pour revue), ce qui constitue une plateforme de recrutement pour les facteurs de réparation et de modification de la chromatine. C'est le cas des protéines XRCC1 et LIG3 qui sont recrutées par un mécanisme dépendant de PARP1 pour permettre la ligation du brin cassé (voir [\(Caldecott, 2008\)](#) pour revue).

2. La réparation des DSB

La réponse aux DSB est plus complexe et peut aboutir à quatre voies de réparation distinctes : la recombinaison homologue (HR), la jonction d'extrémités non-homologues (« non-homologous end-joining », NHEJ), le NHEJ alternatif et le « single-strand annealing » (SSA). Le choix de ces différentes voies de réparation dépend de l'état des brins d'ADN au niveau de la cassure et de la phase du cycle pendant laquelle apparaît la cassure (voir [\(Ciccio and Elledge, 2010\)](#) pour revue) (voir [figure 10](#)). Le NHEJ permet de relier bout à bout deux extrémités d'ADN qui sont reconnues par le complexe Ku70/Ku80. En plus du complexe Ku, le recrutement de DNA-PK permet de protéger les extrémités de la dégradation par des exonucléases (qui conduirait à déclencher les mécanismes alternatifs de réparation). La protéine ARTEMIS prépare les extrémités à la ligation, qui est effectuée par l'action de XRCC4 et LIG4 (voir [\(Mahaney et al., 2009\)](#) pour revue). Le NHEJ est le mode de réparation privilégié en phase G1. Le NHEJ alternatif qui dépend de la recherche de micro-homologie nécessite une resection limitée (5-25 nucléotides) de la cassure. Cette resection, initiée par la reconnaissance de la cassure par PARP, permet une première accumulation du complexe Mre11-Rad50-Nbs1 (MRN) au site de cassure. C'est l'association de MRN et PARP à ce site qui est ensuite reconnue par ATM et permet son activation. Les intermédiaires de réparation des DSB entraînent aussi l'activation d'ATM et d'ATR si la resection, stimulée par BRCA1 et ATM, génère assez d'ADNsb. L'ADN est ensuite réparé par SSA ou recombinaison homologue. Il est important de noter que le mode de réparation des DSB privilégié en S et G2 est la HR, notamment parce que la chromatide sœur intacte peut être utilisée comme matrice de réparation. Dans ce cas, le RPA (« replication protein A »), couvrant l'ADNsb, est remplacé par Rad51, qui va catalyser l'invasion de la séquence homologue et aboutir à la réparation de la cassure par recombinaison.

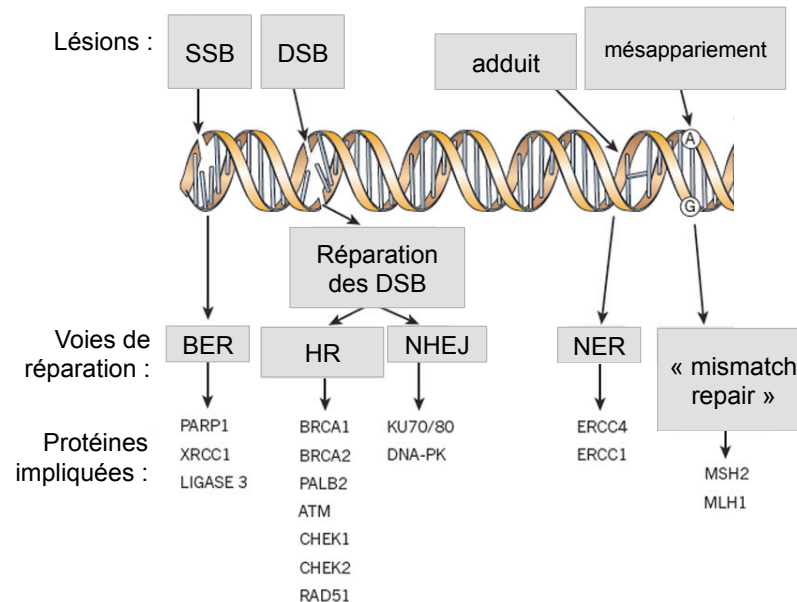


Figure 9 : Divers dommages et voies de réparation. L'ADN peut être endommagé de multiples façons. Par des altérations de la séquence, par des adduits et des mésappariements. Ou l'ADN peut être cassé au niveau du simple-brin (SSB) ou de la double hélice (DSB). Chaque dommage est reconnu et réparé par une voie spécifique. Figure adaptée de Lord 2012.

3. Les effecteurs et la réponse aux DSB

Les cibles principales d'ATM et d'ATR sont respectivement Chk2 et Chk1 (« Checkpoint Kinase 1 et 2»), qui vont elles-mêmes déclencher une cascade de phosphorylations activant de nombreuses protéines cibles. Parmi les cibles majeures de ces deux kinases se trouvent Cdc25A et C, et Wee1, qui permettent l'arrêt du cycle cellulaire en présence de dommages. L'activation de la DDR entraîne aussi une profonde réorganisation de la chromatine au niveau du site de dommage, notamment la phosphorylation du variant d'histone H2AX sur sa sérine 139 (γ H2AX). Cette modification se propage ensuite sur quelques Mb autour du site de cassure, constituant une plateforme pour le recrutement des facteurs de réparation et favorisant la persistance du signal (voir (Soria et al., 2012) pour revue). D'autres modifications de la chromatine déclenchées par la DDR permettent d'inhiber la transcription dans les régions endommagées, notamment l'acétylation de la chromatine est localement modifiée par l'histone acétyl-transférase Tip60. La chromatine est aussi sumoylée et

ubiquitylée, facilitant le recrutement de protéines de réparation telles que 53BP1 et BRCA1. L'ubiquitination des histones permet aussi de réprimer l'élongation de la transcription. Cet ensemble complexe de modifications oriente le choix du mécanisme de réparation, maintient le signal, et remodèle la chromatine pour la rendre compétente pour la réparation (voir (Lukas et al., 2011) pour revue). La DDR régule aussi les événements survenant sur l'ADN pendant la prise en charge des dommages, comme les rencontres entre machineries de transcription et de réplication, qui pourraient déstabiliser davantage le génome au niveau des cassures ou des intermédiaires de réparation (l'impact de la DDR sur la réplication est décrit en partie 3C).

Ces cascades de modifications post-traductionnelles sont des réponses rapides. Elles sont associées à des réponses tardives, via des régulations transcriptionnelles qui affectent le profil d'expression de nombreux gènes. C'est principalement le suppresseur de tumeur et facteur de transcription p53 qui gouverne la mise en place des réponses à plus long terme. La surexpression de p21, par exemple, joue un rôle majeur dans le maintien de l'arrêt du cycle cellulaire. Si le nombre de cassures est trop important, ou si la réparation est inefficace, c'est l'activation prolongée de la voie p53 qui dirige les cellules vers la sénescence ou l'apoptose (voir (Reinhardt and Schumacher, 2012) pour revue).

3.B La réponse aux fourches bloquées chez les métazoaires : ATR et Chk1.

1. Les kinases ATR et Chk1 sont essentielles

Contrairement à ATM et Chk2, les kinases ATR et Chk1 sont essentielles chez les vertébrés au cours du développement et pour la croissance de cellules en culture (Brown and Baltimore, 2000; de Klein et al., 2000; Liu et al., 2000; Niida et al., 2007). En effet, les souris « knock-out » pour ATR ou Chk1 meurent très précocement au cours du développement. Chez l'homme, une mutation hypomorphe d'ATR est responsable du syndrome de Seckel (O'Driscoll et al., 2003), qui provoque chez les patients un retard de croissance, une microcéphalie et une forte instabilité chromosomique. Un modèle souris de ce syndrome (ATR^{sls}) récapitule les symptômes humains, et suggère que ces phénotypes résultent d'un stress réplicatif embryonnaire accru, dont l'origine reste inconnue (Murga et al., 2009).

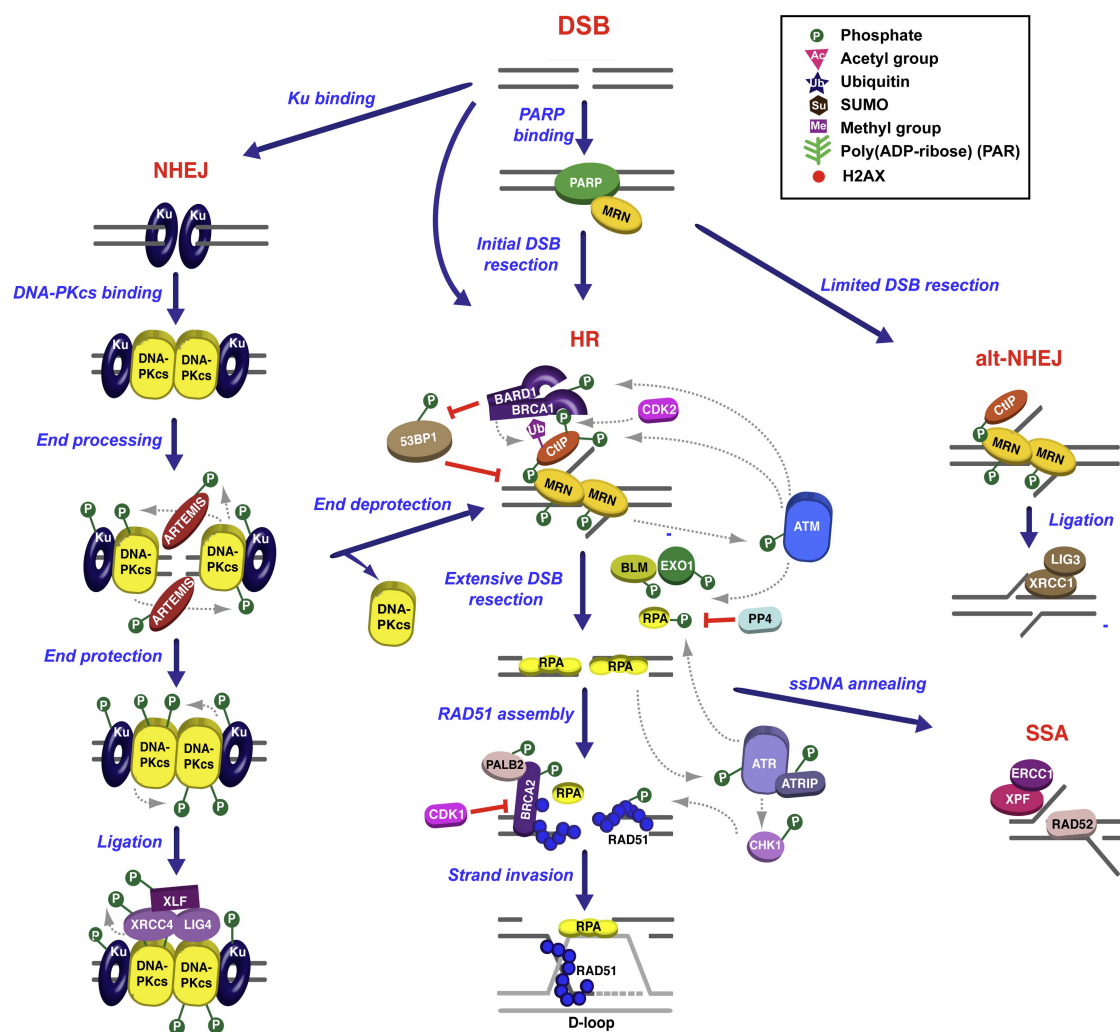


Figure 10 : Les voies de réparation des DSB. Le choix entre les quatre voies de réparation des DSB dépend de la résection des extrémités cassées. Le choix du mode de réparation dépend également du cycle cellulaire, la HR est privilégiée en phase S. Voir le texte pour les explications. Figure de Ciccia et Elledge 2010.

2. Activation du « checkpoint » intra-S par les fourches bloquées.

Lors de la phase S, la progression des fourches peut être affectée par de nombreux évènements. Les fourches de réplication peuvent, par exemple, être perturbées lorsqu'elles rencontrent la machinerie de transcription, notamment lorsque l'ARN naissant reste hybridé à sa matrice ADN et forme ce que l'on appelle une « R-loop » (voir (Aguilera and Garcia-Muse, 2012; Tuduri et al., 2010a) pour revues). La progression des ADN polymérase peut aussi être compromise par la rencontre avec une lésion sur la matrice d'ADN, ou encore parce que les cellules sont carencées en nucléotides. Ces situations de stress répliatif, entraînent l'apparition d'ADNsb, et l'activation de la voie ATR-Chk1, dite de point de contrôle intra-S (« checkpoint intra-S») (voir (Pasero et al., 2003) pour revue) (voir [figure 11](#)). De l'ADNsb est généré au niveau d'une fourche bloquée lorsqu'une ADN polymérase est arrêtée alors que l'hélicase continue à progresser (Byun et al., 2005). Le simple brin est immédiatement recouvert par le senseur RPA, ce qui constitue le signal permettant le recrutement et l'activation du transducteur ATR, via son partenaire ATRIP (« ATR interacting protein ») (Zou and Elledge, 2003). L'activation complète du « checkpoint » nécessite l'intervention des médiateurs TopBP1 (« Topoisomerase binding protein 1 ») et Claspine. Le recrutement de TopBP1 au niveau de l'ADNsb couvert par RPA est médié par le complexe 9-1-1 (Rad9-Rad1-Hus1) (Delacroix et al., 2007). L'interaction de Claspine avec TopBP1, permet la phosphorylation de Claspine par ATR, ce qui constitue le signal permettant le recrutement et l'activation de Chk1 par ATR (voir (Smith et al., 2010) pour revue). Deux médiateurs additionnels interviennent dans l'activation de Chk1, Timeless et Tipine (« Timeless-interacting protein »). Timeless interagit avec Chk1 et ATR, et Tipine interagit avec RPA et Claspine, cette dernière interaction stabilisant l'association de Claspine et Timeless avec l'ADNsb (Kemp et al., 2010). Ces médiateurs sont aussi importants en *cis* pour la stabilisation des fourches bloquées (voir (Cimprich and Cortez, 2008) pour revue) (voir partie 3 des résultats). Après activation, Chk1 est libéré de la chromatine pour agir en *trans* sur ces cibles nucléaires et cytoplasmiques. Les cibles principales de Chk1 sont des régulateurs du cycle cellulaire, comme Cdc25A, Cdc25C et Wee1, ce qui explique le rôle de Chk1 dans l'arrêt du cycle (Mailand et al., 2000; Sorensen et al., 2003; Xiao et al., 2003) (voir (Bartek and Lukas, 2003) pour revue). De plus, il a été suggéré que Chk1 est impliqué dans la recombinaison, via la phosphorylation de Rad51 et BRCA2 (Bahassi et al., 2008; Sorensen et al., 2005). Chk1 pourrait aussi intervenir dans l'inhibition de la transcription en réponse aux dommages par phosphorylation de l'histone H3 (Shimada et al., 2008). La voie ATR-Chk1 semble aussi intervenir lorsque la phase S n'est pas perturbée, puisque son inactivation conduit à l'accumulation de dommages et à un stress répliatif (Niida et al., 2005; Syljuasen et al., 2005).

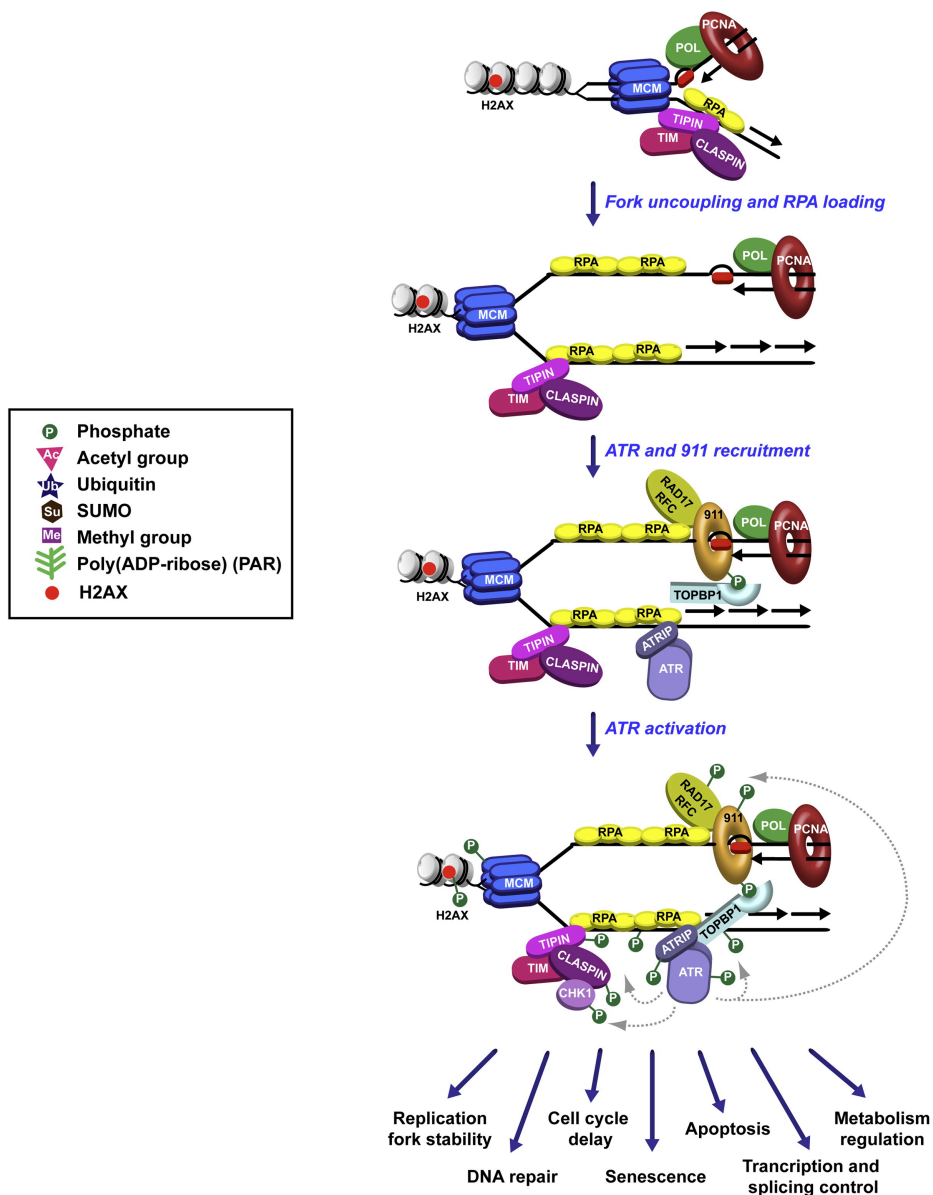


Figure 11 : Activation du « checkpoint intra-S ». Le blocage de la fourche de réplication au niveau d'une lésion ou en réponse à un stress réplcatif, comme la carence en dNTP, conduit à l'accumulation d'ADNsb par le découplage entre les polymérase et les hélicases. L'ADNsb est reconnu par le senseur RPA, qui permet de recruter ATR-ATRIP au niveau de la fourche bloquée. Les médiateurs Claspin, Timeless, Tipin et TopBP1 permettent l'activation de Chk1 et l'activation d'une signalisation cellulaire qui va aboutir notamment à

l'arrêt du cycle, la stabilisation des fourches et leur redémarrage. Figure de Ciccia et Elledge 2010.

3.C Influence du « checkpoint » et des facteurs de DDR sur la dynamique de réplication chez les métazoaires.

Comme je viens de l'indiquer la voie ATR-Chk1 intervient à bas niveau lors de toute phase S, suggérant qu'elle assiste la progression des fourches confrontées aux perturbations endogènes. Les kinases ATR et Chk1 sont aussi impliquées dans l'établissement du programme de réplication.

1. Chk1 et ATR sont impliquées dans la progression des fourches de réplication et l'inhibition des origines latentes.

Il a été montré que la déplétion, l'inhibition ou des mutations inactivatrices d'ATR ou de Chk1 entraînent le ralentissement des fourches de réplication et l'augmentation de la densité des événements d'initiation (Katsuno et al., 2009; Marheineke and Hyrien, 2004; Maya-Mendoza et al., 2007; Petermann et al., 2010; Scora and McGowan, 2009; Speroni et al., 2012). Ces résultats suggèrent que Chk1 et ATR sont activement impliquées dans le contrôle de la dynamique de réplication, même en absence de stress exogène. Le mécanisme impliquant ATR dans le contrôle de la dynamique de réplication n'a pas été extensivement étudié. Les résultats de plusieurs groupes suggèrent que Chk1 est directement impliquée dans le contrôle de l'activation des origines. Cette interprétation repose sur le fait que chez la levure *S. cerevisiae*, l'homologue fonctionnel de Chk1 (Rad53) contrôle le déclenchement des origines tardives (Santocanale and Diffley, 1998), via la phosphorylation des facteurs d'initiation Sld3 et Dbf4 (Lopez-Mosqueda et al., 2010; Zegerman and Diffley, 2010).

2. Chk1 : inhibition des origines latentes et facteur(s) limitant.

Par analogie avec la levure, il a été proposé que Chk1 pourrait moduler l'activation des origines des métazoaires via la phosphorylation de Cdc25A. La phosphorylation de Cdc25A entrainerait sa dégradation, maintenant les S-CDK sous forme inactive. Cette absence d'activité S-CDK bloquerait le déclenchement des origines de réplication et provoquerait l'arrêt du cycle (Mailand et al., 2000; Sorensen et al., 2003; Xiao et al., 2003). Inversement, l'absence de Chk1 entraînerait l'activation non contrôlée de Cdc25A et des S-CDK, et le déclenchement d'origines normalement latentes (voir (Sorensen and Syljuasen, 2012) pour

revue). Chk1 phosphoryle aussi Cdc25B et C, qui pourraient intervenir dans cette voie de régulation.

3. Le contrôle de la progression des fourches par Chk1.

Dans l'hypothèse formulée ci-dessus, l'effet de Chk1 sur la vitesse de progression des fourches serait une conséquence indirecte de l'augmentation du nombre d'origines actives (Petermann et al., 2010). De fait, si l'on restreint le nombre d'origines actives dans des cellules déficientes pour Chk1 par déplétion modérée de Cdc7 ou inhibition partielle des CDK (traitement à la roscovitine), le ralentissement des fourches est supprimé. Pour expliquer ces résultats, il a été proposé que l'augmentation du nombre d'événements d'initiation entraîne la surconsommation de facteurs limitants pour l'élongation, jusqu'à présent non identifiés, aboutissant au ralentissement des fourches.

Cependant, il a été montré que Chk1 interagit avec PCNA et, de façon intéressante, que l'abolition de cette interaction par mutation du domaine PIP (« PCNA-interacting peptide ») de Chk1 entraîne un ralentissement des fourches (Scorah et al., 2008). Bien que la mutation du domaine PIP de Chk1 ou la déplétion de Chk1 ne soient pas forcément équivalentes d'un point de vue fonctionnel, il est difficile d'interpréter ce dernier résultat sans admettre qu'un mécanisme alternatif à l'hypothèse des facteurs limitants contrôle la progression des fourches dans des cellules déficientes pour Chk1. Par ailleurs, il a été suggéré qu'un « checkpoint » d'élongation, impliquant activement Chk1, inhibe la progression des fourches en réponse aux dommages (voir (Conti et al., 2007b) pour revue). D'autres travaux ont montré que Chk1 favorise le redémarrage des fourches après irradiation UV (Speroni et al., 2012).

Ces résultats contradictoires montrent que le rôle de Chk1 dans la progression des fourches n'est pas compris. De plus, Chk1 joue un rôle dans l'organisation des foyers de réplication. En effet, dans des cellules humaines, il a été observé que l'inhibition de Chk1 entraîne une augmentation de l'intensité des foyers de réplication, suggérant que chaque foyer contient plus de fourches actives. Par contre, le nombre de foyers par cellule diminue dans ces conditions (Ge and Blow, 2010; Maya-Mendoza et al., 2007). Comme discuté précédemment (2.D : « la compensation réorganise les foyers de réplication ») la réorganisation spatiale des fourches pourrait influencer la concentration locale en facteurs de réplication, ce qui modulerait la vitesse de progression des fourches et/ou le recrutement des origines.

4. L'absence de Chk1 entraîne l'accumulation de dommage.

L'inactivation de Chk1 entraîne l'accumulation de dommages et l'activation de la DDR, notamment de la voie ATM-Chk2-p53 (Niida et al., 2005; Syljuasen et al., 2005). Il a été proposé que ces dommages résultent soit de l'activation d'origines de réplication surnuméraires, soit de l'augmentation du nombre de fourches bloquées. La première hypothèse est soutenue par le fait que la co-déplétion de Cdc25A et de Chk1 supprime l'apparition des dommages (Syljuasen et al., 2005). En faveur de la seconde hypothèse, rappelons que les fourches de réplication ne redémarrent pas après irradiation UV dans des cellules déplétées pour Chk1 (ou ATR). Néanmoins, sans irradiation UV, les cellules déficientes pour ATR ou Chk1 présentent un taux normal de blocage des fourches (asymétrie des fourches déterminée par peignage) (Speroni et al., 2012) (voir aussi les parties 1 et 3 des résultats). D'autres données indiquent que l'apparition des dommages en absence de Chk1 dépend de l'endonucléase Mus81, qui clive des structures d'ADN ressemblant à des fourches de réplication (Forment et al., 2011). Le fait que les fourches bloquées soient rapidement clivées par Mus81 pourrait expliquer pourquoi la fréquence des fourches asymétriques n'augmente pas notablement dans les cellules déplétées. Il a été proposé que l'activation de Mus81 en phase S, une période du cycle pendant laquelle l'enzyme est normalement inactive, résulterait de la dérégulation des S-CDK en absence de Chk1. L'activation de Mus81 en phase S pourrait aboutir à un clivage incontrôlé des fourches de réplication, expliquant l'accumulation de dommage (voir (Sorensen and Syljuasen, 2012) pour revue). Pour l'instant les données disponibles ne permettent pas de choisir entre les différentes hypothèses, et il n'est pas exclu que les dommages apparaissent pour des raisons qui n'ont pas encore été envisagées jusque présent.

5. D'autres membres de la DDR sont impliqués dans la progression des fourches et l'activation des origines.

Étonnamment, des déficiences pour d'autres facteurs de la DDR, tels que Wee1, Claspine, Rad51 ou BRCA2 conduisent aussi au ralentissement des fourches de réplication et à l'augmentation du nombre d'origines actives dans des proportions similaires à ce qui est observé en absence de Chk1 ou ATR (Daboussi et al., 2008; Dominguez-Kelly et al., 2011; Petermann et al., 2008; Scora and McGowan, 2009). Il a été proposé que Wee1 pourrait, comme Chk1, influencer l'activité des S-CDK et donc le programme de réplication (voir (Sorensen and Syljuasen, 2012) pour revue). Néanmoins, aucun mécanisme n'a jusqu'à présent été proposé pour expliquer le rôle des autres facteurs de la DDR sur la dynamique de réplication. Il est à noter que les facteurs de HR, tels que Rad51, sont impliqués dans le redémarrage des fourches bloquées, ce qui pourrait expliquer, au moins en partie, le ralentissement des fourches observé en leur absence (voir (Petermann and Helleday, 2010) pour revue).

6. La DDR pourrait perturber la dynamique de réplication.

Les déficiences pour ces facteurs (de DDR) conduisant toutes à l'accumulation de dommages, on peut se demander si se sont les dommages qui influencent la dynamique de réplication. En faveur de cette hypothèse, il est connu que l'induction de dommages conduit au ralentissement des fourches de réplication (Merrick et al., 2004; Shimura et al., 2006). D'autres études ont aussi établi des corrélations entre instabilité génomique et ralentissements de fourches, comme observé dans des cellules humaines déplétées pour ING2 (« Inhibitor of Growth 2»), un suppresseur de tumeur potentiel (Larrieu et al., 2009). Le mécanisme par lequel ING2 influence la réplication n'est toujours pas compris. Il est également connu que des déficiences pour la topoisomérase I (Topo1), sont associées au ralentissement des fourches de réplication et à l'activation d'origines latentes. Le mécanisme expliquant cet effet sur la réplication dépend de l'instabilité créée par l'interférence entre la réplication et la transcription, la topo1 étant en charge de résoudre les « R-loop » (Tuduri et al., 2009).

3.D La réponse aux dommages à l'ADN et les « pools » de dNTP.

La réparation de l'ADN nécessite une synthèse *de novo* d'un fragment d'ADN. Il a été estimé que la réparation d'une cassure double-brin par recombinaison homologue nécessite environ 10 000 dNTP (Robert et al., 2011). Même si la quantité absolue de dNTP nécessaire pour synthétiser ces petits fragments est faible, une concentration adéquate en nucléotides est requise pour que les enzymes en charge de la réparation puissent fonctionner correctement.

1. La DDR régule l'activité RNR chez les levures.

Chez la levure *S. cerevisiae*, la taille des « pools » de dNTP augmente par un facteur 4 à 5 en réponse aux dommages à l'ADN (voir (Branzei and Foiani, 2009; Niida et al., 2010b) pour revues). En effet, les kinases MEC1 et RAD53, qui sont respectivement les homologues fonctionnels d'ATR et de Chk1, contrôlent la synthèse, l'activité et la localisation de la ribonucléotide réductase. Crt1 est un répresseur transcriptionnel qui, en collaboration avec Tup1 et Ssn6, lie les promoteurs des gènes codant la RNR. L'hyperphosphorylation de Crt1 par les kinases du « checkpoint » Mec1-Rad53-Dun1 en réponse aux dommages, empêche sa fixation au niveau des promoteurs et active la transcription de la RNR (Huang et al., 1998). Sml1 est un inhibiteur de l'activité de la RNR, qui se lie à la grande sous-unité catalytique. Sml1 est dégradé après phosphorylation par la voie Mec1-Rad53-Dun1, ce qui lève l'inhibition de la RNR (Zhao et al., 2000; Zhao and Rothstein, 2002). Cette voie de

régulation de la RNR a été notamment caractérisée par des expériences montrant que les mutants *mec1* et *rad53* sont létaux, mais que la surexpression de la RNR, ou la co-délétion de *SML1* ou *CRT1* supprime cette létalité (Desany et al., 1998; Huang et al., 1998; Zhao et al., 1998). De plus des mutants hypomorphes *rad53* ou *mec1* ont des pools de dNTP réduits (environ 40 %) (Zhao et al., 2001). Enfin, un dernier contrôle de l'activité de la RNR s'opère par la localisation de ses différentes sous-unités (Yao et al., 2003). En absence de stress réplicatif, les petites sous-unités (Rnr2-Rnr4) sont nucléaires alors que la grande sous-unité Rnr1 est cytoplasmique. Les petites sous-unités sont importées dans le noyau par Dif1, ou elles sont séquestrées par un ancrage à Wtm1. En réponse aux dommages, la dégradation de Dif1 par Dun1 libère les petites sous-unités qui se relocalisent dans le cytoplasme pour former un complexe RNR actif (Lee et al., 2008; Wu and Huang, 2008). Une régulation équivalente existe aussi chez *S. pombe*, et suggère que ces mécanismes sont conservés chez les eucaryotes (Hakansson et al., 2006a; Nestoras et al., 2010) (voir (Niida et al., 2010b) pour revue). Ces résultats suggèrent que la DDR joue un rôle important dans le maintien des pools de nucléotides, même en absence de stress exogène.

2. Mutants de DDR et « pools » de dNTP chez *S. cerevisiae*.

Deux études récentes montrent que les mutants pour des facteurs de DDR chez *S. cerevisiae* présentent un haut niveau d'instabilité chromosomique et des « pools » de dNTP élevés (Davidson et al., 2012; Poli et al., 2012). La RNR est surexprimée dans ces mutants, par le mécanisme décrit ci-dessus, en réponse aux dommages que subissent ces cellules de manière chronique. Cette surexpression conduit à une production de dNTP plus importante et une augmentation de la vitesse de progression des fourches comparée à celle des cellules sauvages. Cette dernière observation suggère que les « pools » sont limitants dans les souches sauvages. La surexpression de la RNR1 ou la délétion de *SML1* dans des souches sauvages conduit aussi à l'augmentation de la vitesse de progression des fourches. Ces résultats confirment que la disponibilité en précurseurs limite la progression des fourches dans les cellules sauvages. De plus, l'approvisionnement en dNTP étant stimulé dans les mutants pour des facteurs de la DDR, ces cellules sont résistantes au stress réplicatif imposé par un traitement au HU. En contre partie, l'augmentation de la taille des « pools » de dNTP, ou leur déséquilibre, s'accompagne d'un taux de mutation élevé dans ces souches mutantes.

3. Régulation de la RNR par la DDR chez les mammifères.

Chez les mammifères, la taille du pool de nucléotides n'augmente pas en réponse aux dommages à l'ADN (Hakansson et al., 2006b). Cependant, il est bien établi que les gènes codant les sous unités de la RNR sont régulés au niveau transcriptionnel en réponse aux

dommages. Le cas le plus connu concerne le gène codant la petite sous-unité p53R2, dont la transcription augmente sous contrôle de la voie p53 (Tanaka et al., 2000). Il a également été montré que le niveau d'ARN messagers codants les sous-unités R1 et R2 augmente après traitement à la camptothécine (CPT), un inhibiteur de Topo1. Cet effet dépend des kinases ATR et Chk1 (Zhang et al., 2009b). Ce résultat est en bon accord avec ceux de travaux plus anciens montrant que le gène codant la sous-unité R2 est induit après irradiation UV ou traitement HU, et que ce phénomène est atténué par traitement à l'UCN-01 (inhibiteur de Chk1) ou à la caféine (inhibiteur des kinases ATM/ATR) (Lubelsky et al., 2005). De façon frappante, l'accumulation de la sous-unité R2 est plus importante dans des cellules déficientes pour p53 (Chen et al., 2010). L'activation du gène codant p53R2 semble donc favorisée dans des cellules ayant une voie p53 fonctionnelle, mais celui qui code la sous-unité R2 peut aussi être mobilisé, surtout lorsque la voie p53 est inactive. Un homologue humain de Crt1 (Rfx1) a été identifié, qui pourrait moduler l'activité du promoteur codant la sous-unité R2 de la RNR, mais sa relation avec la DDR n'est pas vraiment comprise (Lubelsky et al., 2005).

L'activation de la DDR contribue aussi à la stabilisation de certaines sous unités de la RNR. Notamment, la p53R2 est stabilisée après phosphorylation par ATM (Chang et al., 2008b). Un système de stabilisation de la sous-unité R2 a aussi été récemment découvert, qui intervient dans la réponse aux dommages à l'ADN (D'Angiolella et al., 2012).

Plusieurs groupes ont analysé la localisation subcellulaire de la RNR, malgré certaines incohérences entre les données publiées, il est probable que l'enzyme soit importée dans le noyau en réponse aux dommages. Certains groupes ont montré qu'après traitement à la CPT, la sous-unité R2 est importée dans le noyau et que son ancrage à la chromatine augmente (D'Angiolella et al., 2012; Zhang et al., 2009b). Au contraire, d'autres groupes montrent un import spécifique de p53R2 après induction de dommages (principalement après irradiation γ et UV) (Tanaka et al., 2000; Xue et al., 2003; Yamaguchi et al., 2001). Récemment, il a été montré que les sous-unités R1 et R2 se localisent aux sites de dommages à l'ADN (foyers γ H2AX), quelques minutes après irradiation UV ou γ (Hu et al., 2012; Niida et al., 2010a). Cette relocalisation dépend de Tip60, une histone acétyltransférase classiquement recrutée lors de la DDR. La relocalisation d'une partie de la RNR aux foyers de dommages pourrait fournir localement les dNTP nécessaires à la réparation. De telles différences entre les données des différents groupes proviennent sans doute des cellules utilisées, puisque certaines lignées, surtout si elles ont une origine tumorale, possèdent une voie p53 non-fonctionnelle, et ne peuvent donc pas signaler sur la p53R2 en réponse aux dommages (Chen et al., 2010). De plus, les doses et les agents génotoxiques

utilisés sont variés, ainsi les lésions induites ne sont sans doute pas signalées par les mêmes branches de la DDR. Enfin, la RNR permet de synthétiser les dNDP, la relocalisation de la RNR dans le noyau ou localement aux sites de dommage ne suffit pas à la production de dNTP sans une dernière étape de phosphorylation qui est prise en charge par la NDPK. Après l'induction de dommages (UV, cisplatine, H₂O₂), l'import de NDK1 (« nucleoside diphosphate kinase 1 ») a été observé dans des cellules humaines en culture (Yoon et al., 2005).

4. Régulation d'autres acteurs de la biosynthèse des précurseurs par la DDR chez les mammifères.

En plus de la RNR, d'autres enzymes de la voie de biosynthèse des nucléotides, telle que la thymidine kinase 1 (TK1), sont induites en réponse aux dommages et participent à approvisionner la machinerie de réparation en précurseurs. L'induction de TK1 est plus importante dans des cellules p53^{-/-}, et son accumulation dépend de p21 et de la progression dans le cycle cellulaire (Chen et al., 2010). Il a aussi été observé que la thymidilate synthase (TS), et la dihydrofolate réductase (DHFR) sont induites après irradiation γ (Batra et al., 2004).

5. Conclusion

Puisque le niveau des pools n'augmente pas après activation de la DDR, l'ensemble de ces observations suggère que l'efficacité du mécanisme de réparation est assurée par un approvisionnement local de la machinerie de réparation en dNTP, dans le noyau ou directement au niveau des sites endommagés. De plus, le niveau de la RNR ou celui des « pools » détermine la survie après induction de dommages et pourrait intervenir dans le choix du mode de réparation (Burkhalter et al., 2009). En effet il a été montré que des traitements au HU inhibent la HR, alors que la surexpression de p53R2 la favorise.

Résultats et discussion

Les résultats sont présentés sous forme de publications, un résumé du contexte et des résultats est donné pour chaque manuscrit (les articles sont placés en parties 2 à 4 des annexes). Le projet principal que j'ai développé au cours de ma thèse constitue une première partie des résultats. Puis deux autres projets auxquels j'ai collaboré sont présentés. Ces trois histoires se recoupent partiellement car les questions posées sont liées et les réponses que nous apportons peuvent souvent s'étendre au delà de chacun des projets. Je souhaite donc mettre en perspective ce que nous apprenons de l'ensemble de ces études, ainsi que les questions qui en émergent et qui n'ont pas encore trouvé de réponse à l'heure où j'écris ces lignes. Le détail des résultats est contenu dans les manuscrits, néanmoins, quelques résultats supplémentaires seront fournis pour élargir la discussion.

Liste des publications

#1 - Chk1 and Rad51 deficiency perturbs replication dynamics via DDR-mediated modulation of dNTP pools

Hervé Técher, Therese Wilhelm*, Sandra Carignon*, Gaël A. Millot, Bernard S. Lopez, Olivier Brison and Michelle Debatisse

*These authors contributed equally

Publication soumise

#2 - Spontaneous mitotic defects in homologous recombination-deficient cells result from slow replication fork velocity

Therese Wilhelm, Aurélia Barascu, Indiana Magdalou, Hervé Técher, Michelle Debatisse and Bernard S. Lopez

Publication soumise

#3 - Stepwise activation of DNA-damage checkpoint upon increasing replication stress : impact on common fragile site integrity

Stéphane Koundrioukoff, Sandra Carignon*, Hervé Técher*, Anne Letessier, Olivier Brison and Michelle Debatisse

*These authors contributed equally to the work

Publication soumise

1. La déficience pour Chk1 ou Rad51 perturbe la dynamique de réplication *via* une modulation de la disponibilité en dNTP dépendante de la DDR (Publication #1)

A. Contexte

Comme décrit en détail dans la partie 3.C de l'introduction, les déficiences pour certains facteurs de la réponse aux dommages de l'ADN (DDR) perturbent la dynamique de réplication dans des cellules de métazoaires. Ainsi, l'inactivation d'ATR, Chk1, Claspin, Wee1, Rad51, BRCA2, entraînent le ralentissement des fourches de réplication et l'activation d'origines surnuméraires (dites latentes) (Conti et al., 2007b; Daboussi et al., 2008) (Marheineke and Hyrien, 2004; Petermann et al., 2008; Petermann et al., 2010; Scora et al., 2008; Scora and McGowan, 2009; Wilsker et al., 2008). Le mécanisme pouvant expliquer de telles observations reste inconnu. Néanmoins, la similitude entre les phénotypes associés à ces déficiences suggère qu'un mécanisme commun pourrait contrôler la dynamique de réplication, dans les différents contextes génétiques.

Parmi ces différentes protéines le rôle de Chk1 sur la dynamique de réplication a été abondamment étudié (Nakanishi et al., 2010; Petermann et al., 2010; Syljuasen et al., 2005). Les résultats suggèrent que le rôle premier de Chk1 est de réprimer le déclenchement des origines latentes, comme le fait son homologue fonctionnel Rad53p chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* (Santocanale and Diffley, 1998; Zegerman and Diffley, 2010). L'augmentation du nombre d'origines de réplication activées en absence de Chk1 entraînerait une surconsommation de certains facteurs limitants, jusqu'à présent non identifiés, aboutissant au ralentissement des fourches (Petermann et al., 2010) (§ 3.C.3 de l'introduction).

Une autre hypothèse est suggérée par les travaux précédents du laboratoire qui ont montré que l'activation des origines latentes dépend de la vitesse de progression des fourches, qui

elle-même dépend de la taille des pools de précurseurs (Anglana et al., 2003) (Courbet et al., 2008). Bien qu'étant notre mécanisme de prédilection, cette hypothèse soulève trois questions. Ce mécanisme de compensation (§ 2.D.3 à 5 de l'introduction) n'ayant été étudié que dans des cellules possédant une kinase Chk1 fonctionnelle, on peut se demander s'il est actif dans le contexte d'une inactivation de Chk1 ? Si l'on admet que le mécanisme de compensation est mis en jeu dans des cellules déficientes pour Chk1, quel est le mécanisme conduisant au ralentissement des fourches ? Et enfin, est-ce que le mécanisme qui impacte la dynamique de réplication dans des cellules déficientes pour Chk1 est le même que celui lié aux déficiences pour d'autres facteurs de la DDR ?

Chez les mammifères, la DDR régule la transcription, la stabilité et la localisation des différentes sous-unités de la RNR (§ 3.D.3 de l'introduction). Cependant, la taille globale des pools de dNTP n'augmente pas en réponse aux dommages à l'ADN. Divers travaux suggèrent qu'un approvisionnement local de la machinerie de réparation en dNTP, dans le noyau ou à proximité des sites endommagés, assure une réparation efficace (voir (Niida et al., 2010b) pour revue). Il a été par ailleurs montré que l'absence de Chk1, ou d'autres facteurs de la DDR, provoque l'accumulation de dommages à l'ADN et que les voies de signalisation ATM/Chk2 et p53 sont activées en réponse à ces dommages (Forment et al., 2011; Niida et al., 2005; Syljuasen et al., 2005). L'ensemble de ces données nous a conduit à formuler l'hypothèse suivante : la réponse aux dommages à l'ADN, qui survient en l'absence de Chk1 ou d'autres facteurs de la DDR, pourrait moduler l'activité et la localisation de la RNR. Ces processus perturberaient ainsi l'approvisionnement local en dNTP, favorisant la réparation au détriment de la réplication. Cette redistribution conduirait à un ralentissement des fourches et à l'activation d'origines latentes, deux propriétés qui pourraient faciliter la réplication des matrices endommagées.

B. Résultats et discussion

B-1 *La vitesse des fourches de réplication détermine la densité d'événements d'initiation, indépendamment de Chk1.*

Nous montrons que le ralentissement des fourches de réplication observé en absence de Chk1 est supprimé par addition de précurseurs dans le milieu de culture, identifiant les dNTP comme le facteur limitant la progression des fourches dans ce contexte génétique. Néanmoins, la taille globale des pools de dNTP n'est affectée ni par la déplétion de Chk1 ni par traitement avec des doses d'HU qui conduisent à un ralentissement des fourches comparable à celui provoqué par la déplétion de Chk1. Ces résultats suggèrent que la disponibilité en dNTP est affectée de façon locale.

Nous avons exploité cette possibilité de restaurer la vitesse des fourches dans les cellules déficientes pour Chk1 pour comprendre la relation entre vitesse et densité des origines actives. Nous trouvons que la restauration de la vitesse s'accompagne d'une restauration de la DIO, qui redevient équivalente à celle mesurée dans des cellules contrôles. Ces résultats montrent donc que c'est la vitesse des fourches qui régule l'espacement entre les origines actives, indépendamment du statut de Chk1. Nous obtenons un résultat similaire en mesurant la densité de fourches, montrant ainsi que l'effet n'est pas limité aux « clusters » d'origines. Ces résultats excluent l'hypothèse selon laquelle Chk1 réprimerait activement les origines latentes chez les mammifères. Cependant, certains résultats d'un autre groupe restaient en contradiction apparente avec cette conclusion. En effet, l'inhibition des Cdk ou la déplétion de Cdc7, utilisés comme moyen de limiter le déclenchement des origines, permet de supprimer le ralentissement des fourches dans des cellules déplétées pour Chk1 (Petermann et al., 2010). Nous proposons que cette restauration de vitesse est due au fait que la réduction du nombre d'origines actives permet d'économiser des dNTP dans des cellules où leur approvisionnement est compromis. L'ensemble de ces résultats montre que Chk1 stimule la progression des fourches par un mécanisme contrôlant l'approvisionnement en nucléotides. En retour, la vitesse de progression des fourches détermine la densité en événements d'initiation.

B-2 La réponse aux dommages à l'ADN, par la surexpression de p53R2, entraîne le ralentissement des fourches de réplication dans des cellules déficientes pour Chk1 ou Rad51.

Comme d'autres laboratoires, nous montrons ici que l'absence de Chk1 induit des dommages à l'ADN (Forment et al., 2011; Niida et al., 2005; Syljuasen et al., 2005), visualisés par la phosphorylation de l'histone H2AX et de p53. En bon accord avec cette activation de p53, nous montrons, que la transcription de la p53R2 est stimulée dans les cellules déplétées pour Chk1, alors que ni celle de la R1, ni celle de la R2 n'est affectée. Le résultat clé de cette partie du travail est que la co-déplétion de Chk1 et p53R2 permet de supprimer le ralentissement des fourches de réplication observé dans des cellules déplétées pour Chk1, alors que la déplétion de p53R2 seule n'a aucun effet. Nous mettons ainsi en évidence une interférence entre DDR et vitesse de progression des fourches. De plus, ces résultats suggèrent que le défaut d'approvisionnement en précurseurs responsable du ralentissement des fourches résulte de la relocalisation de la RNR, médiée par la surexpression de la p53R2. En faveur de cette conclusion, nous montrons qu'en absence de Chk1 la fraction de la p53R2 et de la R1 associée à la chromatine augmente. L'ensemble de ces phénomènes dépend des dommages, mais pas du statut de Chk1, puisque tous ces

résultats ont été reproduits dans des cellules dépourvues d'activité Rad51 (voir [figure 12](#) résumant les résultats). Ce mécanisme pourrait expliquer le ralentissement des fourches de réplication observé dans de nombreux mutants déficients pour des facteurs de la DDR, ceci à condition que ces déficiences entraînent l'apparition de dommages à l'ADN pendant la phase S et l'accumulation de p53R2.

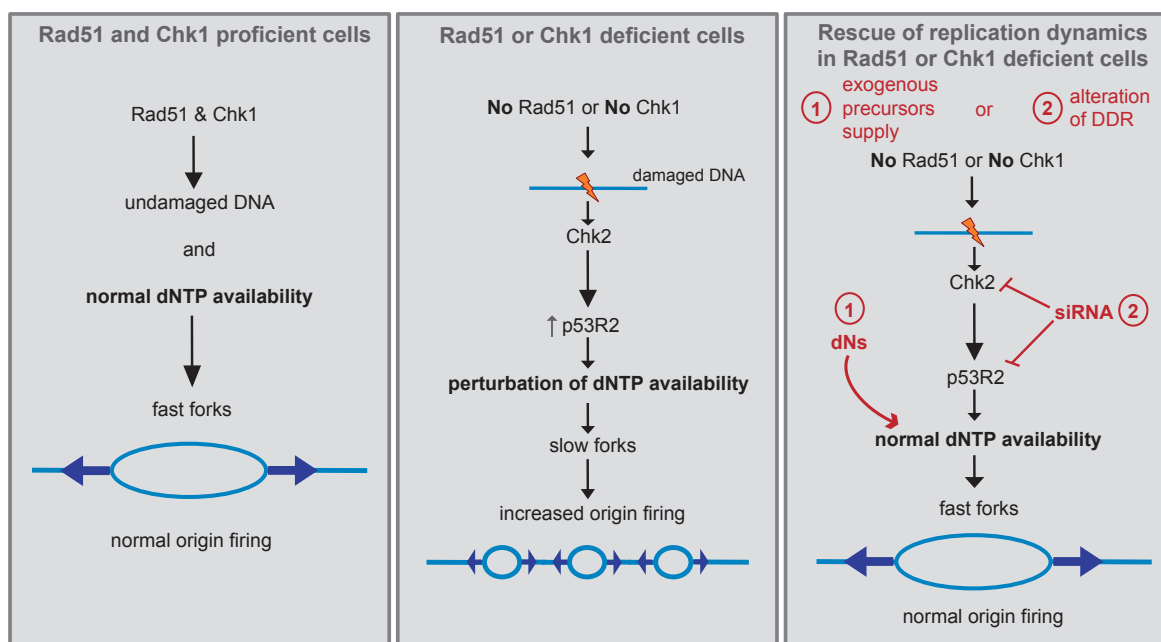


Figure 12 : Résumé des résultats de la publication #1. Cette figure illustre l'ensemble des résultats obtenus lors de cette étude (résumé graphique). Panneau de gauche : dans des cellules normales, c'est à dire possédant Rad51 et Chk1, il n'y a pas de dommages à l'ADN, la vitesse des fourches est élevée, et le niveau d'activation des origines est normal. Panneau central : l'absence de Chk1 ou Rad51 conduit à l'apparition de dommages à l'ADN, l'activation de la DDR, avec l'augmentation du niveau de p53R2, la perturbation de l'approvisionnement en nucléotides conduit au ralentissement des fourches et à l'augmentation du nombre d'origines actives par le mécanisme de compensation. Panneau de droite : le ralentissement des fourches de réplication observé dans des cellules déficientes pour Chk1 ou Rad51 peut être sauvé en restaurant l'approvisionnement normal en dNTP par (1) l'ajout de précurseurs de nucléotides ou (2) la déplétion de ATM, Chk2 ou p53R2.

C. Modèle et perspectives

Nos résultats, peuvent s'intégrer au modèle proposé par Niida et ses collègues, suggérant que la relocalisation de la RNR aux sites de réparation de l'ADN permet d'approvisionner localement la machinerie de réparation en précurseurs de l'ADN (Niida et al., 2010a). Le niveau de p53R2 étant élevé lorsque p53 est activée, l'association de p53R2 avec la sous-unité catalytique R1 est favorisée, ceci au détriment de la formation du complexe R1-R2 qui est normalement privilégiée en phase S. Nous proposons que l'activation de la DDR dans des cellules déficientes pour Chk1 ou Rad51 entraîne la relocalisation de la RNR dans les foyers de réparation au détriment des foyers de réplication (voir modèle en [figure 13](#)). En accord avec ce modèle, nous montrons que l'association de p53R2 avec la chromatine est supérieure dans des cellules JEFF déplétées pour Chk1. Mais nous n'avons pu prouver que cet enrichissement à la chromatine correspond bien aux sites de lésions.

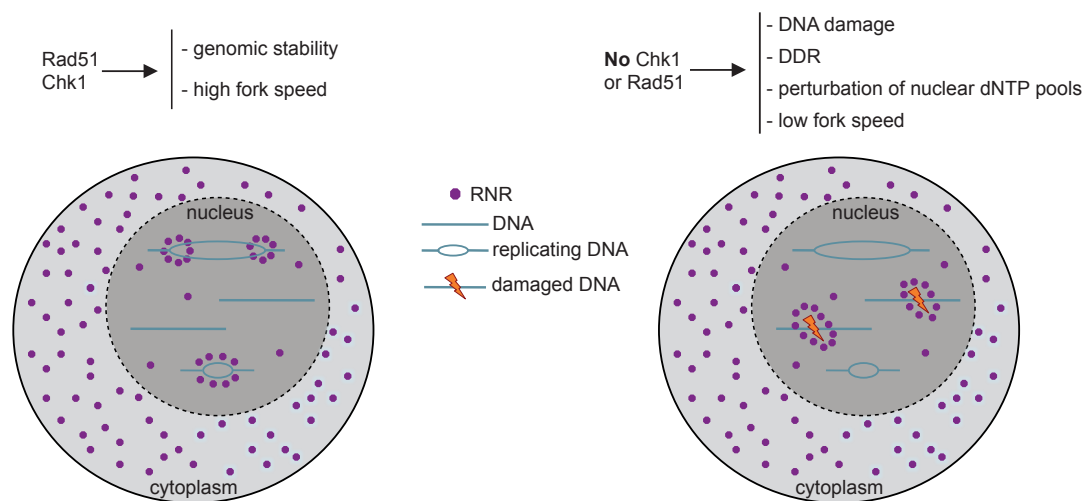


Figure 13 : Modèle de relocalisation de la RNR suite aux dommages survenant spontanément dans des cellules déficientes pour Rad51 ou Chk1. A droite : une cellule en phase S avec des chromosomes en cours de réplication. La majorité de la RNR est dans le cytoplasme, une partie est nucléaire. La partie nucléaire, en s'associant à la chromatine pourrait stimuler la progression des fourches. A gauche : l'absence de Chk1 ou Rad51 conduit à l'apparition de dommages. La RNR, sans doute majoritairement le complexe p53R2-R1, se relocalise aux sites de dommages au détriment des fourches en cours d'élongation.

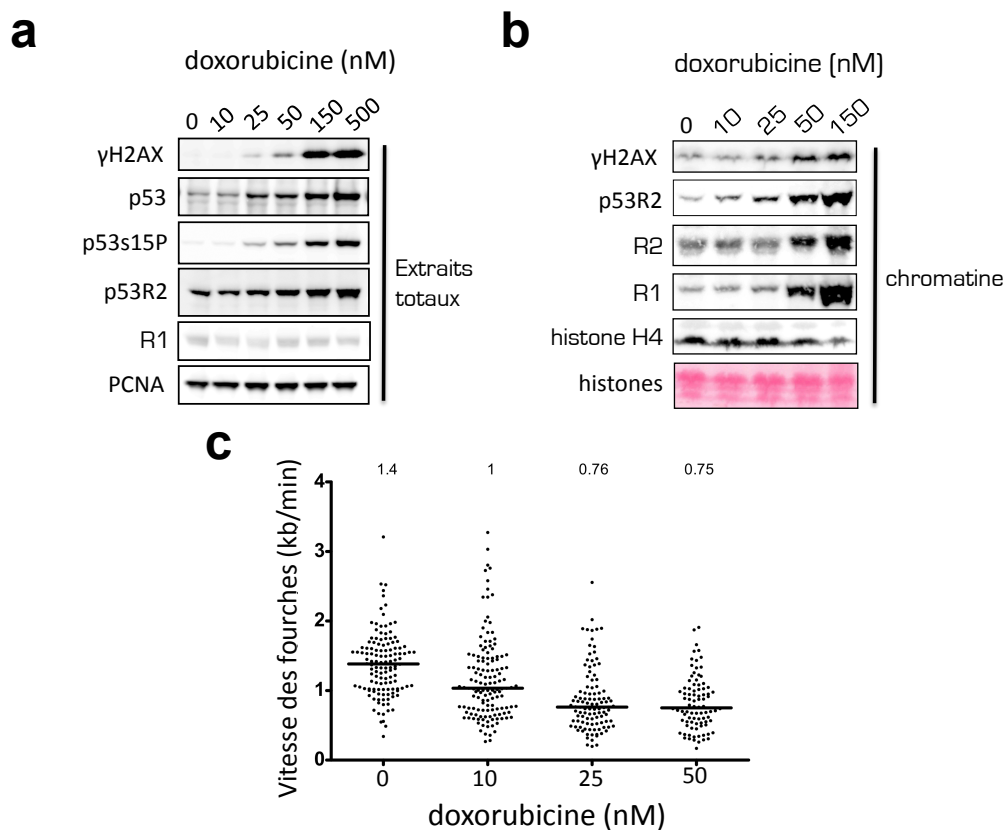


Figure 14 : Le traitement de cellules JEFF 24 heures à la doxorubicine induit l'accumulation de p53R2 et le ralentissement des fourches de réplication. (a et b) Analyse par western blot d'extraits totaux (a) et chromatiniens (b) de cellules JEFF. Les anticorps et les concentrations de doxorubicine sont indiqués. (c) Analyse de la vitesse de progression des fourches de réplication. Les distributions des vitesses sont représentées en dot-plot, chaque point représente une fourche. La médiane est représentée par la barre horizontale et est indiquée au dessus de chaque distribution.

Une prédiction du modèle est que l'induction de dommages à l'ADN en cours de phase S dans des cellules possédant une DDR fonctionnelle devrait conduire aux mêmes phénotypes que l'absence de Chk1 ou Rad51. Nous avons entrepris au laboratoire d'induire des dommages à l'ADN par des traitements à la doxorubicine, un poison de la topoisomérase 2. Ce travail a été réalisé avec l'aide de Zhang Jing, étudiante en Master 1 BMC à l'UPMC, que j'ai eu le plaisir d'encadrer. Nous montrons que des traitements à la doxorubicine provoquent un ralentissement des fourches de réplication dépendant de p53R2 (voir [figure 14 et 15](#)). L'induction de dommages entraîne aussi l'augmentation de la quantité de RNR ancrée à la chromatine (voir [figure 14](#)). Ces résultats confirment que les dommages, quelle que soit leur origine, perturbent la progression des fourches de réplication *via* la modulation des pools de

précurseurs, probablement par relocalisation de la RNR. Afin de confirmer ce modèle nous avons étudié la localisation de la RNR par immuno-fluorescence (IF). L'ensemble des expériences que nous avons réalisées ne permet pas de reproduire les données de la littérature, et ceci pour l'ensemble des sous-unités de la RNR. Nous suspectons différents problèmes techniques liés aux anticorps, à la préparation des cellules ou à la faiblesse des signaux.

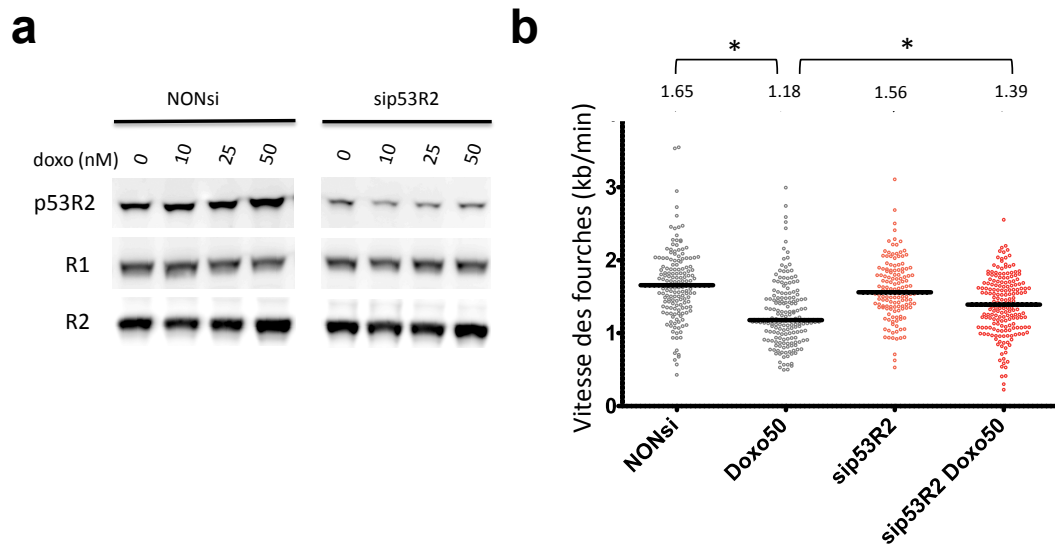


Figure 15 : La déplétion de p53R2 atténue l'effet de la doxorubicine sur la progression des fourches de réplication. (a) Analyse par western blot d'extraits totaux de cellules JEFF. Les anticorps et les concentrations de doxorubicine (doxo) sont indiqués. À noter que le sip53R2 n'affecte pas l'expression des sous-unités R1 ou R2. (b) Analyse de la vitesse de progression des fourches de réplication. Les distributions sont représentées en dot-plot, chaque point représente une fourche. La médiane est représentée par la barre noire horizontale, et est indiquée au dessus de chaque distribution. Doxo 50 : traitement à la doxorubicine à 50 nM, NONsi : cellules transfectées avec un siRNA contrôle, sip53R2 : cellules transfectées avec des siRNA ciblant p53R2. Un astérisque indique que la $p\text{-value} \leq 0,05$.

Au regard de ces difficultés techniques, il faudrait développer de nouvelles techniques pour visualiser directement les dNTP dans les cellules. En effet, même si nous parvenions à visualiser la RNR dans le noyau des cellules, au sein des foyers de réparation ou de réplication, cela ne serait toujours pas une preuve directe que la concentration en dNTP varie localement. Les grandes lignes de ce nouveau projet seront esquissées dans la partie conclusion et perspectives.

2. La recombinaison homologue protège des catastrophes mitotiques causées par un stress réplicatif endogène (Publication #2).

A. Contexte

L'étude de fibroblastes de hamster Chinois déficients pour des facteurs de la HR, comme BRCA2 ou Rad51, a révélé que de nombreuses erreurs surviennent lors de la mitose (Bertrand et al., 2003; Daboussi et al., 2005; Deng, 2002; Griffin et al., 2000; Laulier et al., 2011). Notamment, une augmentation de la fréquence de cellules présentant des centrosomes surnuméraires, des ponts anaphasiques, et des anomalies du nombre de chromosomes (aneuploïdie) a été observée. L'origine de ces défauts mitotiques est mal comprise. En effet la HR est un processus de réparation des DSB de l'ADN préférentiellement choisis lors des phases S et G2, dont le lien avec la mitose n'est pas évident (voir (Ciccia and Elledge, 2010) pour revue, et intro § 3.A.2). Cette étude a pour but de comprendre la relation entre le stress réplicatif et les défauts mitotiques, en utilisant les déficiences pour Rad51 et BRCA2 comme modèles.

B. Résultats et discussion

B-1 Le traitement de cellules contrôles par de faibles doses d'hydroxyurée mime le ralentissement des fourches et l'activation d'origines latentes observé dans des cellules déficientes pour la HR.

Les déficiences pour les facteurs de HR, tels que Rad51 ou BRCA2, s'accompagnent d'un ralentissement des fourches de réplication et d'une augmentation du nombre d'origines actives ((Daboussi et al., 2008), partie 1 des résultats). Nous montrons ici, comme dans la première partie des résultats, que le ralentissement des fourches de réplication induit par des traitements à l'HU dans des cellules possédant une HR fonctionnelle est associé à une diminution de la DIO et une augmentation de la densité de fourches de réplication. De plus, pour des doses d'HU qui produisent un ralentissement des fourches similaire à celui observé dans des cellules déficientes pour Rad51 ou BRCA2, la DIO est également du même ordre que celle observée dans des cellules déficientes pour la HR. Finalement, nous montrons que l'incorporation de BrdU ou le pourcentage de cellules en phase S n'est pas altéré dans des cellules sauvages traitées avec de telles doses d'HU ou des cellules déficientes pour Rad51 ou BRCA2. L'ensemble de ces résultats confirme que le ralentissement des fourches est compensé par l'activation d'origines latentes.

B-2 Le stress réplicatif induit par l'hydroxyurée ou les déficiences pour des facteurs de HR conduit à des problèmes mitotiques

Nous nous sommes ensuite demandé si les phénotypes mitotiques observées dans les cellules déficientes pour la HR étaient la conséquence des altérations de la dynamique de réplication décrites ci-dessus. Pour tester cette hypothèse, nous avons utilisé les faibles doses d'HU qui miment le stress réplicatif observé dans des cellules déficientes pour la HR. Nous montrons que, tout comme dans des cellules déficientes pour Rad51 ou BRCA2, le traitement avec des faibles doses d'HU conduit à l'augmentation des anomalies mitotiques. Si les cellules sont traitées avec des doses plus fortes d'HU, on observe une augmentation plus marquée de ce phénotype. Ce résultat suggère fortement que les défauts de progression des fourches de réplication et/ou l'activation d'origines latentes peuvent compromettre le bon déroulement de la mitose.

B-3 Les erreurs mitotiques sont la conséquence du ralentissement des fourches de réplication.

Nous montrons dans la première partie des résultats que le ralentissement des fourches de réplication observé dans des cellules déficientes pour Rad51 ou Chk1 est due à une carence en précurseurs de nucléotides. En effet, l'addition de précurseurs exogènes permet de supprimer le ralentissement des fourches dans de telles cellules, ainsi que de restaurer la DIO. Ici, nous confirmons ce résultat dans des cellules déficientes pour Rad51, et étendons le modèle aux cellules déficientes pour BRCA2. Le fait que nous soyons en mesure de supprimer les effets des défauts de HR sur la dynamique de réplication par addition de précurseurs dans le milieu de culture nous offre la possibilité d'étudier le devenir des phénotypes mitotiques dans de telles conditions. Nous montrons que l'ajout de précurseurs permet de supprimer l'apparition de centrosomes surnuméraires dans des cellules déficientes pour Rad51 ou BRCA2, confirmant que le ralentissement des fourches de réplication se répercute en mitose et compromet la ségrégation des chromosomes par un mécanisme qui reste à élucider.

3. Activation progressive du checkpoint des dommages à l'ADN sous stress réplicatif croissant : impact sur l'intégrité des sites fragiles communs (Publication #3).

A. Les sites fragiles communs

Les sites fragiles communs (SFC) sont des régions du génome qui présentent des cassures récurrentes sur des chromosomes en métaphase après un stress réplicatif (voir (Durkin and Glover, 2007) pour revue). Ces cassures sont couramment induites *in vitro* par traitements des cellules à l'aphidicoline, un inhibiteur des ADN polymérases répliquatives qui ralentit les fourches de réplication. Ce mode d'induction a depuis longtemps suggéré que le mécanisme d'instabilité des SFC était lié à un problème de réplication.

Une caractéristique générale de ces sites est qu'ils terminent leur réplication très tardivement en S ou G2. C'est notamment le cas pour FRA3B (El Achkar et al., 2005; Le Beau et al., 1998). Récemment, la dynamique de réplication a été étudiée par peignage moléculaire dans des cellules lymphoblastoïdes le long d'une région de 1,6 Mb contenant FRA3B. Les résultats montrent qu'une région cœur de 700 kb est pauvre en événements d'initiation. Dans des lymphocytes traités à l'aphidicoline, cette même région cœur est aussi pauvre en événements de terminaison (Letessier et al., 2011). Il a également été montré que la fragilité de ce site est dépendante de tissu et est limitée aux types cellulaires présentant ce profil de réplication (Le Tallec et al., 2011). En condition de ralentissement des fourches, la réplication du site n'est donc probablement pas achevée à l'entrée en mitose dans les cellules où il est fragile, ce qui pourrait conduire à la cassure (voir figure 16) (voir (Debatisse et al., 2012) pour revue). La DDR devrait, en principe, bloquer le passage en mitose de cellules n'ayant pas terminé leur réplication (voir (Bartek and Lukas, 2003; Branzei and Foiani, 2010; Cimprich and Cortez, 2008) pour revues) mais des résultats obtenus chez *S. cerevisiae* suggèrent que le point de contrôle ne peut détecter la présence de quelques régions non répliquées (Torres-Rosell et al., 2007). Chez les mammifères, il a été décrit que les déficiences pour ATR et Chk1 augmentent l'incidence des cassures aux SFC (Casper et al., 2004; Casper et al., 2002; Durkin et al., 2006; Ozeri-Galai et al., 2008; Ragland et al., 2009). Néanmoins le mécanisme par lequel ces kinases maintiennent la stabilité des SFC reste incompris.

Ici, nous avons traité les cellules avec des doses croissantes d'aphidicoline afin d'induire des ralentissements progressifs des fourches. Nous avons analysés en détail le statut du « checkpoint » de phase S et avons déterminé l'impact de la déplétion d'ATR et Chk1 sur la stabilité des SFC dans des cellules traitées avec cette gamme d'aphidicoline.

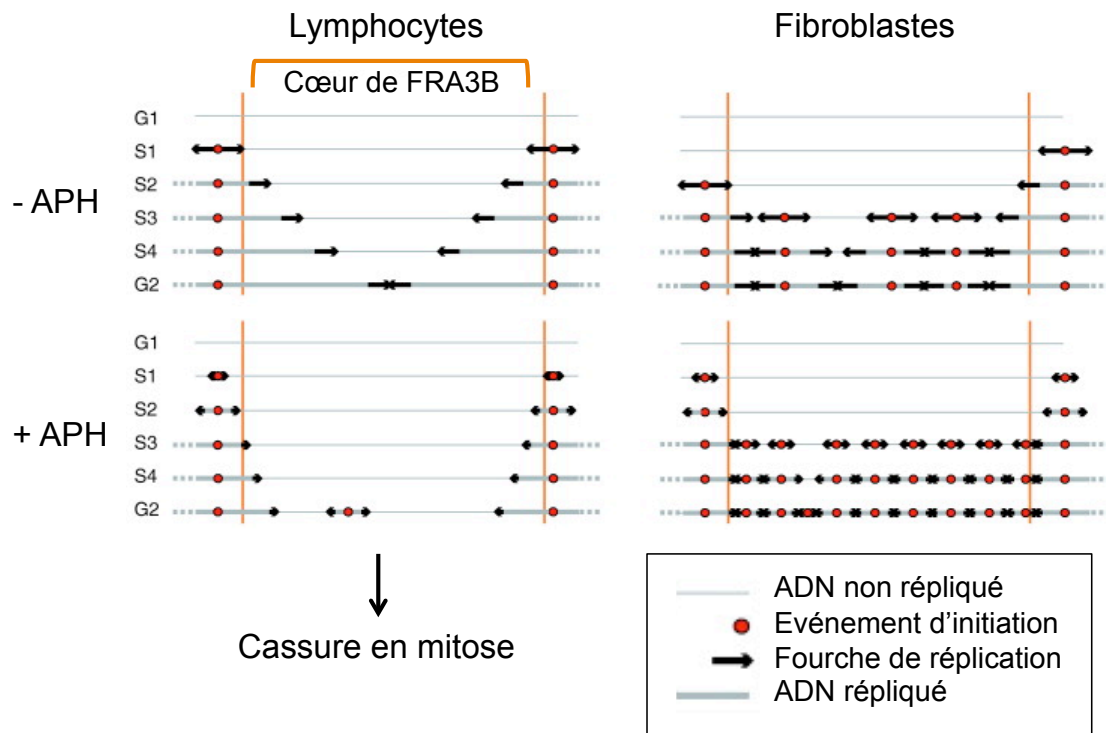


Figure 16 : Le programme de réplication détermine la fragilité de FRA3B. Chez les lymphocytes le cœur de FRA3B est pauvre en événements d'initiation. Le cœur est donc répliqué par les fourches provenant des origines situées de part et d'autre du cœur. Le ralentissement des fourches de réplication imposé par un traitement à l'aphidicoline (APH) empêche la complétion, le site casse en entrant en mitose. Chez les fibroblastes FRA3B possède une densité d'événements d'initiation normale qui permet la complétion de la réplication du site, qui n'est pas fragile. Figure adaptée de Debatisse 2012.

B. Résultats et discussion

B-1 *Des ralentissements de fourches modérés ne suffisent pas à activer toute la cascade du « checkpoint » de phase S.*

Nous avons utilisé des concentrations modérées d'aphidicoline, qui induisent un ralentissement des fourches allant de 2 fois (1 kb/min) à presque dix fois (0,2 kb/min) comparé au contrôle (1,8 kb/min). A fortes doses, les fourches ne sont pas totalement bloquées mais progressent dramatiquement lentement. Le recrutement d'ATR et de RPA à

la chromatine commence dès que la réduction de vitesse atteint un facteur deux et son niveau reste constant aux fortes doses. Les mêmes résultats ont été obtenus pour un ensemble de protéines du « checkpoint » de phase S (Claspine, ATR, TopBP1, Rad17, Rad9). Étonnamment, le recrutement de ces protéines ne corrèle pas avec la quantité d'ADNsb puisque, comparé à des cellules traitées avec de fortes doses, nous n'observons que peu de RPA à la chromatine et pas de foyers d'ADNsb dans les cellules traitées à doses modérées. De plus, nous ne détectons pas de phosphorylation de Chk1 à des doses d'aphidicoline ou d'HU provoquant des ralentissements de fourche allant jusqu'à un facteur dix bien que la voie soit fonctionnelle puisque la phosphorylation de Chk1 sur les sérine 317 et 345, et celle de H2AX sur la sérine 139 sont évidentes à 1 mM d'HU (réduction de vitesse de 100 fois) (voir [figure 17](#)). Ces résultats indiquent que l'activation du « checkpoint » se fait par paliers : des réductions de vitesse des fourches de 2 à 10 fois permettent le recrutement des senseurs, transducteurs et médiateurs à la chromatine sans toutefois activer les effecteurs. Ces recrutements pourraient être un moyen de stabiliser les fourches de réplication tout en permettant aux cellules de progresser dans le cycle. Les réductions de vitesse beaucoup plus importantes activent l'ensemble de la voie et bloquent cette progression.

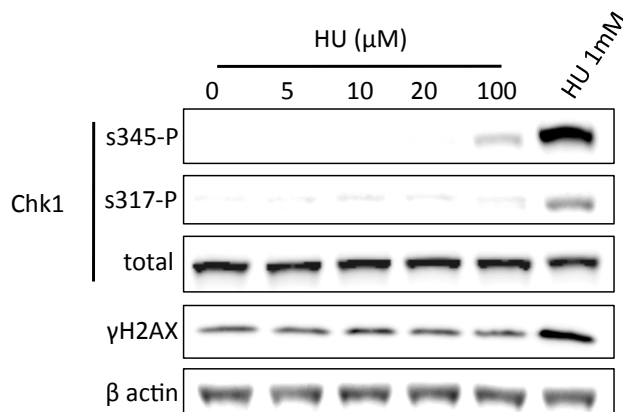


Figure 17 : L'induction d'un ralentissement des fourches modéré par un traitement au HU n'entraîne pas la phosphorylation de Chk1 dans des cellules JEFF. Analyse de l'activation de Chk1 par western-blot d'extraits totaux de cellules JEFF traitées 6 heures aux concentrations d'HU indiquées sur la figure. Les anticorps sont indiqués sur la figure. Le marquage de l'actin est utilisé comme un contrôle de dépôt. Pour indication, la vitesse des fourches est réduite par un facteur 5 sous 100 μM d'HU.

Les doses modérées d'aphidicoline utilisées ici induisent efficacement des cassures aux SFC. Il semble donc que les cellules ne répondent pas à la persistance de quelques régions non répliquées (comme les SFC) et franchissent la transition G2/M, cette tolérance étant la source des cassures mitotiques.

B-2 ATR, mais pas Chk1, stabilise les sites fragiles communs.

Il avait été décrit qu'ATR et Chk1 stabilisent les SFC (Casper et al., 2004; Casper et al., 2002; Durkin et al., 2006; Ozeri-Galai et al., 2008; Ragland et al., 2009). Nous montrons ici, que la fréquence des cassures chromosomiques totales et de celles survenant spécifiquement à FRA3B est directement corrélée au degré de ralentissement des fourches. Comme décrit précédemment, une déficience pour ATR ou Chk1 conduit à un ralentissement des fourches de 30% par rapport au contrôle. Comme attendu, ce ralentissement s'additionne à l'effet de l'aphidicoline. Nous montrons ici que l'absence de Chk1 potentialise l'apparition des cassures exclusivement par cet effet additionnel sur le ralentissement des fourches. ATR au contraire joue un rôle majeur dans la stabilisation des SFC, indépendant de son effet sur la vitesse des fourches. La protection exercée par ATR aux sites fragiles s'exerce très précisément à partir du seuil de vitesse qui induit le recrutement d'ATR à la chromatine (réduction d'un facteur deux). De plus, nous montrons que l'absence d'ATR couplée à un traitement avec des doses modérées d'aphidicoline conduit à l'apparition de nombreux foyers d'ADNsb. L'analyse de ces foyers d'ADNsb par FISH nous révèle qu'ils sont enrichis en séquences dont la réplication est tardive, et de manière encore plus prononcée, en séquences correspondant au cœur des SFC. Ces foyers d'ADNsb ne co-localisent pas avec PCNA, suggérant que l'ADNsb est associé à des fourches de réplication effondrées. En accord avec ce résultat, l'asymétrie des fourches, qui permet d'estimer le blocage des fourches de réplication, augmente dans les cellules déplétées pour ATR et traitées par des doses modérées d'aphidicoline. Les SFC comportant une large région cœur répliquant tardivement et dépourvue d'origine, le blocage puis l'effondrement des fourches émanant des régions flanquant ce cœur compromet irrémédiablement la terminaison de leur réplication et explique bien l'augmentation marquée du nombre de cassures observées aux SFC en absence d'ATR.

Conclusion et perspectives

Finale­ment au cours de ma thèse, j'ai appris que plus nous obtenons de résultats, et plus nous nous posons de questions. Une première série d'expériences permet d'esquisser un ou plusieurs modèles, ce qui suscite de nombreuses nouvelles questions, notamment sur la façon dont nous pourrions tester ces modèles. C'est un cheminement incertain, hasardeux, au cœur de notre quotidien. Voici quelques une de ces interrogations.

1. Quelles sont les origines recrutées par le mécanisme de compensation ?

Comme nous l'avons vu dans l'introduction et la partie résultats, le ralentissement des fourches de réplication s'accompagne toujours d'une augmentation de la densité d'origines actives (Anglana et al., 2003; Courbet et al., 2008; Taylor, 1977). Ce mécanisme, dit de compensation, permet de maintenir la durée de la phase S lorsque la progression des fourches est modérément perturbée. Les résultats sont principalement issus d'études globales de fibres d'ADN, qui ne permettent pas identifier la nature ou la localisation génomique des origines ainsi recrutées.

Nous savons par exemple que l'HU augmente la densité de fourches et diminue la distance inter-origines (voir parties 1 et 2 des résultats), mais il se peut que cet effet concerne seulement certaines catégories d'origines ou régions génomiques. En accord avec cette hypothèse il a été observé que des traitements au HU entraînent la diminution du nombre de foyers de réplication mais que chaque foyer contient plus de fourches actives (Ge and Blow, 2010), suggérant que la compensation se limite à certains domaines chromosomiques. Il serait donc intéressant d'identifier les origines recrutées à différentes doses d'HU par la technique des brins naissants ou de « bubble-trap » (ces techniques sont présentées en partie 1.A.c et 1.A.d des annexes). Cette analyse permettrait de cartographier les origines impliquées dans le processus de compensation.

Il est aussi important de distinguer les ralentissements forts et faibles des fourches de réplication, dont les conséquences ne sont pas forcément équivalentes. Nous avons montré que, grâce au mécanisme de compensation, le cycle cellulaire n'est pas affecté lorsque la progression des fourches est modérément perturbée, comme à faibles doses d'HU ou d'aphidicoline (parties 1, 2 et 3 des résultats). Au contraire, les forts ralentissements des

fourches, obtenus par exemple à fortes doses d'HU, entraînent l'activation du « checkpoint » et un retard en phase S. Afin de mieux caractériser le mécanisme de compensation, il serait intéressant d'étudier les profils de « timing » à l'échelle du génome sur des cellules subissant des perturbations fortes de la progression des fourches de réplication. Nous pourrions aussi réaliser des expériences de peignage moléculaire sur des cellules triées à différents moments de la phase S pour déterminer si la compensation est régulée au cours du cycle. Par analogie avec le système levure, il est largement admis que Chk1 inhibe principalement les régions tardives. Nous avons montré que Chk1 n'a pas de rôle actif dans l'activation ou l'inhibition des origines au cours d'une phase S normale. Néanmoins nos expériences ont été réalisées sur des cellules asynchrones dans des conditions où le « checkpoint » n'était pas activé. Afin d'étudier l'impact du « checkpoint » sur le programme spatio-temporel d'activation des origines au cours de la compensation, nous pourrions réaliser des études de « timing » et de cartographie des origines actives sur des cellules traitées à différentes doses d'HU et déplétées ou non des kinases du point de contrôle de phase S, notamment de Chk1.

Dans tout les cas, l'identification des origines latentes recrutées par le mécanisme de compensation, à différents niveaux de stress réplcatif, constituerait en soit un nouveau champs d'exploration. Nous pourrions par exemple déterminer s'il existe des différences entre origines actives et origines latentes (qui ont la « licence ») en étudiant la structure de la chromatine, notamment les nombreuses marques épigénétiques actuellement cartographiées au niveau du génome entier, ou la localisation nucléaire des deux types d'origines. Nous savons, que le recrutement des origines latentes survient dans les minutes qui suivent la perturbation des fourches (Courbet et al., 2008). De plus, au cycle suivant les cellules conservent la « mémoire » de ce changement de programme de réplication. La structure de la chromatine et l'ancrage des origines à la matrice nucléaire sont au cœur de cette « mémoire ». Pour compléter notre étude il serait intéressant de suivre l'évolution des marques épigénétiques et de l'ADN ancré à la matrice nucléaire au cycle précédent et au cycle suivant le changement de programme (en G1). La nature de l'origine de réplication et les mécanismes qui contrôlent son activation étant encore mal compris, un tel système expérimental serait peut être un moyen de déterminer ce qui distingue origine active et origine latente.

2. Par quels mécanismes les défauts mitotiques surviennent-ils dans des cellules déficientes pour Chk1 ?

Ici nous montrons que, dans des cellules déficientes pour Rad51 ou BRCA2, le stress réplicatif induit l'apparition de catastrophes mitotiques. Ces catastrophes mitotiques sont la conséquence d'un ralentissement modéré des fourches de réplication, comparable à celui résultant de la déplétion de Chk1. Or, de plus en plus d'études montrent que Chk1 a un rôle dans le contrôle de l'entrée en mitose et le bon déroulement de la mitose (Brooks et al., 2012; Matsuyama et al., 2011; Niida et al., 2005). L'ensemble de ces données soulève la question : est-ce que le phénotype mitotique des mutants de Chk1 s'explique, en partie ou totalement, par la réduction de la vitesse de progression des fourches ? Pour cela nous disposons de conditions expérimentales idéales, nous pouvons suivre par vidéo-microscopie le déroulement de la mitose dans des cellules déficientes pour Chk1, par déplétion ou inhibition de son activité kinase, supplémentées ou non par des précurseurs de nucléotides.

Nous établissons un lien entre les défauts dans l'exécution du programme réplicatif et du programme mitotique. Cependant, s'il est clair que les cellules déficientes pour la HR subissent un stress réplicatif chronique et des dommages à l'ADN, nous ne savons pas comment la machinerie mitotique est affectée. Comment la faible réduction de vitesse, qui de plus est compensée par l'augmentation du nombre d'origines actives, peut entraîner l'augmentation du nombre de centrosomes ou l'apparition de ponts anaphasiques ? Toutes ces questions restent encore à explorer.

3. « Channeling » ou compartimentation du pool de nucléotides ?

Il est intéressant de remarquer que les « pools » de ribonucléotides sont de 10 à 100 fois supérieurs aux « pools » de déoxyribonucléotides dans les cellules de mammifères, mais paradoxalement le taux de transcription est bien inférieur au taux de synthèse de l'ADN. Sans renouvellement permanent, les « pools » de dNTP seraient épuisés en quelques minutes après le début de la phase S (voir (Murthy and Reddy, 2006) pour revue). Les enzymes essentielles à la synthèse des dNTP, comme la RNR, étant majoritairement cytoplasmiques (Engstrom et al., 1984; Pontarin et al., 2008), il a été proposé que les dNTP synthétisés dans le cytoplasme diffusent librement et approvisionnent les machineries de réplication nucléaire et mitochondriale. Si l'on admet que les dNTP diffusent librement et occupent tout le volume cellulaire, on peut alors estimer que la concentration en dNTP est

d'environ 10 μM , une valeur cinq fois inférieure au K_m apparent ($\approx 50 \mu\text{M}$) de la réaction de polymérisation de l'ADN (Mathews et al., 1978) (voir (Murthy and Reddy, 2006) pour revue). Ces observations suggèrent que la concentration en dNTP doit être plus élevée qu'attendu, au moins localement dans les foci de réplication.

Mon travail de thèse a confirmé que les « pools » de dNTP mesurés ne correspondent pas aux « pools » réellement disponibles pour la machinerie de réplication. Cette observation a remis au goût du jour une hypothèse proposée il y a plus de 30 ans, selon laquelle les précurseurs seraient préférentiellement orientés, on parle de « channeling », vers la machinerie de réplication (Mathews and Sinha, 1982). Plusieurs groupes ont obtenu des résultats en faveur de cette hypothèse, notamment par la purification de complexes protéiques associant des enzymes de la voie de biosynthèse des dNTP et des facteurs de réplication (voir (Murthy and Reddy, 2006) pour revue). Les premières évidences suggérant l'existence de ce phénomène proviennent d'expériences réalisées chez *E. coli*. Il a été observé, après infection par le bactériophage T4, que la RNR et la TS sont associées aux fourches de réplication (Allen et al., 1980 ; Chiu et al., 1982 ; Kim et al., 2005 ; Wheeler et al., 1996). De plus, la réplication dans des bactéries *E. coli* infectées par le phage T4 est contrôlée par l'approvisionnement équilibré en dNTP, assuré par l'interaction fonctionnelle entre les enzymes de synthèse des dNTP et la machinerie de réplication (Reddy et al., 1977) (Mathews et al., 1978 ; Reddy and Mathews, 1978). Les bactéries n'étant pas subdivisées en compartiments cytoplasmique et nucléaire, cette interaction fonctionnelle est nécessairement la conséquence d'une interaction physique entre protéines. Chez les mammifères, un complexe comprenant l'ADN polymérase α , la NDPK, la TK, la TS et la RNR (R1 et R2), a été purifié à partir de cellules tumorales et de foie de rat (Baril et al., 1974). Plus tard, un complexe similaire a été purifié à partir d'extraits nucléaires de cellules CHEF en phase S. Ce complexe qui associe facteurs de réplication et enzymes de la voie de biosynthèse des précurseurs n'est pas présent dans le cytoplasme, ni dans les cellules CHEF en phase G1. Il a été nommé « réplitase » pour la première fois en 1980 (Prem veer Reddy and Pardee, 1980). L'existence du complexe « réplitase » a ensuite été confirmée à partir de diverses cellules humaines et de souris (Ayusawa et al., 1983 ; Harvey and Pearson, 1988 ; Wickremasinghe et al., 1982 ; Wickremasinghe et al., 1983). Ce méga-complexe « réplitase » permettrait d'augmenter l'efficacité des réactions séquentielles qui synthétisent les dNTP et les intègrent dans l'ADN au niveau des fourches de réplication. En effet, la juxtaposition des enzymes au sein d'un complexe limite la diffusion des métabolites intermédiaires car ceux-ci sont directement présentés à l'enzyme en charge de la réaction suivante. Ce « channeling » procurerait des substrats dont la concentration locale est optimale pour le fonctionnement de la chaîne de réactions.

Si aucune technologie n'est disponible actuellement pour mesurer la concentration locale des précurseurs issus de la synthèse endogène, il est possible de suivre le devenir de précurseurs radioactifs fournis dans le milieu de culture et métabolisés par la voie de sauvetage. Le marquage de cellules CHEF perméabilisées avec du CDP tritié montre que la radioactivité s'incorpore dans l'ADN très rapidement sans marquer le pool de dCTP (veer Reddy and Pardee, 1982). De plus l'ajout de dCTP froid ne rentre pas en compétition avec le CDP radioactif. De la même façon, dans des fibroblastes de souris, la thymidine tritiée ou la déoxyuridine tritiée s'incorpore plus rapidement dans l'ADN que dans le pool de dTTP (Nicander and Reichard, 1985). Toutefois si la synthèse de l'ADN est inhibée par un traitement à l'HU, l'incorporation de la radioactivité s'effectue au même taux dans le « pool » et dans l'ADN ce qui suggère que la RNR intervient dans le « channeling » ou qu'il existe une régulation fine entre la progression des fourches et le « channeling » des précurseurs. Dans le foie de rat, le « channeling » des précurseurs de nucléotides semble être restreint à la voie de sauvetage (Panzeter and Ringer, 1993). L'ensemble de ces résultats suggère que les précurseurs exogènes sont directement dirigés vers la machinerie de réplication, sans être stockés sous forme de « pool ». Ce phénomène de « channeling » serait une conséquence directe de l'association des enzymes de synthèse des nucléotides et de la machinerie de réplication au sein du complexe « replitase ». Malheureusement, aucune étude n'a démontré formellement l'existence d'une compartimentation des précurseurs de l'ADN au sein du volume cellulaire, alors que la localisation préférentielle de la RNR dans le cytoplasme est un argument fort contre l'existence d'une telle compartimentation.

Cependant, des travaux récents sont venus étayer l'hypothèse du « channeling » dans le contexte de la réparation. Il a en effet été découvert que la RNR et la TMPK sont recrutées au niveau des foyers γ H2AX (Hu et al., 2012; Niida et al., 2010). La relocalisation de la RNR dépend de Tip60, une histone acétyl-transférase recrutée au foyer de réparation lors de la DDR. Cette association physique entre enzymes de synthèse des nucléotides et machinerie de réparation permettrait de fournir localement une concentration optimale en dNTP pour réparer les cassures de l'ADN, une condition essentielle en phase G1 lorsque le niveau des « pool » de dNTP est minimal. Ainsi en plus de la réplication, la réparation de l'ADN pourrait aussi être le lieu d'un « channeling » et d'une compartimentation du « pool » de nucléotides. De plus, un complexe protéique nommé « purinosome », a été récemment identifié dans des cellules Hela (An et al., 2008). Ce complexe permet le « channeling » et la compartimentation de la voie de synthèse *de novo* des purines dans le cytoplasme. Même si ce complexe n'est pas directement lié à la synthèse de l'ADN, son existence montre que ce phénomène de « channeling » intervient dans la biosynthèse des nucléotides.

Il serait intéressant de développer les outils permettant de visualiser dans les cellules de mammifères vivantes l'organisation spatiale des « pools » de dNTP. Des méthodes basées sur des bio-senseur et du FRET (« Förster/Fluorescence Resonance Energy Transfer ») permettent de visualiser la localisation et d'estimer la concentration relative des nucléotides monophosphate cycliques, tels l'AMPc et le GMPc qui servent de second messenger dans de nombreuses voies de signalisation (Nikolaev et al., 2006 ; Nikolaev et al., 2010 ; Shelly et al., 2010; Willoughby and Cooper, 2008). Le concept à la base de cette méthodologie est relativement simple, il consiste à insérer un domaine de liaison spécifique au nucléotide que l'on veut tracer entre deux protéines fluorescentes (CFP : « cyan fluorescent protein » et YFP : « yellow fluorescent protein »). Lorsque le domaine change de conformation sous l'effet de la liaison avec la molécule qu'il reconnaît, il émet un signal de FRET dépendant de la concentration locale en nucléotides. La difficulté de cette méthodologie consiste à trouver un domaine peptidique dont l'interaction avec le nucléotide que l'on veut suivre est spécifique, et dont l'interaction domaine-nucléotide entraîne un changement de conformation capable d'activer le signal de FRET. Afin de prédire les changements de conformation, il est préférable de connaître la structure du domaine protéique que l'on veut utiliser. Enfin, il faut que le bio-senseur soit exprimé de manière homogène dans la cellule sans interférer avec la viabilité ou la physiologie de la cellule. Ceci semble être une contrainte majeure puisque le bio-senseur va entrer en compétition avec les autres molécules qui interagissent naturellement avec le nucléotide que l'on désire tracer. Il est donc préférable de choisir un domaine peptidique dont l'interaction avec le nucléotide à tracer est transitoire. Pour réaliser un tel projet dans des cellules de mammifères, il faudrait tirer profit de domaines protéiques capables de fixer spécifiquement les dNTP, comme le domaine catalytique de la dNTP triphosphohydrolase de *Thermus thermophilus* (Tt-dNTPase). Il faudrait bien entendu construire un bio-senseur n'ayant pas la capacité d'hydrolyser les dNTP pour ne pas perturber l'équilibre du « pool » de dNTP.

Très récemment, une méthodologie alternative a été développée pour détecter les petites molécules dans des cellules vivantes. Cette technique, toujours à base de fluorescence, consiste à développer des ARN capable de reconnaître spécifiquement une petite molécule, la reconnaissance de la petite molécule permettant de stabiliser un fluorochrome associé à l'ARN, dont la fluorescence peut être mesurée (Paige et al., 2012). Cette méthodologie a été testée pour reconnaître le GTP et l'ADP dans des bactéries, et pourrait s'adapter pour la visualisation des dNTP puisque ces molécules ARN senseurs peuvent être dessinées à façon. Si de telles méthodologies étaient disponibles, il serait enfin possible de tester

directement l'hypothèse de compartimentation des dNTP, qui n'a pas trouvé de réponse satisfaisante depuis plus de 30 ans.

4. ATR intervient-elle dans le « channeling » ?

Dans la première et deuxième partie des résultats nous montrons que l'apparition de dommages à l'ADN dans des cellules déficientes pour les facteurs de la DDR, tels que Chk1, BRCA2, et Rad51, conduit au ralentissement des fourches par un mécanisme perturbant la disponibilité en dNTP. Nous montrons aussi, en accord avec d'autres groupes ([Speroni et al., 2012](#)), que la déplétion d'ATR conduit aussi au ralentissement des fourches (troisième partie des résultats). Cependant, nous n'observons pas de phosphorylation de H2AX ni de p53 après déplétion d'ATR dans des cellules de mammifères ([figure 18](#)). Ces résultats indiquent que la déplétion d'ATR n'induit pas de dommages à l'ADN en absence de stress répliatif exogène (voir § 3.B.1 de l'introduction). Le niveau de déplétion d'ATR atteint dans notre système cellulaire n'est pas optimal et se rapproche sans doute de conditions d'haploinsuffisance (comme dans le syndrome de Seckel). Des déplétions d'ATR plus poussées et suivies à plus long terme conduiraient peut être à l'apparition de dommages. Néanmoins, dans ces conditions, la déplétion d'ATR induit un ralentissement des fourches qui n'est pas supprimé par l'addition de précurseurs dans le milieu de culture ([figure 18](#)). Bien que préliminaires, ces résultats suggèrent que le ralentissement des fourches observé après déplétion partielle d'ATR ne dépend ni de la DDR, ni d'une carence en nucléotides. Le mécanisme de ralentissement de fourche décrit dans des cellules déficientes pour Chk1 ou Rad51 semble à exclure pour la déficience d'ATR. Il existerait donc un mécanisme alternatif de ralentissement des fourches en absence d'ATR.

Pour mieux cerner le rôle d'ATR dans la dynamique de réplication, nous pourrions compléter nos analyses de peignage moléculaire en étudiant le redémarrage des fourches après divers stress, la fréquence précise des événements d'initiation et de terminaison, la densité des fourches, la DIO. Surtout, les résultats décrits dans le § précédent pourraient s'expliquer dans le cadre du processus de « channeling » des précurseurs de nucléotides. ATR pourrait stimuler la progression des fourches de réplication en favorisant l'interaction physique et fonctionnelle entre les enzymes de synthèse des dNTP et la machinerie de réplication. En absence d'ATR, le dysfonctionnement du « channeling » entraînerait un défaut local d'approvisionnement en précurseurs et le ralentissement des fourches. Dans cette hypothèse, conformément à nos observations préliminaires, l'addition de précurseurs

exogènes n'a pas d'effet sur la progression des fourches car ils ne peuvent être acheminés efficacement vers la machinerie de réplication. Pour tester un éventuel rôle d'ATR dans le « channeling » des nucléotides, nous pourrions réaliser des expériences de marquage du « pool » et de l'ADN en cours de synthèse par des précurseurs radioactifs (comme expliqué dans la partie précédente) dans des cellules déplétées ou non pour ATR. Les techniques permettant de visualiser l'organisation spatiale des « pools » de nucléotides serait un moyen direct de tester cette hypothèse.

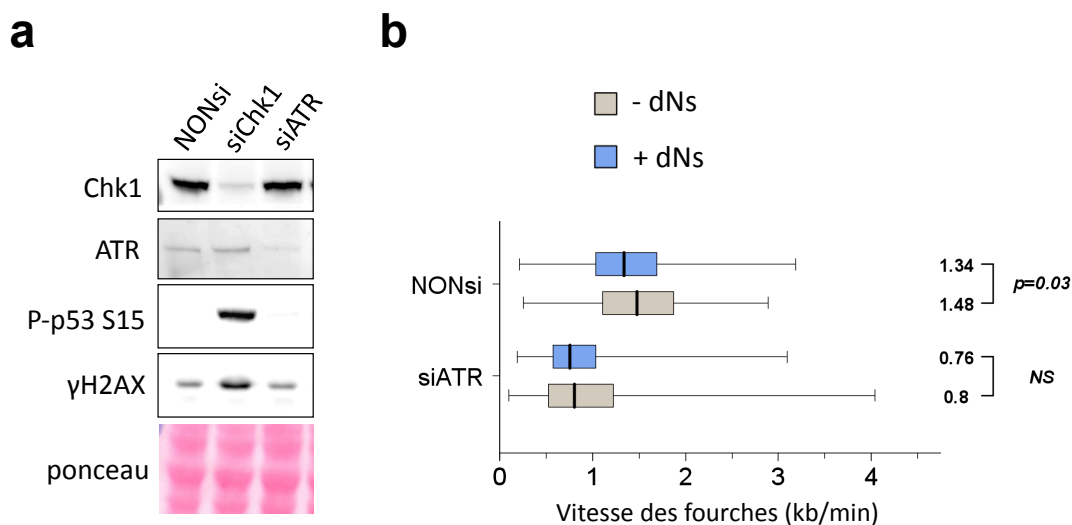


Figure 18 : La déplétion d'ATR n'entraîne pas l'apparition de dommages à l'ADN et le ralentissement des fourches n'est pas compensé par l'ajout de dNs. (A) Analyse de la DDR par western-blot d'extraits totaux de cellules JEFF. Les conditions de transfection et les anticorps sont indiqués sur la figure. Le ponceau est utilisé comme un contrôle de dépôt. Nonsi : siRNA contrôle. Ceci est une expérience représentative de trois expériences indépendantes. (B) Représentation en bar-plot de la distribution de la vitesse de progression des fourches de réplication dans des cellules JEFF (en kb/min). Les moustaches représentent : les valeurs minimales et maximales, les boîtes : les premiers et troisièmes quartiles, les barres verticales : les médianes. Les médianes sont indiquées à droite de chacune des distributions. L'ajout de déoxyribonucléosides (dNs) est indiqué en bleu. La p-value est indiquée sur la figure. NS : non-significatif ($p>0,05$).

5. Cancer(s) et réplication

Il n'y a pas un cancer, mais différents types de cancers selon leur origine tissulaire. La malignité est acquise à travers une histoire génétique complexe, qui diffère d'un cas à un autre. Néanmoins des caractéristiques générales semblent décrire à la fois les cancers héréditaires et sporadiques provenant de tissus variés (voir [figure 19](#)) (voir (Luo et al., 2009;

Negrini et al., 2010) pour revues). L'instabilité du génome, les dommages à l'ADN, le stress réplicatif, le stress oxydatif, l'activation d'oncogènes, le potentiel illimité de prolifération, sont autant de caractéristiques communes aux cancers qui suggèrent un rôle important de la DDR et de la réplication dans la progression tumorale. Ici nous discuterons tout particulièrement du modèle du stress réplicatif et du métabolisme des précurseurs.

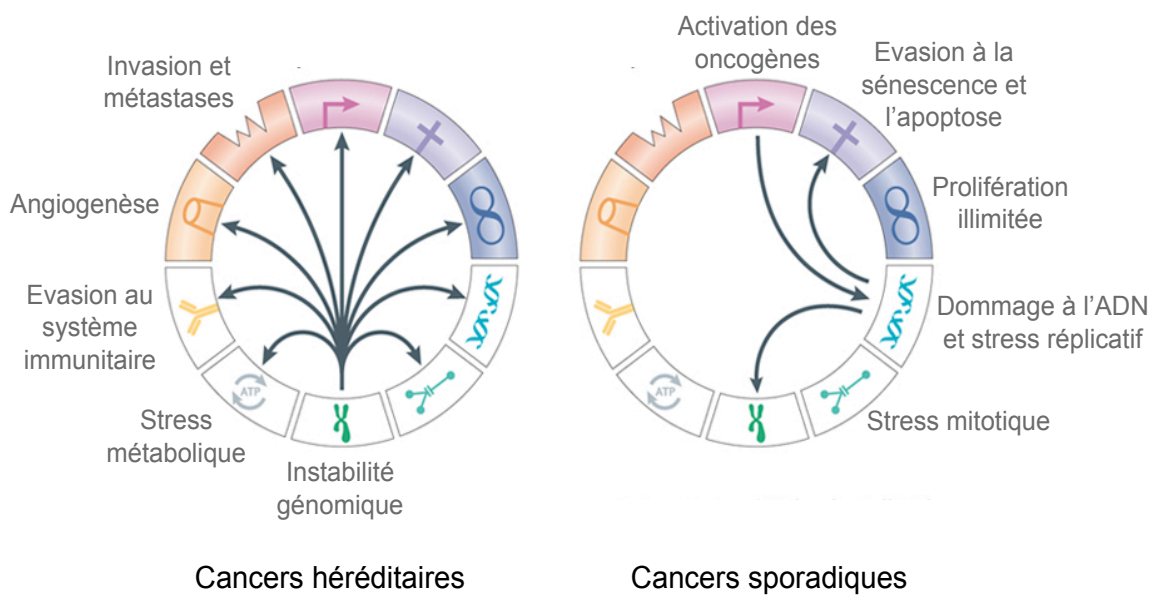


Figure 19 : Les caractéristiques communes aux cancers. Les cancers sporadiques et les cancers héréditaires partagent des caractéristiques communes. L'activation d'oncogènes, l'instabilité génomique et le stress réplicatif sont parmi les caractéristiques communes qui jouent un rôle majeur dans la progression tumorale. Figure adaptée de Negrini 2010.

Le modèle du stress réplicatif.

Il est généralement accepté que stress réplicatif et instabilité du génome sont des événements précoces dans la progression tumorale. Deux études indépendantes ont fourni les bases de ce modèle en décrivant que la DDR est activée (phosphorylation d'ATM, de Chk2 et autres) dans des lésions pré-tumorales issues de biopsies de patients (Bartkova et al., 2005; Gorgoulis et al., 2005). Ces études suggèrent également que le stress réplicatif est l'élément déclencheur des dommages à l'ADN. En accord avec cette hypothèse, l'inhibition du facteur d'initiation de la réplication Cdc7, a un effet anti-tumoral sur des xénogreffes et des cellules tumorales en culture (Montagnoli et al., 2008).

Le modèle du stress réplicatif propose que la DDR, par ses branches principales ATR et ATM, constitue la première barrière anti-tumorale (voir [figure 20](#)). Le pouvoir anti-tumoral exercé par la DDR est basé sur la capacité qu'a cette voie de signalisation à diriger les cellules pré-tumorales accumulant des dommages vers la sénescence ou l'apoptose (voir [\(Bartek et al., 2007; Halazonetis et al., 2008\)](#) pour revues). En accord avec ce modèle il est connu que le traitement de cellules avec des agents génotoxiques ou l'induction d'oncogènes conduit à la sénescence (« oncogene-induced senescence », OIS) ([d'Adda di Fagagna et al., 2003; d'Adda di Fagagna et al., 2004](#)). De manière cohérente, l'induction d'oncogènes dans des cellules en culture conduit également à l'activation de la voie de signalisation des dommages ([Bartkova et al., 2005; Gorgoulis et al., 2005](#)). La pertinence de ce modèle est démontrée par la clinique. De nombreuses thérapies, ou essais cliniques, visent à toucher la réponse aux dommages à l'ADN, soit en induisant des dommages soit en inhibant un facteur de la DDR (voir [\(Luo et al., 2009; Zhou and Bartek, 2004\)](#) pour revues). De nombreuses stratégies thérapeutiques visent tout particulièrement à inhiber Chk1, sans doute pour son rôle central au cours de la phase S (voir [\(Dai and Grant, 2010\)](#) pour revue). Le principe de ces thérapies est d'accumuler des dommages pour forcer les cellules tumorales à entrer en sénescence ou en apoptose. Le défaut de cette stratégie est qu'elle n'est pas spécifique et va aussi affecter les cellules des tissus sains.

Ce modèle privilégie l'hypothèse selon laquelle l'activation des oncogène est un événement initiateur de la tumorigenèse, à l'origine notamment du stress réplicatif. Cependant la surexpression des oncogènes, notamment leur amplification, sont rarement détectés dans des stades précoces (voir [\(Albertson, 2006; Debatisse and Malfoy, 2005\)](#) pour revues). L'activation des oncogènes pourrait donc survenir plus tardivement dans la progression tumorale, et gouverner cette progression par des mécanismes variés. Notamment, il a été montré que l'activation des oncogènes est associée à un stress réplicatif, qui conduit soit au blocage des fourches ([Bartkova et al., 2006](#)), soit à la re-réplication de certaines parties du génomes ([Di Micco et al., 2006](#)). Même si ces résultats sont débattus, l'oncogène c-Myc pourrait aussi avoir une action directe sur la dynamique de réplication, en interagissant avec le complexe de réplication et en favorisant l'initiation. La surexpression de c-Myc crée des dommages en phase S sans doute en conséquence du stress réplicatif qu'il induit ([Dominguez-Sola et al., 2007](#)). De plus, les espèces réactives de l'oxygène (ROS) pourraient être une source de dommage et de perturbation de la réplication importante au cours de la progression tumorale ([Bartkova et al., 2010](#)). Le stress oxydatif résulte de dérégulations mitochondriales ou de l'activation d'oncogènes, comme décrit pour c-Myc ([Vafa et al., 2002](#)).

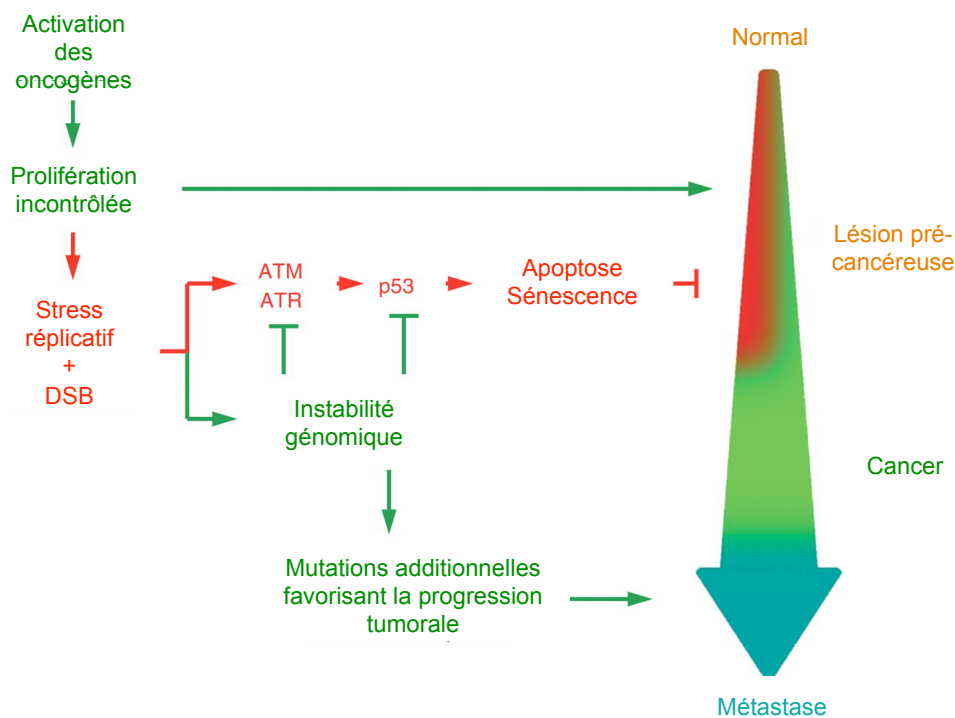


Figure 20 : Le modèle du stress réplcatif. L'instabilité génomique et la suppression tumorale sont des conséquences directes de l'activation des oncogènes et du stress réplcatif qui en est associé. Ces événements apparaissent dès le début du développement du cancer, dans les lésions pré-tumorales. La DDR en rouge est anti-cancéreuse puisqu'elle peut induire l'apoptose ou la sénescence des cellules qui accumulent des dommages. Les événements en vert, comme l'instabilité génomique, stimulent la progression tumorale. Figure adaptée de Halazonetis 2008.

Cancer et « pools ».

Récemment l'impact de la transformation de cellules humaines par des oncogènes sur les pools de dNTP, la dynamique de réplication et l'instabilité génomique a été étudié (Bester et al., 2011). La transformation de cellules humaines par l'activation forcée de la voie Rb-E2F (Rb, rétinoblastome), par la surexpression de la cycline E ou de HPV-16 E6/E7 (oncogène du papilloma virus humain), entraîne une diminution des « pools » de dNTP, une altération de la dynamique de réplication, ainsi que des dommages à l'ADN. L'addition de précurseurs dans le milieu de culture des cellules transformées permet de supprimer l'ensemble de ces défauts, suggérant que le stress réplcatif induit par la carence en dNTP est à l'origine des dommages. En accord avec ces résultats, il avait été préalablement observé que des dérégulations de la voie Rb induisent des altérations de la voie de synthèse des dNTP et des

déséquilibres de « pools » (Angus et al., 2002). De plus, la transformation de cellules par des oncogènes d'origine virale induit des altérations de l'expression au cours du cycle d'enzymes de biosynthèse des dNTP, telles que les sous-unités 1 et 2 de la RNR, la TK et la DHFR (Bester et al., 2011; Hengstschlager et al., 1994). La R2 semble souvent surexprimée dans les cellules tumorales (Jensen et al., 1994; Zhang et al., 2009). Les altérations du niveau de ces enzymes peuvent être à l'origine de déséquilibres des « pools », source de stress répliatif et d'instabilité génétique. Il a d'ailleurs été proposé que les réarrangements chromosomiques observés dans les carcinomes colorectaux sont sélectionnés au cours de la tumorigenèse car ils entraînent des dérégulations de la voie de biosynthèse des nucléotides (Dutrillaux and Muleris, 1986; Luccioni et al., 1988). Les déséquilibres des « pools » peuvent aussi conduire à des mésappariements lors de la synthèse de l'ADN pouvant induire à terme des mutations (Kumar et al., 2011; Kumar et al., 2010; Martomo and Mathews, 2002). Plusieurs études, suggèrent également, que la sous-unité p53R2 est un suppresseur de tumeur grâce à son rôle dans la voie de réparation de l'ADN (Liu et al., 2011; Zhang et al., 2011). De plus, p53R2 a la capacité de dégrader les ROS et serait aussi une barrière contre le stress oxydatif (Guittet et al., 2008).

En conclusion, les oncogènes ont donc la capacité d'altérer le programme de réplication et de déstabiliser les fourches de réplication, entraînant l'instabilité génomique moteur de la progression tumorale. On peut imaginer qu'un cercle vicieux s'enclenche, car les dommages à l'ADN pourraient à leur tour être une source de stress répliatif, et ce stress répliatif une source de nouveaux dommages.

6. SFC et réarrangements dans les cancers

Le modèle du stress répliatif est soutenu par de nombreuses études qui associent les SFC (les sites fragiles sont présentés en partie 3.A des résultats) aux délétions et autres réarrangements trouvés dans les cancers (voir (Dereli-Oz et al., 2011) pour revue). Récemment deux études indépendantes ont largement contribué à faire progresser nos connaissances sur les réarrangements chromosomiques présents dans les cancers (Beroukhim et al., 2010; Bignell et al., 2010). Beroukhim et ses collègues ont étudiés 3131 échantillons cancéreux, dont la majorité provient de tumeurs humaines, et la minorité de cellules cancéreuses en culture (Beroukhim et al., 2010). Les auteurs ont identifié 76 foyers d'amplifications et 82 foyers de délétions. Les amplifications, pour la plupart, ciblent des oncogènes. De manière intéressante, les délétions affectent des gènes suppresseurs de

tumeur (GST) ou des grands gènes, lesquels sont parfois associés à des sites fragiles (par exemple FHIT dans FRA3B). Bignell et ses collègues ont cartographié les réarrangements retrouvés dans 746 lignées cellulaires dérivées de cancers, le point fort de cette étude vient du fait qu'ils ont identifiés indépendamment les délétions homozygotes ou hémizygotiques (Bignell et al., 2010). Les délétions homozygotes sont majoritairement trouvées dans les GST, dont l'inactivation est sélectionnée au cours de la tumorigenèse. Les délétions hémizygotiques sont en partie trouvées au niveau des SFC, certains contenant des grands gènes, le reste survenant au niveau de régions « inexplicables ». Les deux études fournissent donc des résultats très similaires.

Ces études ne prenaient en compte que les sites fragiles des lymphocytes identifiés jusque là. De façon intéressante, les sites majeurs des fibroblastes localisés récemment sur les bandes chromosomiques 3q13.3 et 1p31.1 correspondent à deux de ces foyers de délétion dits « inexplicables » (Le Tallec et al., 2011), suggérant que de nombreux réarrangements dans les cancers surviennent dans les SFC. En accord avec cette hypothèse, il est connu que les SFC sont des sites préférentiels de réarrangements (Coquelle et al., 1997; Coquelle et al., 2002) (voir (Debatisse et al., 2012) pour revue). La cartographie des SFC dans différents tissus et types cellulaires, comme les cellules épithéliales d'où proviennent la majorité des cancers humains, permettra de découvrir de nouveaux SFC et sans doute d'expliquer une majorité des réarrangements récurrents présents dans les cancers.

Enfin, je voudrais discuter des mécanismes par lesquels les SFC contribuent à la progression tumorale. Même si certains grands gènes que l'on retrouve dans les SFC sont des suppresseurs de tumeurs potentiels (débatu), il semble plus probable que leur association aux réarrangements reflète essentiellement l'instabilité locale déclenchée par leur expression (voir (Dereli-Oz et al., 2011; Negrini et al., 2010) pour revues). Notamment, la signature de délétion hémizygotique retrouvée au niveau des SFC n'est pas attendue si ces régions contiennent des GST, suggérant que ces délétions ont peu d'impact sélectif (voir [figure 21](#)). Par contre, nous pouvons proposer que les SFC, qui favorisent les réarrangements chromosomiques au cours de la tumorigenèse, notamment les amplifications d'oncogènes (voir (Albertson, 2006; Debatisse and Malfoy, 2005) pour revues), pourraient également jouer un rôle en entraînant un état d'instabilité chronique, permettant la sélection des cellules déficientes pour la DDR.

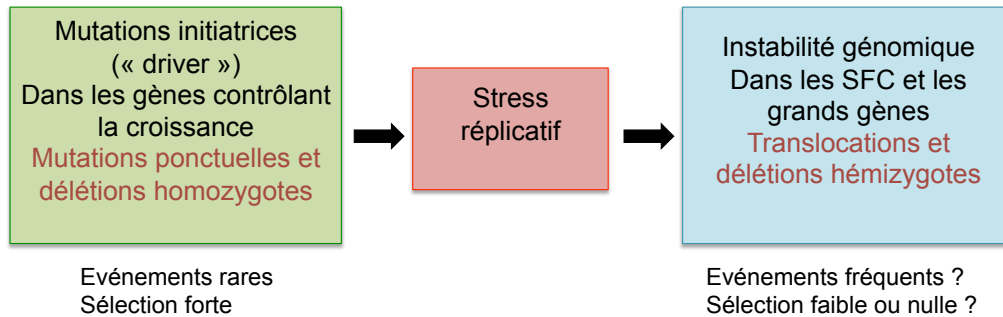


Figure 21 : Le stress réplicatif induit par l'activation des oncogènes conduit à des réarrangements au niveau des SFC. Les mutations initiatrices dans le développement cancéreux conduisent à activer des oncogènes, qui stimulent la prolifération des cellules. Le stress réplicatif engendré par l'activation des oncogènes va aboutir à des réarrangements au niveau des SFC. Les gènes contenus dans les SFC ne sont pas sélectionnés lors de la tumorigenèse. Figure adaptée de Dereli-Öz 2011.

Références

- Aguilera, A., and T. Garcia-Muse. 2012. R loops: from transcription byproducts to threats to genome stability. *Mol Cell*. 46:115-24.
- Aguilera, A., and B. Gomez-Gonzalez. 2008. Genome instability: a mechanistic view of its causes and consequences. *Nat Rev Genet*. 9:204-17.
- Aladjem, M.I. 2007. Replication in context: dynamic regulation of DNA replication patterns in metazoans. *Nat Rev Genet*. 8:588-600.
- Aladjem, M.I., L.W. Rodewald, J.L. Kolman, and G.M. Wahl. 1998. Genetic dissection of a mammalian replicator in the human beta-globin locus. *Science*. 281:1005-9.
- Albertson, D.G. 2006. Gene amplification in cancer. *Trends Genet*. 22:447-55.
- Allen, J.R., G.P. Reddy, G.W. Lasser, and C.K. Mathews. 1980. T4 ribonucleotide reductase. Physical and kinetic linkage to other enzymes of deoxyribonucleotide biosynthesis. *J Biol Chem*. 255:7583-8.
- Alvino, G.M., D. Collingwood, J.M. Murphy, J. Delrow, B.J. Brewer, and M.K. Raghuraman. 2007. Replication in hydroxyurea: it's a matter of time. *Mol Cell Biol*. 27:6396-406.
- An, S., R. Kumar, E.D. Sheets, and S.J. Benkovic. 2008. Reversible compartmentalization of de novo purine biosynthetic complexes in living cells. *Science*. 320:103-6.
- Anglana, M., F. Apiou, A. Bensimon, and M. Debatisse. 2003. Dynamics of DNA replication in mammalian somatic cells: nucleotide pool modulates origin choice and interorigin spacing. *Cell*. 114:385-94.
- Angus, S.P., L.J. Wheeler, S.A. Ranmal, X. Zhang, M.P. Markey, C.K. Mathews, and E.S. Knudsen. 2002. Retinoblastoma tumor suppressor targets dNTP metabolism to regulate DNA replication. *J Biol Chem*. 277:44376-84.
- Ayusawa, D., K. Shimizu, H. Koyama, K. Takeishi, and T. Seno. 1983. Unusual aspects of human thymidylate synthase in mouse cells introduced by DNA-mediated gene transfer. *J Biol Chem*. 258:48-53.
- Bahassi, E.M., J.L. Ovesen, A.L. Riesenberg, W.Z. Bernstein, P.E. Hasty, and P.J. Stambrook. 2008. The checkpoint kinases Chk1 and Chk2 regulate the functional associations between hBRCA2 and Rad51 in response to DNA damage. *Oncogene*. 27:3977-85.
- Balestrini, A., C. Cosentino, A. Errico, E. Garner, and V. Costanzo. 2010. GEMC1 is a TopBP1-interacting protein required for chromosomal DNA replication. *Nat Cell Biol*. 12:484-91.
- Baril, E., B. Baril, and J. Laszlo. 1974. DNA polymerases in normal and regenerating rat liver and hepatomas: targets for chemotherapy. *Adv Enzyme Regul*. 12:355-72.
- Bartek, J., J. Bartkova, and J. Lukas. 2007. DNA damage signalling guards against activated oncogenes and tumour progression. *Oncogene*. 26:7773-9.
- Bartek, J., and J. Lukas. 2003. Chk1 and Chk2 kinases in checkpoint control and cancer. *Cancer Cell*. 3:421-9.
- Bartkova, J., P. Hamerlik, M.T. Stockhausen, J. Ehrmann, A. Hlobilkova, H. Laursen, O. Kalita, Z. Kolar, H.S. Poulsen, H. Broholm, J. Lukas, and J. Bartek. 2010. Replication stress and oxidative damage contribute to aberrant constitutive activation of DNA damage signalling in human gliomas. *Oncogene*. 29:5095-102.
- Bartkova, J., Z. Horejsi, K. Koed, A. Kramer, F. Tort, K. Zieger, P. Guldborg, M. Sehested, J.M. Nesland, C. Lukas, T. Orntoft, J. Lukas, and J. Bartek. 2005. DNA damage response as a candidate anti-cancer barrier in early human tumorigenesis. *Nature*. 434:864-70.
- Bartkova, J., N. Rezaei, M. Lontos, P. Karakaidos, D. Kletsas, N. Issaeva, L.V. Vassiliou, E. Kolettas, K. Niforou, V.C. Zoumpourlis, M. Takaoka, H. Nakagawa, F. Tort, K. Fugger, F. Johansson, M. Sehested, C.L. Andersen, L. Dyrskjot, T. Orntoft, J. Lukas, C. Kittas, T. Helleday, T.D. Halazonetis, J. Bartek, and V.G. Gorgoulis. 2006.

- Oncogene-induced senescence is part of the tumorigenesis barrier imposed by DNA damage checkpoints. *Nature*. 444:633-7.
- Batra, V., V. Kesavan, and K.P. Mishra. 2004. Modulation of enzymes involved in folate dependent one-carbon metabolism by gamma-radiation stress in mice. *J Radiat Res*. 45:527-33.
- Bell, S.P. 2002. The origin recognition complex: from simple origins to complex functions. *Genes Dev*. 16:659-72.
- Bell, S.P., and B. Stillman. 1992. ATP-dependent recognition of eukaryotic origins of DNA replication by a multiprotein complex. *Nature*. 357:128-34.
- Berezney, R., and D.S. Coffey. 1975. Nuclear protein matrix: association with newly synthesized DNA. *Science*. 189:291-3.
- Beroukhi, R., C.H. Mermel, D. Porter, G. Wei, S. Raychaudhuri, J. Donovan, J. Barretina, J.S. Boehm, J. Dobson, M. Urashima, K.T. Mc Henry, R.M. Pinchback, A.H. Ligon, Y.J. Cho, L. Haery, H. Greulich, M. Reich, W. Winckler, M.S. Lawrence, B.A. Weir, K.E. Tanaka, D.Y. Chiang, A.J. Bass, A. Loo, C. Hoffman, J. Prensner, T. Liefeld, Q. Gao, D. Yecies, S. Signoretti, E. Maher, F.J. Kaye, H. Sasaki, J.E. Tepper, J.A. Fletcher, J. Taberner, J. Baselga, M.S. Tsao, F. Demichelis, M.A. Rubin, P.A. Janne, M.J. Daly, C. Nucera, R.L. Levine, B.L. Ebert, S. Gabriel, A.K. Rustgi, C.R. Antonescu, M. Ladanyi, A. Letai, L.A. Garraway, M. Loda, D.G. Beer, L.D. True, A. Okamoto, S.L. Pomeroy, S. Singer, T.R. Golub, E.S. Lander, G. Getz, W.R. Sellers, and M. Meyerson. 2010. The landscape of somatic copy-number alteration across human cancers. *Nature*. 463:899-905.
- Bertrand, P., S. Lambert, C. Joubert, and B.S. Lopez. 2003. Overexpression of mammalian Rad51 does not stimulate tumorigenesis while a dominant-negative Rad51 affects centrosome fragmentation, ploidy and stimulates tumorigenesis, in p53-defective CHO cells. *Oncogene*. 22:7587-92.
- Besnard, E., A. Babled, L. Lapasset, O. Milhavet, H. Parrinello, C. Dantec, J.M. Marin, and J.M. Lemaître. 2012. Unraveling cell type-specific and reprogrammable human replication origin signatures associated with G-quadruplex consensus motifs. *Nat Struct Mol Biol*.
- Bester, A.C., M. Roniger, Y.S. Oren, M.M. Im, D. Sarni, M. Chaoat, A. Bensimon, G. Zamir, D.S. Shewach, and B. Kerem. 2011. Nucleotide deficiency promotes genomic instability in early stages of cancer development. *Cell*. 145:435-46.
- Bignell, G.R., C.D. Greenman, H. Davies, A.P. Butler, S. Edkins, J.M. Andrews, G. Buck, L. Chen, D. Beare, C. Latimer, S. Widaa, J. Hinton, C. Fahey, B. Fu, S. Swamy, G.L. Dalglish, B.T. Teh, P. Deloukas, F. Yang, P.J. Campbell, P.A. Futreal, and M.R. Stratton. 2010. Signatures of mutation and selection in the cancer genome. *Nature*. 463:893-8.
- Blumenthal, A.B., H.J. Kriegstein, and D.S. Hogness. 1974. The units of DNA replication in *Drosophila melanogaster* chromosomes. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 38:205-23.
- Bochman, M.L., and A. Schwacha. 2008. The Mcm2-7 complex has in vitro helicase activity. *Mol Cell*. 31:287-93.
- Bodmer-Glavas, M., K. Edler, and A. Barberis. 2001. RNA polymerase II and III transcription factors can stimulate DNA replication by modifying origin chromatin structures. *Nucleic Acids Res*. 29:4570-80.
- Boos, D., L. Sanchez-Pulido, M. Rappas, L.H. Pearl, A.W. Oliver, C.P. Ponting, and J.F. Diffley. 2011. Regulation of DNA replication through Sld3-Dpb11 interaction is conserved from yeast to humans. *Curr Biol*. 21:1152-7.
- Bourdon, A., L. Minai, V. Serre, J.P. Jais, E. Sarzi, S. Aubert, D. Chretien, P. de Lonlay, V. Paquis-Flucklinger, H. Arakawa, Y. Nakamura, A. Munnich, and A. Rotig. 2007. Mutation of RRM2B, encoding p53-controlled ribonucleotide reductase (p53R2), causes severe mitochondrial DNA depletion. *Nat Genet*. 39:776-80.
- Branzei, D., and M. Foiani. 2009. The checkpoint response to replication stress. *DNA Repair (Amst)*. 8:1038-46.

- Branzei, D., and M. Foiani. 2010. Maintaining genome stability at the replication fork. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 11:208-19.
- Brewer, B.J., and W.L. Fangman. 1987. The localization of replication origins on ARS plasmids in *S. cerevisiae*. *Cell.* 51:463-71.
- Brooks, K., V. Oakes, B. Edwards, M. Ranall, P. Leo, S. Pavey, A. Pinder, H. Beamish, P. Mukhopadhyay, D. Lambie, and B. Gabrielli. 2012. A potent Chk1 inhibitor is selectively cytotoxic in melanomas with high levels of replicative stress. *Oncogene.*
- Brown, E.J., and D. Baltimore. 2000. ATR disruption leads to chromosomal fragmentation and early embryonic lethality. *Genes Dev.* 14:397-402.
- Buongiorno-Nardelli, M., G. Micheli, M.T. Carri, and M. Marilley. 1982. A relationship between replicon size and supercoiled loop domains in the eukaryotic genome. *Nature.* 298:100-2.
- Burkhalter, M.D., S.A. Roberts, J.M. Havener, and D.A. Ramsden. 2009. Activity of ribonucleotide reductase helps determine how cells repair DNA double strand breaks. *DNA Repair (Amst).* 8:1258-63.
- Byun, T.S., M. Pacek, M.C. Yee, J.C. Walter, and K.A. Cimprich. 2005. Functional uncoupling of MCM helicase and DNA polymerase activities activates the ATR-dependent checkpoint. *Genes Dev.* 19:1040-52.
- Cadore, J.C., F. Meisch, V. Hassan-Zadeh, I. Luyten, C. Guillet, L. Duret, H. Quesneville, and M.N. Prioleau. 2008. Genome-wide studies highlight indirect links between human replication origins and gene regulation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 105:15837-42.
- Caldecott, K.W. 2008. Single-strand break repair and genetic disease. *Nat Rev Genet.* 9:619-31.
- Casper, A.M., S.G. Durkin, M.F. Arlt, and T.W. Glover. 2004. Chromosomal instability at common fragile sites in Seckel syndrome. *Am J Hum Genet.* 75:654-60.
- Casper, A.M., P. Nghiem, M.F. Arlt, and T.W. Glover. 2002. ATR regulates fragile site stability. *Cell.* 111:779-89.
- Cayrou, C., P. Coulombe, A. Puy, S. Rialle, N. Kaplan, E. Segal, and M. Mechali. 2012. New insights into replication origin characteristics in metazoans. *Cell Cycle.* 11:658-67.
- Cayrou, C., P. Coulombe, A. Vigneron, S. Stanojcic, O. Ganier, I. Peiffer, E. Rivals, A. Puy, S. Laurent-Chabalier, R. Desprat, and M. Mechali. 2011. Genome-scale analysis of metazoan replication origins reveals their organization in specific but flexible sites defined by conserved features. *Genome Res.* 21:1438-49.
- Chabes, A.L., S. Bjorklund, and L. Thelander. 2004. S Phase-specific transcription of the mouse ribonucleotide reductase R2 gene requires both a proximal repressive E2F-binding site and an upstream promoter activating region. *J Biol Chem.* 279:10796-807.
- Chabes, A.L., C.M. Pflieger, M.W. Kirschner, and L. Thelander. 2003. Mouse ribonucleotide reductase R2 protein: a new target for anaphase-promoting complex-Cdh1-mediated proteolysis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100:3925-9.
- Chabosse, P., G. Buhagiar-Labarchede, R. Onclercq-Delic, S. Lambert, M. Debatisse, O. Brison, and M. Amor-Gueret. 2011. Pyrimidine pool imbalance induced by BLM helicase deficiency contributes to genetic instability in Bloom syndrome. *Nat Commun.* 2:368.
- Chakraborty, T., K. Yoshinaga, H. Lothar, and W. Messer. 1982. Purification of the *E. coli* dnaA gene product. *EMBO J.* 1:1545-9.
- Chang, F., C.D. May, T. Hoggard, J. Miller, C.A. Fox, and M. Weinreich. 2011. High-resolution analysis of four efficient yeast replication origins reveals new insights into the ORC and putative MCM binding elements. *Nucleic Acids Res.* 39:6523-35.
- Chang, F., J.F. Theis, J. Miller, C.A. Nieduszynski, C.S. Newlon, and M. Weinreich. 2008a. Analysis of chromosome III replicators reveals an unusual structure for the ARS318 silencer origin and a conserved WTW sequence within the origin recognition complex binding site. *Mol Cell Biol.* 28:5071-81.

- Chang, L., B. Zhou, S. Hu, R. Guo, X. Liu, S.N. Jones, and Y. Yen. 2008b. ATM-mediated serine 72 phosphorylation stabilizes ribonucleotide reductase small subunit p53R2 protein against MDM2 to DNA damage. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 105:18519-24.
- Chaumeil, J., S. Augui, J.C. Chow, and E. Heard. 2008. Combined immunofluorescence, RNA fluorescent in situ hybridization, and DNA fluorescent in situ hybridization to study chromatin changes, transcriptional activity, nuclear organization, and X-chromosome inactivation. *Methods Mol Biol*. 463:297-308.
- Chen, Y.L., S. Eriksson, and Z.F. Chang. 2010. Regulation and functional contribution of thymidine kinase 1 in repair of DNA damage. *J Biol Chem*. 285:27327-35.
- Chiu, C.S., K.S. Cook, and G.R. Greenberg. 1982. Characteristics of a bacteriophage T4-induced complex synthesizing deoxyribonucleotides. *J Biol Chem*. 257:15087-97.
- Chuang, C.H., M.D. Wallace, C. Abratte, T. Southard, and J.C. Schimenti. 2010. Incremental genetic perturbations to MCM2-7 expression and subcellular distribution reveal exquisite sensitivity of mice to DNA replication stress. *PLoS Genet*. 6.
- Ciccia, A., and S.J. Elledge. 2010. The DNA damage response: making it safe to play with knives. *Mol Cell*. 40:179-204.
- Cimprich, K.A., and D. Cortez. 2008. ATR: an essential regulator of genome integrity. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 9:616-27.
- Conti, C., B. Sacca, J. Herrick, C. Lalou, Y. Pommier, and A. Bensimon. 2007a. Replication fork velocities at adjacent replication origins are coordinately modified during DNA replication in human cells. *Mol Biol Cell*. 18:3059-67.
- Conti, C., J.A. Seiler, and Y. Pommier. 2007b. The mammalian DNA replication elongation checkpoint: implication of Chk1 and relationship with origin firing as determined by single DNA molecule and single cell analyses. *Cell Cycle*. 6:2760-7.
- Coquelle, A., E. Pipiras, F. Toledo, G. Buttin, and M. Debatisse. 1997. Expression of fragile sites triggers intrachromosomal mammalian gene amplification and sets boundaries to early amplicons. *Cell*. 89:215-25.
- Coquelle, A., L. Rozier, B. Dutrillaux, and M. Debatisse. 2002. Induction of multiple double-strand breaks within an hsr by meganuclease1-SceI expression or fragile site activation leads to formation of double minutes and other chromosomal rearrangements. *Oncogene*. 21:7671-9.
- Courbet, S., S. Gay, N. Arnoult, G. Wronka, M. Anglana, O. Brison, and M. Debatisse. 2008. Replication fork movement sets chromatin loop size and origin choice in mammalian cells. *Nature*. 455:557-60.
- Crabbe, L., A. Thomas, V. Pantesco, J. De Vos, P. Pasero, and A. Lengronne. 2010. Analysis of replication profiles reveals key role of RFC-Ctf18 in yeast replication stress response. *Nat Struct Mol Biol*. 17:1391-7.
- d'Adda di Fagagna, F., P.M. Reaper, L. Clay-Farrace, H. Fiegler, P. Carr, T. Von Zglinicki, G. Saretzki, N.P. Carter, and S.P. Jackson. 2003. A DNA damage checkpoint response in telomere-initiated senescence. *Nature*. 426:194-8.
- d'Adda di Fagagna, F., S.H. Teo, and S.P. Jackson. 2004. Functional links between telomeres and proteins of the DNA-damage response. *Genes Dev*. 18:1781-99.
- D'Angiolella, V., V. Donato, F.M. Forrester, Y.T. Jeong, C. Pellacani, Y. Kudo, A. Saraf, L. Florens, M.P. Washburn, and M. Pagano. 2012. Cyclin F-Mediated Degradation of Ribonucleotide Reductase M2 Controls Genome Integrity and DNA Repair. *Cell*. 149:1023-34.
- Daboussi, F., S. Courbet, S. Benhamou, P. Kannouche, M.Z. Zdzienicka, M. Debatisse, and B.S. Lopez. 2008. A homologous recombination defect affects replication-fork progression in mammalian cells. *J Cell Sci*. 121:162-6.
- Daboussi, F., J. Thacker, and B.S. Lopez. 2005. Genetic interactions between RAD51 and its paralogues for centrosome fragmentation and ploidy control, independently of the sensitivity to genotoxic stresses. *Oncogene*. 24:3691-6.
- Dai, Y., and S. Grant. 2010. New insights into checkpoint kinase 1 in the DNA damage response signaling network. *Clin Cancer Res*. 16:376-83.

- Davey, M.J., D. Jeruzalmi, J. Kuriyan, and M. O'Donnell. 2002. Motors and switches: AAA+ machines within the replisome. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 3:826-35.
- Davidson, M.B., Y. Katou, A. Keszthelyi, T.L. Sing, T. Xia, J. Ou, J.A. Vaisica, N. Thevakumaran, L. Marjavaara, C.L. Myers, A. Chabes, K. Shirahige, and G.W. Brown. 2012. Endogenous DNA replication stress results in expansion of dNTP pools and a mutator phenotype. *EMBO J.* 31:895-907.
- de Klein, A., M. Muijtjens, R. van Os, Y. Verhoeven, B. Smit, A.M. Carr, A.R. Lehmann, and J.H. Hoeijmakers. 2000. Targeted disruption of the cell-cycle checkpoint gene ATR leads to early embryonic lethality in mice. *Curr Biol.* 10:479-82.
- De Marco, V., P.J. Gillespie, A. Li, N. Karantzelis, E. Christodoulou, R. Klompaker, S. van Gerwen, A. Fish, M.V. Petoukhov, M.S. Iliou, Z. Lygerou, R.H. Medema, J.J. Blow, D.I. Svergun, S. Taraviras, and A. Perrakis. 2009. Quaternary structure of the human Cdt1-Geminin complex regulates DNA replication licensing. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 106:19807-12.
- De, S., and F. Michor. 2011. DNA replication timing and long-range DNA interactions predict mutational landscapes of cancer genomes. *Nat Biotechnol.* 29:1103-8.
- Debatisse, M., B. Le Tallec, A. Letessier, B. Dutrillaux, and O. Brison. 2012. Common fragile sites: mechanisms of instability revisited. *Trends Genet.* 28:22-32.
- Debatisse, M., and B. Malfoy. 2005. Gene amplification mechanisms. *Adv Exp Med Biol.* 570:343-61.
- Delacroix, S., J.M. Wagner, M. Kobayashi, K. Yamamoto, and L.M. Karnitz. 2007. The Rad9-Hus1-Rad1 (9-1-1) clamp activates checkpoint signaling via TopBP1. *Genes Dev.* 21:1472-7.
- Deng, C.X. 2002. Roles of BRCA1 in centrosome duplication. *Oncogene.* 21:6222-7.
- DePamphilis, M.L. 1993. Eukaryotic DNA replication: anatomy of an origin. *Annu Rev Biochem.* 62:29-63.
- Dereli-Oz, A., G. Versini, and T.D. Halazonetis. 2011. Studies of genomic copy number changes in human cancers reveal signatures of DNA replication stress. *Mol Oncol.* 5:308-14.
- Desany, B.A., A.A. Alcasabas, J.B. Bachant, and S.J. Elledge. 1998. Recovery from DNA replicational stress is the essential function of the S-phase checkpoint pathway. *Genes Dev.* 12:2956-70.
- Desprat, R., D. Thierry-Mieg, N. Lailler, J. Lajugie, C. Schildkraut, J. Thierry-Mieg, and E.E. Bouhassira. 2009. Predictable dynamic program of timing of DNA replication in human cells. *Genome Res.* 19:2288-99.
- Di Micco, R., M. Fumagalli, A. Cicalese, S. Piccinin, P. Gasparini, C. Luise, C. Schurra, M. Garre, P.G. Nuciforo, A. Bensimon, R. Maestro, P.G. Pelicci, and F. d'Adda di Fagagna. 2006. Oncogene-induced senescence is a DNA damage response triggered by DNA hyper-replication. *Nature.* 444:638-42.
- Diffley, J.F., and K. Labib. 2002. The chromosome replication cycle. *J Cell Sci.* 115:869-72.
- Dimitrova, D.S., and D.M. Gilbert. 1999. The spatial position and replication timing of chromosomal domains are both established in early G1 phase. *Mol Cell.* 4:983-93.
- Dominguez-Kelly, R., Y. Martin, S. Koundrioukoff, M.E. Tanenbaum, V.A. Smits, R.H. Medema, M. Debatisse, and R. Freire. 2011. Wee1 controls genomic stability during replication by regulating the Mus81-Eme1 endonuclease. *J Cell Biol.* 194:567-79.
- Dominguez-Sola, D., C.Y. Ying, C. Grandori, L. Ruggiero, B. Chen, M. Li, D.A. Galloway, W. Gu, J. Gautier, and R. Dalla-Favera. 2007. Non-transcriptional control of DNA replication by c-Myc. *Nature.* 448:445-51.
- Durkin, S.G., M.F. Arlt, N.G. Howlett, and T.W. Glover. 2006. Depletion of CHK1, but not CHK2, induces chromosomal instability and breaks at common fragile sites. *Oncogene.* 25:4381-8.
- Durkin, S.G., and T.W. Glover. 2007. Chromosome fragile sites. *Annu Rev Genet.* 41:169-92.

- Dutrillaux, B., and M. Muleris. 1986. Induction of increased salvage pathways of nucleotide synthesis by dosage effect due to chromosome imbalances may be fundamental in carcinogenesis: the example of colorectal carcinoma. *Ann Genet.* 29:11-5.
- Eaton, M.L., K. Galani, S. Kang, S.P. Bell, and D.M. MacAlpine. 2010. Conserved nucleosome positioning defines replication origins. *Genes Dev.* 24:748-53.
- Edwards, M.C., A.V. Tutter, C. Cvetic, C.H. Gilbert, T.A. Prokhorova, and J.C. Walter. 2002. MCM2-7 complexes bind chromatin in a distributed pattern surrounding the origin recognition complex in *Xenopus* egg extracts. *J Biol Chem.* 277:33049-57.
- El Achkar, E., M. Gerbault-Seureau, M. Muleris, B. Dutrillaux, and M. Debatisse. 2005. Premature condensation induces breaks at the interface of early and late replicating chromosome bands bearing common fragile sites. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102:18069-74.
- Engstrom, Y., S. Eriksson, I. Jildevik, S. Skog, L. Thelander, and B. Tribukait. 1985. Cell cycle-dependent expression of mammalian ribonucleotide reductase. Differential regulation of the two subunits. *J Biol Chem.* 260:9114-6.
- Engstrom, Y., B. Rozell, H.A. Hansson, S. Stemme, and L. Thelander. 1984. Localization of ribonucleotide reductase in mammalian cells. *EMBO J.* 3:863-7.
- Evrin, C., P. Clarke, J. Zech, R. Lurz, J. Sun, S. Uhle, H. Li, B. Stillman, and C. Speck. 2009. A double-hexameric MCM2-7 complex is loaded onto origin DNA during licensing of eukaryotic DNA replication. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 106:20240-5.
- Fairman, J.W., S.R. Wijerathna, M.F. Ahmad, H. Xu, R. Nakano, S. Jha, J. Prendergast, R.M. Welin, S. Flodin, A. Roos, P. Nordlund, Z. Li, T. Walz, and C.G. Dealwis. 2011. Structural basis for allosteric regulation of human ribonucleotide reductase by nucleotide-induced oligomerization. *Nat Struct Mol Biol.* 18:316-22.
- Farkash-Amar, S., D. Lipson, A. Polten, A. Goren, C. Helmstetter, Z. Yakhini, and I. Simon. 2008. Global organization of replication time zones of the mouse genome. *Genome Res.* 18:1562-70.
- Feng, W., D. Collingwood, M.E. Boeck, L.A. Fox, G.M. Alvino, W.L. Fangman, M.K. Raghuraman, and B.J. Brewer. 2006. Genomic mapping of single-stranded DNA in hydroxyurea-challenged yeasts identifies origins of replication. *Nat Cell Biol.* 8:148-55.
- Fierz, B., and T.W. Muir. 2012. Chromatin as an expansive canvas for chemical biology. *Nat Chem Biol.* 8:417-27.
- Forment, J.V., M. Blasius, I. Guerini, and S.P. Jackson. 2011. Structure-specific DNA endonuclease Mus81/Eme1 generates DNA damage caused by Chk1 inactivation. *PLoS One.* 6:e23517.
- Friedel, A.M., B.L. Pike, and S.M. Gasser. 2009. ATR/Mec1: coordinating fork stability and repair. *Curr Opin Cell Biol.* 21:237-44.
- Gambus, A., G.A. Khoudoli, R.C. Jones, and J.J. Blow. 2011. MCM2-7 form double hexamers at licensed origins in *Xenopus* egg extract. *J Biol Chem.* 286:11855-64.
- Gay, S., A.M. Lachages, G.A. Millot, S. Courbet, A. Letessier, M. Debatisse, and O. Brison. 2010. Nucleotide supply, not local histone acetylation, sets replication origin usage in transcribed regions. *EMBO Rep.* 11:698-704.
- Ge, X.Q., and J.J. Blow. 2010. Chk1 inhibits replication factory activation but allows dormant origin firing in existing factories. *J Cell Biol.* 191:1285-97.
- Ge, X.Q., D.A. Jackson, and J.J. Blow. 2007. Dormant origins licensed by excess Mcm2-7 are required for human cells to survive replicative stress. *Genes Dev.* 21:3331-41.
- Gilbert, D.M. 2004. In search of the holy replicator. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 5:848-55.
- Gilbert, D.M. 2010a. Cell fate transitions and the replication timing decision point. *J Cell Biol.* 191:899-903.
- Gilbert, D.M. 2010b. Evaluating genome-scale approaches to eukaryotic DNA replication. *Nat Rev Genet.* 11:673-84.
- Gilbert, D.M. 2012. Replication origins run (ultra) deep. *Nat Struct Mol Biol.* 19:740-2.
- Gillespie, P.J., and J.J. Blow. 2010. Clusters, factories and domains: The complex structure of S-phase comes into focus. *Cell Cycle.* 9:3218-26.

- Givens, R.M., W.K. Lai, J.M. Rizzo, J.E. Bard, P.A. Mieczkowski, J. Leatherwood, J.A. Huberman, and M.J. Buck. 2012. Chromatin architectures at fission yeast transcriptional promoters and replication origins. *Nucleic Acids Res.*
- Goldar, A., M.C. Marsolier-Kergoat, and O. Hyrien. 2009. Universal temporal profile of replication origin activation in eukaryotes. *PLoS One.* 4:e5899.
- Gorgoulis, V.G., L.V. Vassiliou, P. Karakaidos, P. Zacharatos, A. Kotsinas, T. Liloglou, M. Venere, R.A. Ditullio, Jr., N.G. Kastrinakis, B. Levy, D. Kletsas, A. Yoneta, M. Herlyn, C. Kittas, and T.D. Halazonetis. 2005. Activation of the DNA damage checkpoint and genomic instability in human precancerous lesions. *Nature.* 434:907-13.
- Green, C.M., and G. Almouzni. 2003. Local action of the chromatin assembly factor CAF-1 at sites of nucleotide excision repair in vivo. *EMBO J.* 22:5163-74.
- Griffin, C.S., P.J. Simpson, C.R. Wilson, and J. Thacker. 2000. Mammalian recombination-repair genes XRCC2 and XRCC3 promote correct chromosome segregation. *Nat Cell Biol.* 2:757-61.
- Groth, A., W. Rocha, A. Verreault, and G. Almouzni. 2007. Chromatin challenges during DNA replication and repair. *Cell.* 128:721-33.
- Guilbaud, G., A. Rappailles, A. Baker, C.L. Chen, A. Arneodo, A. Goldar, Y. d'Aubenton-Carafa, C. Thermes, B. Audit, and O. Hyrien. 2011. Evidence for sequential and increasing activation of replication origins along replication timing gradients in the human genome. *PLoS Comput Biol.* 7:e1002322.
- Guillou, E., A. Ibarra, V. Coulon, J. Casado-Vela, D. Rico, I. Casal, E. Schwob, A. Losada, and J. Mendez. 2010. Cohesin organizes chromatin loops at DNA replication factories. *Genes Dev.* 24:2812-22.
- Guittet, O., A. Tebbi, M.H. Cottet, F. Vesin, and M. Lepoivre. 2008. Upregulation of the p53R2 ribonucleotide reductase subunit by nitric oxide. *Nitric Oxide.* 19:84-94.
- Hakansson, P., L. Dahl, O. Chilkova, V. Domkin, and L. Thelander. 2006a. The *Schizosaccharomyces pombe* replication inhibitor Spd1 regulates ribonucleotide reductase activity and dNTPs by binding to the large Cdc22 subunit. *J Biol Chem.* 281:1778-83.
- Hakansson, P., A. Hofer, and L. Thelander. 2006b. Regulation of mammalian ribonucleotide reduction and dNTP pools after DNA damage and in resting cells. *J Biol Chem.* 281:7834-41.
- Halazonetis, T.D., V.G. Gorgoulis, and J. Bartek. 2008. An oncogene-induced DNA damage model for cancer development. *Science.* 319:1352-5.
- Hansen, R.S., S. Thomas, R. Sandstrom, T.K. Canfield, R.E. Thurman, M. Weaver, M.O. Dorschner, S.M. Gartler, and J.A. Stamatoyannopoulos. 2010. Sequencing newly replicated DNA reveals widespread plasticity in human replication timing. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 107:139-44.
- Harvey, G., and C.K. Pearson. 1988. Search for multienzyme complexes of DNA precursor pathways in uninfected mammalian cells and in cells infected with herpes simplex virus type I. *J Cell Physiol.* 134:25-36.
- Hayashi, M., Y. Katou, T. Itoh, A. Tazumi, Y. Yamada, T. Takahashi, T. Nakagawa, K. Shirahige, and H. Masukata. 2007. Genome-wide localization of pre-RC sites and identification of replication origins in fission yeast. *EMBO J.* 26:1327-39.
- Heichinger, C., C.J. Penkett, J. Bahler, and P. Nurse. 2006. Genome-wide characterization of fission yeast DNA replication origins. *EMBO J.* 25:5171-9.
- Hengstschlager, M., I. Mudrak, E. Wintersberger, and E. Wawra. 1994. A common regulation of genes encoding enzymes of the deoxynucleotide metabolism is lost after neoplastic transformation. *Cell Growth Differ.* 5:1389-94.
- Herrick, J., and A. Bensimon. 1999. Single molecule analysis of DNA replication. *Biochimie.* 81:859-71.
- Hiratani, I., T. Ryba, M. Itoh, J. Rathjen, M. Kulik, B. Papp, E. Fussner, D.P. Bazett-Jones, K. Plath, S. Dalton, P.D. Rathjen, and D.M. Gilbert. 2010. Genome-wide dynamics of replication timing revealed by in vitro models of mouse embryogenesis. *Genome Res.* 20:155-69.

- Hiratani, I., T. Ryba, M. Itoh, T. Yokochi, M. Schwaiger, C.W. Chang, Y. Lyou, T.M. Townes, D. Schubeler, and D.M. Gilbert. 2008. Global reorganization of replication domains during embryonic stem cell differentiation. *PLoS Biol.* 6:e245.
- Hu, C.M., M.T. Yeh, N. Tsao, C.W. Chen, Q.Z. Gao, C.Y. Chang, M.H. Lee, J.M. Fang, S.Y. Sheu, C.J. Lin, M.C. Tseng, Y.J. Chen, and Z.F. Chang. 2012. Tumor Cells Require Thymidylate Kinase to Prevent dUTP Incorporation during DNA Repair. *Cancer Cell.* 22:36-50.
- Huang, M., Z. Zhou, and S.J. Elledge. 1998. The DNA replication and damage checkpoint pathways induce transcription by inhibition of the Crt1 repressor. *Cell.* 94:595-605.
- Huberman, J.A., and A.D. Riggs. 1968. On the mechanism of DNA replication in mammalian chromosomes. *J Mol Biol.* 32:327-41.
- Huberman, J.A., L.D. Spotila, K.A. Nawotka, S.M. el-Assouli, and L.R. Davis. 1987. The in vivo replication origin of the yeast 2 microns plasmid. *Cell.* 51:473-81.
- Huppert, J.L., and S. Balasubramanian. 2005. Prevalence of quadruplexes in the human genome. *Nucleic Acids Res.* 33:2908-16.
- Hyrien, O., and A. Goldar. 2010. Mathematical modelling of eukaryotic DNA replication. *Chromosome Res.* 18:147-61.
- Hyrien, O., C. Maric, and M. Mechali. 1995. Transition in specification of embryonic metazoan DNA replication origins. *Science.* 270:994-7.
- Hyrien, O., and M. Mechali. 1993. Chromosomal replication initiates and terminates at random sequences but at regular intervals in the ribosomal DNA of *Xenopus* early embryos. *EMBO J.* 12:4511-20.
- Ibarra, A., E. Schwob, and J. Mendez. 2008. Excess MCM proteins protect human cells from replicative stress by licensing backup origins of replication. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 105:8956-61.
- Ilves, I., T. Petojevic, J.J. Pesavento, and M.R. Botchan. 2010. Activation of the MCM2-7 helicase by association with Cdc45 and GINS proteins. *Mol Cell.* 37:247-58.
- Jacob, F., and S. Brenner. 1963. [On the regulation of DNA synthesis in bacteria: the hypothesis of the replicon]. *C R Hebd Seances Acad Sci.* 256:298-300.
- Jacquier, A. 2009. The complex eukaryotic transcriptome: unexpected pervasive transcription and novel small RNAs. *Nat Rev Genet.* 10:833-44.
- Jensen, R.A., D.L. Page, and J.T. Holt. 1994. Identification of genes expressed in premalignant breast disease by microscopy-directed cloning. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 91:9257-61.
- Jones, R.M., and E. Petermann. 2012. Replication fork dynamics and the DNA damage response. *Biochem J.* 443:13-26.
- Kalejta, R.F., X. Li, L.D. Mesner, P.A. Dijkwel, H.B. Lin, and J.L. Hamlin. 1998. Distal sequences, but not ori-beta/OBR-1, are essential for initiation of DNA replication in the Chinese hamster DHFR origin. *Mol Cell.* 2:797-806.
- Karnani, N., C.M. Taylor, A. Malhotra, and A. Dutta. 2010. Genomic study of replication initiation in human chromosomes reveals the influence of transcription regulation and chromatin structure on origin selection. *Mol Biol Cell.* 21:393-404.
- Kashlan, O.B., and B.S. Cooperman. 2003. Comprehensive model for allosteric regulation of mammalian ribonucleotide reductase: refinements and consequences. *Biochemistry.* 42:1696-706.
- Katsuno, Y., A. Suzuki, K. Sugimura, K. Okumura, D.H. Zineldeen, M. Shimada, H. Niida, T. Mizuno, F. Hanaoka, and M. Nakanishi. 2009. Cyclin A-Cdk1 regulates the origin firing program in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 106:3184-9.
- Kemp, M.G., A.C. Mason, A. Carreira, J.T. Reardon, S.J. Haring, G.E. Borgstahl, S.C. Kowalczykowski, A. Sancar, and M.S. Wold. 2010. An alternative form of replication protein expressed in normal human tissues supports DNA repair. *J Biol Chem.* 285:4788-97.
- Kim, J., L.J. Wheeler, R. Shen, and C.K. Mathews. 2005. Protein-DNA interactions in the T4 dNTP synthetase complex dependent on gene 32 single-stranded DNA-binding protein. *Mol Microbiol.* 55:1502-14.

- Kim, S.M., D.D. Dubey, and J.A. Huberman. 2003. Early-replicating heterochromatin. *Genes Dev.* 17:330-5.
- Kimura, T., S. Takeda, Y. Sagiya, M. Gotoh, Y. Nakamura, and H. Arakawa. 2003. Impaired function of p53R2 in Rrm2b-null mice causes severe renal failure through attenuation of dNTP pools. *Nat Genet.* 34:440-5.
- Kraakman-van der Zwet, M., W.J. Overkamp, R.E. van Lange, J. Essers, A. van Duijn-Goedhart, I. Wiggers, S. Swaminathan, P.P. van Buul, A. Errami, R.T. Tan, N.G. Jaspers, S.K. Sharan, R. Kanaar, and M.Z. Zdzienicka. 2002. Brca2 (XRCC11) deficiency results in radioresistant DNA synthesis and a higher frequency of spontaneous deletions. *Mol Cell Biol.* 22:669-79.
- Krude, T., C.P. Christov, O. Hyrien, and K. Marheineke. 2009. Y RNA functions at the initiation step of mammalian chromosomal DNA replication. *J Cell Sci.* 122:2836-45.
- Kumagai, A., A. Shevchenko, and W.G. Dunphy. 2010. Treslin collaborates with TopBP1 in triggering the initiation of DNA replication. *Cell.* 140:349-59.
- Kumar, D., A.L. Abdulovic, J. Viberg, A.K. Nilsson, T.A. Kunkel, and A. Chabes. 2011. Mechanisms of mutagenesis in vivo due to imbalanced dNTP pools. *Nucleic Acids Res.*
- Kumar, D., J. Viberg, A.K. Nilsson, and A. Chabes. 2010. Highly mutagenic and severely imbalanced dNTP pools can escape detection by the S-phase checkpoint. *Nucleic Acids Res.* 38:3975-83.
- Lambert, S., and B.S. Lopez. 2000. Characterization of mammalian RAD51 double strand break repair using non-lethal dominant-negative forms. *EMBO J.* 19:3090-9.
- Larrieu, D., D. Ythier, R. Binet, C. Brambilla, E. Brambilla, S. Sengupta, and R. Pedoux. 2009. ING2 controls the progression of DNA replication forks to maintain genome stability. *EMBO Rep.* 10:1168-74.
- Laskey, R.A., and M.A. Madine. 2003. A rotary pumping model for helicase function of MCM proteins at a distance from replication forks. *EMBO Rep.* 4:26-30.
- Laulier, C., A. Cheng, and J.M. Stark. 2011. The relative efficiency of homology-directed repair has distinct effects on proper anaphase chromosome separation. *Nucleic Acids Res.* 39:5935-44.
- Le Beau, M.M., F.V. Rassool, M.E. Neilly, R. Espinosa, 3rd, T.W. Glover, D.I. Smith, and T.W. McKeithan. 1998. Replication of a common fragile site, FRA3B, occurs late in S phase and is delayed further upon induction: implications for the mechanism of fragile site induction. *Hum Mol Genet.* 7:755-61.
- Le Tallec, B., B. Dutrillaux, A.M. Lachages, G.A. Millot, O. Brison, and M. Debatisse. 2011. Molecular profiling of common fragile sites in human fibroblasts. *Nat Struct Mol Biol.* 18:1421-3.
- Lebofsky, R., R. Heilig, M. Sonnleitner, J. Weissenbach, and A. Bensimon. 2006. DNA replication origin interference increases the spacing between initiation events in human cells. *Mol Biol Cell.* 17:5337-45.
- Lee, C., B. Hong, J.M. Choi, Y. Kim, S. Watanabe, Y. Ishimi, T. Enomoto, S. Tada, and Y. Cho. 2004. Structural basis for inhibition of the replication licensing factor Cdt1 by geminin. *Nature.* 430:913-7.
- Lee, Y.D., J. Wang, J. Stubbe, and S.J. Elledge. 2008. Dif1 is a DNA-damage-regulated facilitator of nuclear import for ribonucleotide reductase. *Mol Cell.* 32:70-80.
- Lenhard, B., A. Sandelin, and P. Carninci. 2012. Metazoan promoters: emerging characteristics and insights into transcriptional regulation. *Nat Rev Genet.* 13:233-45.
- Letessier, A., G.A. Millot, S. Koundrioukoff, A.M. Lachages, N. Vogt, R.S. Hansen, B. Malfoy, O. Brison, and M. Debatisse. 2011. Cell-type-specific replication initiation programs set fragility of the FRA3B fragile site. *Nature.* 470:120-3.
- Lima-de-Faria, A., and H. Jaworska. 1968. Late DNA synthesis in heterochromatin. *Nature.* 217:138-42.
- Liu, G., M. Malott, and M. Leffak. 2003. Multiple functional elements comprise a Mammalian chromosomal replicator. *Mol Cell Biol.* 23:1832-42.

- Liu, Q., S. Guntuku, X.S. Cui, S. Matsuoka, D. Cortez, K. Tamai, G. Luo, S. Carattini-Rivera, F. DeMayo, A. Bradley, L.A. Donehower, and S.J. Elledge. 2000. Chk1 is an essential kinase that is regulated by Atr and required for the G(2)/M DNA damage checkpoint. *Genes Dev.* 14:1448-59.
- Liu, X., L. Lai, X. Wang, L. Xue, S. Leora, J. Wu, S. Hu, K. Zhang, M.L. Kuo, L. Zhou, H. Zhang, Y. Wang, B. Zhou, R.A. Nelson, S. Zheng, S. Zhang, P. Chu, and Y. Yen. 2011. Ribonucleotide reductase small subunit M2B prognoses better survival in colorectal cancer. *Cancer Res.* 71:3202-13.
- Lopez-Mosqueda, J., N.L. Maas, Z.O. Jonsson, L.G. Defazio-Eli, J. Wohlschlegel, and D.P. Toczyski. 2010. Damage-induced phosphorylation of Sld3 is important to block late origin firing. *Nature.* 467:479-83.
- Lord, C.J., and A. Ashworth. 2012. The DNA damage response and cancer therapy. *Nature.* 481:287-94.
- Lubelsky, Y., N. Reuven, and Y. Shaul. 2005. Autorepression of rfx1 gene expression: functional conservation from yeast to humans in response to DNA replication arrest. *Mol Cell Biol.* 25:10665-73.
- Lubelsky, Y., T. Sasaki, M.A. Kuipers, I. Lucas, M.M. Le Beau, S. Carignon, M. Debatisse, J.A. Prinz, J.H. Dennis, and D.M. Gilbert. 2011. Pre-replication complex proteins assemble at regions of low nucleosome occupancy within the Chinese hamster dihydrofolate reductase initiation zone. *Nucleic Acids Res.*
- Lucas, I., A. Palakodeti, Y. Jiang, D.J. Young, N. Jiang, A.A. Fernald, and M.M. Le Beau. 2007. High-throughput mapping of origins of replication in human cells. *EMBO Rep.* 8:770-7.
- Luccioni, C., M. Muleris, L. Sabatier, and B. Dutrillaux. 1988. Chromosomal and enzymatic patterns provide evidence for two types of human colon cancers with abnormal nucleotide metabolism. *Mutat Res.* 200:55-62.
- Lukas, J., C. Lukas, and J. Bartek. 2011. More than just a focus: The chromatin response to DNA damage and its role in genome integrity maintenance. *Nat Cell Biol.* 13:1161-9.
- Luo, J., N.L. Solimini, and S.J. Elledge. 2009. Principles of cancer therapy: oncogene and non-oncogene addiction. *Cell.* 136:823-37.
- Lutzmann, M., D. Maiorano, and M. Mechali. 2006. A Cdt1-geminin complex licenses chromatin for DNA replication and prevents rereplication during S phase in *Xenopus*. *EMBO J.* 25:5764-74.
- Lutzmann, M., and M. Mechali. 2008. MCM9 binds Cdt1 and is required for the assembly of prereplication complexes. *Mol Cell.* 31:190-200.
- MacAlpine, D.M., H.K. Rodriguez, and S.P. Bell. 2004. Coordination of replication and transcription along a *Drosophila* chromosome. *Genes Dev.* 18:3094-105.
- MacAlpine, H.K., R. Gordan, S.K. Powell, A.J. Hartemink, and D.M. MacAlpine. 2010. *Drosophila* ORC localizes to open chromatin and marks sites of cohesin complex loading. *Genome Res.* 20:201-11.
- Mace, G., M. Bogliolo, J.H. Guervilly, J.A. Dugas du Villard, and F. Rosselli. 2005. 3R coordination by Fanconi anemia proteins. *Biochimie.* 87:647-58.
- Mahaney, B.L., K. Meek, and S.P. Lees-Miller. 2009. Repair of ionizing radiation-induced DNA double-strand breaks by non-homologous end-joining. *Biochem J.* 417:639-50.
- Mahbubani, H.M., J.P. Chong, S. Chevalier, P. Thommes, and J.J. Blow. 1997. Cell cycle regulation of the replication licensing system: involvement of a Cdk-dependent inhibitor. *J Cell Biol.* 136:125-35.
- Mailand, N., J. Falck, C. Lukas, R.G. Syljuasen, M. Welcker, J. Bartek, and J. Lukas. 2000. Rapid destruction of human Cdc25A in response to DNA damage. *Science.* 288:1425-9.
- Malinsky, J., K. Koberna, D. Stanek, M. Masata, I. Votruba, and I. Raska. 2001. The supply of exogenous deoxyribonucleotides accelerates the speed of the replication fork in early S-phase. *J Cell Sci.* 114:747-50.

- Mantiero, D., A. Mackenzie, A. Donaldson, and P. Zegerman. 2011. Limiting replication initiation factors execute the temporal programme of origin firing in budding yeast. *EMBO J.* 30:4805-14.
- Marahrens, Y., and B. Stillman. 1992. A yeast chromosomal origin of DNA replication defined by multiple functional elements. *Science.* 255:817-23.
- Marheineke, K., and O. Hyrien. 2004. Control of replication origin density and firing time in *Xenopus* egg extracts: role of a caffeine-sensitive, ATR-dependent checkpoint. *J Biol Chem.* 279:28071-81.
- Martomo, S.A., and C.K. Mathews. 2002. Effects of biological DNA precursor pool asymmetry upon accuracy of DNA replication in vitro. *Mutat Res.* 499:197-211.
- Mathews, C.K., T.W. North, and G. Prem veer Reddy. 1978. Multienzyme complexes in DNA precursor biosynthesis. *Adv Enzyme Regul.* 17:133-56.
- Mathews, C.K., and N.K. Sinha. 1982. Are DNA precursors concentrated at replication sites? *Proc Natl Acad Sci U S A.* 79:302-6.
- Matsuyama, M., H. Goto, K. Kasahara, Y. Kawakami, M. Nakanishi, T. Kiyono, N. Goshima, and M. Inagaki. 2011. Nuclear Chk1 prevents premature mitotic entry. *J Cell Sci.* 124:2113-9.
- Maya-Mendoza, A., E. Petermann, D.A. Gillespie, K.W. Caldecott, and D.A. Jackson. 2007. Chk1 regulates the density of active replication origins during the vertebrate S phase. *Embo J.* 26:2719-31.
- Mechali, M. 2010. Eukaryotic DNA replication origins: many choices for appropriate answers. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 11:728-38.
- Mendez, J., and B. Stillman. 2000. Chromatin association of human origin recognition complex, cdc6, and minichromosome maintenance proteins during the cell cycle: assembly of prereplication complexes in late mitosis. *Mol Cell Biol.* 20:8602-12.
- Merrick, C.J., D. Jackson, and J.F. Diffley. 2004. Visualization of altered replication dynamics after DNA damage in human cells. *J Biol Chem.* 279:20067-75.
- Mesner, L.D., E.L. Crawford, and J.L. Hamlin. 2006. Isolating apparently pure libraries of replication origins from complex genomes. *Mol Cell.* 21:719-26.
- Mesner, L.D., and J.L. Hamlin. 2005. Specific signals at the 3' end of the DHFR gene define one boundary of the downstream origin of replication. *Genes Dev.* 19:1053-66.
- Mesner, L.D., V. Valsakumar, N. Karnani, A. Dutta, J.L. Hamlin, and S. Bekiranov. 2011. Bubble-chip analysis of human origin distributions demonstrates on a genomic scale significant clustering into zones and significant association with transcription. *Genome Res.* 21:377-89.
- Messer, W. 2002. The bacterial replication initiator DnaA. DnaA and oriC, the bacterial mode to initiate DNA replication. *FEMS Microbiol Rev.* 26:355-74.
- Michalet, X., R. Ekong, F. Fougerousse, S. Rousseaux, C. Schurra, N. Hornigold, M. van Slegtenhorst, J. Wolfe, S. Povey, J.S. Beckmann, and A. Bensimon. 1997. Dynamic molecular combing: stretching the whole human genome for high-resolution studies. *Science.* 277:1518-23.
- Miotto, B., and K. Struhl. 2010. HBO1 histone acetylase activity is essential for DNA replication licensing and inhibited by Geminin. *Mol Cell.* 37:57-66.
- Montagnoli, A., B. Valsasina, V. Croci, M. Menichincheri, S. Rainoldi, V. Marchesi, M. Tibolla, P. Tenca, D. Brotherton, C. Albanese, V. Patton, R. Alzani, A. Ciavolella, F. Sola, A. Molinari, D. Volpi, N. Avanzi, F. Fiorentini, M. Cattoni, S. Healy, D. Ballinari, E. Pesenti, A. Isacchi, J. Moll, A. Bensimon, E. Vanotti, and C. Santocanale. 2008. A Cdc7 kinase inhibitor restricts initiation of DNA replication and has antitumor activity. *Nat Chem Biol.* 4:357-65.
- Moyer, S.E., P.W. Lewis, and M.R. Botchan. 2006. Isolation of the Cdc45/Mcm2-7/GINS (CMG) complex, a candidate for the eukaryotic DNA replication fork helicase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103:10236-41.
- Murga, M., S. Bunting, M.F. Montana, R. Soria, F. Mulero, M. Canamero, Y. Lee, P.J. McKinnon, A. Nussenzweig, and O. Fernandez-Capetillo. 2009. A mouse model of

- ATR-Seckel shows embryonic replicative stress and accelerated aging. *Nat Genet.* 41:891-8.
- Murthy, S., and G.P. Reddy. 2006. Replitase: complete machinery for DNA synthesis. *J Cell Physiol.* 209:711-7.
- Nakanishi, M., Y. Katsuno, H. Niida, H. Murakami, and M. Shimada. 2010. Chk1-cyclin A/Cdk1 axis regulates origin firing programs in mammals. *Chromosome Res.* 18:103-13.
- Negrini, S., V.G. Gorgoulis, and T.D. Halazonetis. 2010. Genomic instability--an evolving hallmark of cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 11:220-8.
- Neri, L.M., G. Mazzotti, S. Capitani, N.M. Maraldi, C. Cinti, N. Baldini, R. Rana, and A.M. Martelli. 1992. Nuclear matrix-bound replicational sites detected in situ by 5-bromodeoxyuridine. *Histochemistry.* 98:19-32.
- Nestoras, K., A.H. Mohammed, A.S. Schreurs, O. Fleck, A.T. Watson, M. Poitelea, C. O'Shea, C. Chahwan, C. Holmberg, B.B. Kragelund, O. Nielsen, M. Osborne, A.M. Carr, and C. Liu. 2010. Regulation of ribonucleotide reductase by Spd1 involves multiple mechanisms. *Genes Dev.* 24:1145-59.
- Nicander, B., and P. Reichard. 1985. Relations between synthesis of deoxyribonucleotides and DNA replication in 3T6 fibroblasts. *J Biol Chem.* 260:5376-81.
- Nieduszynski, C.A., S. Hiraga, P. Ak, C.J. Benham, and A.D. Donaldson. 2007. OriDB: a DNA replication origin database. *Nucleic Acids Res.* 35:D40-6.
- Niida, H., Y. Katsuno, B. Banerjee, M.P. Hande, and M. Nakanishi. 2007. Specific role of Chk1 phosphorylations in cell survival and checkpoint activation. *Mol Cell Biol.* 27:2572-81.
- Niida, H., Y. Katsuno, M. Sengoku, M. Shimada, M. Yukawa, M. Ikura, T. Ikura, K. Kohno, H. Shima, H. Suzuki, S. Tashiro, and M. Nakanishi. 2010a. Essential role of Tip60-dependent recruitment of ribonucleotide reductase at DNA damage sites in DNA repair during G1 phase. *Genes Dev.* 24:333-8.
- Niida, H., M. Shimada, H. Murakami, and M. Nakanishi. 2010b. Mechanisms of dNTP supply that play an essential role in maintaining genome integrity in eukaryotic cells. *Cancer Sci.* 101:2505-9.
- Niida, H., S. Tsuge, Y. Katsuno, A. Konishi, N. Takeda, and M. Nakanishi. 2005. Depletion of Chk1 leads to premature activation of Cdc2-cyclin B and mitotic catastrophe. *J Biol Chem.* 280:39246-52.
- Nikolaev, V.O., S. Gambaryan, and M.J. Lohse. 2006. Fluorescent sensors for rapid monitoring of intracellular cGMP. *Nat Methods.* 3:23-5.
- Nikolaev, V.O., A. Moshkov, A.R. Lyon, M. Miragoli, P. Novak, H. Paur, M.J. Lohse, Y.E. Korchev, S.E. Harding, and J. Gorelik. 2010. Beta2-adrenergic receptor redistribution in heart failure changes cAMP compartmentation. *Science.* 327:1653-7.
- Nordlund, P., and P. Reichard. 2006. Ribonucleotide reductases. *Annu Rev Biochem.* 75:681-706.
- Norio, P., S. Kosiyatrakul, Q. Yang, Z. Guan, N.M. Brown, S. Thomas, R. Riblet, and C.L. Schildkraut. 2005. Progressive activation of DNA replication initiation in large domains of the immunoglobulin heavy chain locus during B cell development. *Mol Cell.* 20:575-87.
- Norseen, J., A. Thomae, V. Sridharan, A. Aiyar, A. Schepers, and P.M. Lieberman. 2008. RNA-dependent recruitment of the origin recognition complex. *EMBO J.* 27:3024-35.
- O'Driscoll, M., V.L. Ruiz-Perez, C.G. Woods, P.A. Jeggo, and J.A. Goodship. 2003. A splicing mutation affecting expression of ataxia-telangiectasia and Rad3-related protein (ATR) results in Seckel syndrome. *Nat Genet.* 33:497-501.
- Ozeri-Galai, E., R. Lebofsky, A. Rahat, A.C. Bester, A. Bensimon, and B. Kerem. 2011. Failure of origin activation in response to fork stalling leads to chromosomal instability at fragile sites. *Mol Cell.* 43:122-31.
- Ozeri-Galai, E., M. Schwartz, A. Rahat, and B. Kerem. 2008. Interplay between ATM and ATR in the regulation of common fragile site stability. *Oncogene.* 27:2109-17.

- Paige, J.S., T. Nguyen-Duc, W. Song, and S.R. Jaffrey. 2012. Fluorescence imaging of cellular metabolites with RNA. *Science*. 335:1194.
- Paixao, S., I.N. Colaluca, M. Cubells, F.A. Peverali, A. Destro, S. Giadrossi, M. Giacca, A. Falaschi, S. Riva, and G. Biamonti. 2004. Modular structure of the human lamin B2 replicator. *Mol Cell Biol*. 24:2958-67.
- Panzeter, P.L., and D.P. Ringer. 1993. DNA precursors are channelled to nuclear matrix DNA replication sites. *Biochem J*. 293 (Pt 3):775-9.
- Pardoll, D.M., B. Vogelstein, and D.S. Coffey. 1980. A fixed site of DNA replication in eucaryotic cells. *Cell*. 19:527-36.
- Pasero, P., A. Bensimon, and E. Schwob. 2002. Single-molecule analysis reveals clustering and epigenetic regulation of replication origins at the yeast rDNA locus. *Genes Dev*. 16:2479-84.
- Pasero, P., K. Shimada, and B.P. Duncker. 2003. Multiple roles of replication forks in S phase checkpoints: sensors, effectors and targets. *Cell Cycle*. 2:568-72.
- Petermann, E., and T. Helleday. 2010. Pathways of mammalian replication fork restart. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 11:683-7.
- Petermann, E., T. Helleday, and K.W. Caldecott. 2008. Claspin promotes normal replication fork rates in human cells. *Mol Biol Cell*. 19:2373-8.
- Petermann, E., M. Woodcock, and T. Helleday. 2010. Chk1 promotes replication fork progression by controlling replication initiation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 107:16090-5.
- Poli, J., O. Tsaponina, L. Crabbe, A. Keszthelyi, V. Pantesco, A. Chabes, A. Lengronne, and P. Pasero. 2012. dNTP pools determine fork progression and origin usage under replication stress. *EMBO J*.
- Pontarin, G., P. Ferraro, P. Hakansson, L. Thelander, P. Reichard, and V. Bianchi. 2007. p53R2-dependent ribonucleotide reduction provides deoxyribonucleotides in quiescent human fibroblasts in the absence of induced DNA damage. *J Biol Chem*. 282:16820-8.
- Pontarin, G., P. Ferraro, C. Rampazzo, G. Kollberg, E. Holme, P. Reichard, and V. Bianchi. 2011. Deoxyribonucleotide metabolism in cycling and resting human fibroblasts with a missense mutation in p53R2, a subunit of ribonucleotide reductase. *J Biol Chem*. 286:11132-40.
- Pontarin, G., A. Fijolek, P. Pizzo, P. Ferraro, C. Rampazzo, T. Pozzan, L. Thelander, P.A. Reichard, and V. Bianchi. 2008. Ribonucleotide reduction is a cytosolic process in mammalian cells independently of DNA damage. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 105:17801-6.
- Pope, B.D., I. Hiratani, and D.M. Gilbert. 2010. Domain-wide regulation of DNA replication timing during mammalian development. *Chromosome Res*. 18:127-36.
- Prem veer Reddy, G., and A.B. Pardee. 1980. Multienzyme complex for metabolic channeling in mammalian DNA replication. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 77:3312-16.
- Raghuraman, M.K., E.A. Winzeler, D. Collingwood, S. Hunt, L. Wodicka, A. Conway, D.J. Lockhart, R.W. Davis, B.J. Brewer, and W.L. Fangman. 2001. Replication dynamics of the yeast genome. *Science*. 294:115-21.
- Ragland, R.L., M.F. Arlt, E.D. Hughes, T.L. Saunders, and T.W. Glover. 2009. Mice hypomorphic for Atr have increased DNA damage and abnormal checkpoint response. *Mamm Genome*. 20:375-85.
- Reddy, G.P., and C.K. Mathews. 1978. Functional compartmentation of DNA precursors in T4 phage-infected bacteria. *J Biol Chem*. 253:3461-7.
- Reddy, G.P., A. Singh, M.E. Stafford, and C.K. Mathews. 1977. Enzyme associations in T4 phage DNA precursor synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 74:3152-6.
- Reichard, P. 1985. Ribonucleotide reductase and deoxyribonucleotide pools. *Basic Life Sci*. 31:33-45.
- Reinhardt, H.C., and B. Schumacher. 2012. The p53 network: cellular and systemic DNA damage responses in aging and cancer. *Trends Genet*. 28:128-36.

- Remus, D., F. Beuron, G. Tolun, J.D. Griffith, E.P. Morris, and J.F. Diffley. 2009. Concerted loading of Mcm2-7 double hexamers around DNA during DNA replication origin licensing. *Cell*. 139:719-30.
- Ritzi, M., M. Baack, C. Musahl, P. Romanowski, R.A. Laskey, and R. Knippers. 1998. Human minichromosome maintenance proteins and human origin recognition complex 2 protein on chromatin. *J Biol Chem*. 273:24543-9.
- Robert, T., F. Vanoli, I. Chiolo, G. Shubassi, K.A. Bernstein, R. Rothstein, O.A. Botrugno, D. Parazzoli, A. Oldani, S. Minucci, and M. Foiani. 2011. HDACs link the DNA damage response, processing of double-strand breaks and autophagy. *Nature*. 471:74-9.
- Ryba, T., I. Hiratani, J. Lu, M. Itoh, M. Kulik, J. Zhang, T.C. Schulz, A.J. Robins, S. Dalton, and D.M. Gilbert. 2010. Evolutionarily conserved replication timing profiles predict long-range chromatin interactions and distinguish closely related cell types. *Genome Res*. 20:761-70.
- Saada, A. 2009. Fishing in the (deoxyribonucleotide) pool. *Biochem J*. 422:e3-6.
- Santocanale, C., and J.F. Diffley. 1998. A Mec1- and Rad53-dependent checkpoint controls late-firing origins of DNA replication. *Nature*. 395:615-8.
- Schepers, A., and P. Papior. 2010. Why are we where we are? Understanding replication origins and initiation sites in eukaryotes using ChIP-approaches. *Chromosome Res*. 18:63-77.
- Scholefield, G., J.W. Veening, and H. Murray. 2011. DnaA and ORC: more than DNA replication initiators. *Trends Cell Biol*. 21:188-94.
- Schreiber, V., F. Dantzer, J.C. Ame, and G. de Murcia. 2006. Poly(ADP-ribose): novel functions for an old molecule. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 7:517-28.
- Scorah, J., M.Q. Dong, J.R. Yates, 3rd, M. Scott, D. Gillespie, and C.H. McGowan. 2008. A conserved proliferating cell nuclear antigen-interacting protein sequence in Chk1 is required for checkpoint function. *J Biol Chem*. 283:17250-9.
- Scorah, J., and C.H. McGowan. 2009. Claspin and Chk1 regulate replication fork stability by different mechanisms. *Cell Cycle*. 8:1036-43.
- Sequeira-Mendes, J., R. Diaz-Uriarte, A. Apedaile, D. Huntley, N. Brockdorff, and M. Gomez. 2009. Transcription initiation activity sets replication origin efficiency in mammalian cells. *PLoS Genet*. 5:e1000446.
- Sequeira-Mendes, J., and M. Gomez. 2012. On the opportunistic nature of transcription and replication initiation in the metazoan genome. *Bioessays*. 34:119-25.
- Shelly, M., B.K. Lim, L. Cancedda, S.C. Heilshorn, H. Gao, and M.M. Poo. 2010. Local and long-range reciprocal regulation of cAMP and cGMP in axon/dendrite formation. *Science*. 327:547-52.
- Sherman, P.A., and J.A. Fyfe. 1989. Enzymatic assay for deoxyribonucleoside triphosphates using synthetic oligonucleotides as template primers. *Anal Biochem*. 180:222-6.
- Shimada, M., H. Niida, D.H. Zineldeen, H. Tagami, M. Tanaka, H. Saito, and M. Nakanishi. 2008. Chk1 is a histone H3 threonine 11 kinase that regulates DNA damage-induced transcriptional repression. *Cell*. 132:221-32.
- Shimura, T., M. Toyoshima, S.K. Adiga, T. Kunoh, H. Nagai, N. Shimizu, M. Inoue, and O. Niwa. 2006. Suppression of replication fork progression in low-dose-specific p53-dependent S-phase DNA damage checkpoint. *Oncogene*. 25:5921-32.
- Shufaro, Y., O. Lacham-Kaplan, B.Z. Tzuberi, J. McLaughlin, A. Trounson, H. Cedar, and B.E. Reubinoff. 2010. Reprogramming of DNA replication timing. *Stem Cells*. 28:443-9.
- Skoog, L., and B. Nordenskjoeld. 1971. Effects of hydroxyurea and 1-beta-D-arabinofuranosyl-cytosine on deoxyribonucleotide pools in mouse embryo cells. *Eur J Biochem*. 19:81-9.
- Smith, J., L.M. Tho, N. Xu, and D.A. Gillespie. 2010. The ATM-Chk2 and ATR-Chk1 pathways in DNA damage signaling and cancer. *Adv Cancer Res*. 108:73-112.
- Sorensen, C.S., L.T. Hansen, J. Dziegielewska, R.G. Syljuasen, C. Lundin, J. Bartek, and T. Helleday. 2005. The cell-cycle checkpoint kinase Chk1 is required for mammalian homologous recombination repair. *Nat Cell Biol*. 7:195-201.

- Sorensen, C.S., and R.G. Syljuasen. 2012. Safeguarding genome integrity: the checkpoint kinases ATR, CHK1 and WEE1 restrain CDK activity during normal DNA replication. *Nucleic Acids Res.* 40:477-86.
- Sorensen, C.S., R.G. Syljuasen, J. Falck, T. Schroeder, L. Ronnstrand, K.K. Khanna, B.B. Zhou, J. Bartek, and J. Lukas. 2003. Chk1 regulates the S phase checkpoint by coupling the physiological turnover and ionizing radiation-induced accelerated proteolysis of Cdc25A. *Cancer Cell.* 3:247-58.
- Soria, G., S.E. Polo, and G. Almouzni. 2012. Prime, repair, restore: the active role of chromatin in the DNA damage response. *Mol Cell.* 46:722-34.
- Speroni, J., M.B. Federico, S.F. Mansilla, G. Soria, and V. Gottifredi. 2012. Kinase-independent function of checkpoint kinase 1 (Chk1) in the replication of damaged DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 109:7344-9.
- Struhl, K., J.R. Cameron, and R.W. Davis. 1976. Functional genetic expression of eukaryotic DNA in Escherichia coli. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 73:1471-5.
- Syljuasen, R.G., C.S. Sorensen, L.T. Hansen, K. Fugger, C. Lundin, F. Johansson, T. Helleday, M. Sehested, J. Lukas, and J. Bartek. 2005. Inhibition of human Chk1 causes increased initiation of DNA replication, phosphorylation of ATR targets, and DNA breakage. *Mol Cell Biol.* 25:3553-62.
- Tanaka, H., H. Arakawa, T. Yamaguchi, K. Shiraishi, S. Fukuda, K. Matsui, Y. Takei, and Y. Nakamura. 2000. A ribonucleotide reductase gene involved in a p53-dependent cell-cycle checkpoint for DNA damage. *Nature.* 404:42-9.
- Tanaka, S., and H. Araki. 2010. Regulation of the initiation step of DNA replication by cyclin-dependent kinases. *Chromosoma.* 119:565-74.
- Tanaka, S., R. Nakato, Y. Katou, K. Shirahige, and H. Araki. 2011. Origin association of Sld3, Sld7, and Cdc45 proteins is a key step for determination of origin-firing timing. *Curr Biol.* 21:2055-63.
- Tanaka, S., T. Umemori, K. Hirai, S. Muramatsu, Y. Kamimura, and H. Araki. 2007. CDK-dependent phosphorylation of Sld2 and Sld3 initiates DNA replication in budding yeast. *Nature.* 445:328-32.
- Taylor, J.H. 1968. Rates of chain growth and units of replication in DNA of mammalian chromosomes. *J Mol Biol.* 31:579-94.
- Taylor, J.H. 1977. Increase in DNA replication sites in cells held at the beginning of S phase. *Chromosoma.* 62:291-300.
- Thelander, L. 2007. Ribonucleotide reductase and mitochondrial DNA synthesis. *Nat Genet.* 39:703-4.
- Timmis, K., F. Cabello, and S.N. Cohen. 1975. Cloning, isolation, and characterization of replication regions of complex plasmid genomes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 72:2242-6.
- Torres-Rosell, J., G. De Piccoli, V. Cordon-Preciado, S. Farmer, A. Jarmuz, F. Machin, P. Pasero, M. Lisby, J.E. Haber, and L. Aragon. 2007. Anaphase onset before complete DNA replication with intact checkpoint responses. *Science.* 315:1411-5.
- Tuduri, S., L. Crabbe, C. Conti, H. Tourriere, H. Holtgreve-Grez, A. Jauch, V. Pantesco, J. De Vos, A. Thomas, C. Theillet, Y. Pommier, J. Tazi, A. Coquelle, and P. Pasero. 2009. Topoisomerase I suppresses genomic instability by preventing interference between replication and transcription. *Nat Cell Biol.* 11:1315-24.
- Tuduri, S., L. Crabbe, H. Tourriere, A. Coquelle, and P. Pasero. 2010a. Does interference between replication and transcription contribute to genomic instability in cancer cells? *Cell Cycle.* 9:1886-92.
- Tuduri, S., H. Tourriere, and P. Pasero. 2010b. Defining replication origin efficiency using DNA fiber assays. *Chromosome Res.* 18:91-102.
- Vafa, O., M. Wade, S. Kern, M. Beeche, T.K. Pandita, G.M. Hampton, and G.M. Wahl. 2002. c-Myc can induce DNA damage, increase reactive oxygen species, and mitigate p53 function: a mechanism for oncogene-induced genetic instability. *Mol Cell.* 9:1031-44.

- Vashee, S., C. Cvetic, W. Lu, P. Simancek, T.J. Kelly, and J.C. Walter. 2003. Sequence-independent DNA binding and replication initiation by the human origin recognition complex. *Genes Dev.* 17:1894-908.
- veer Reddy, G.P., and A.B. Pardee. 1982. Coupled ribonucleoside diphosphate reduction, channeling, and incorporation into DNA of mammalian cells. *J Biol Chem.* 257:12526-31.
- Venditti, P., G. Costanzo, R. Negri, and G. Camilloni. 1994. ABFI contributes to the chromatin organization of *Saccharomyces cerevisiae* ARS1 B-domain. *Biochim Biophys Acta.* 1219:677-89.
- Vermeulen, M., H.C. Eberl, F. Matarese, H. Marks, S. Denissov, F. Butter, K.K. Lee, J.V. Olsen, A.A. Hyman, H.G. Stunnenberg, and M. Mann. 2010. Quantitative interaction proteomics and genome-wide profiling of epigenetic histone marks and their readers. *Cell.* 142:967-80.
- Wang, X., G.O. Bryant, M. Floer, D. Spagna, and M. Ptashne. 2011. An effect of DNA sequence on nucleosome occupancy and removal. *Nat Struct Mol Biol.* 18:507-9.
- Wang, Z., E. Kim, M. Leffak, and Y.J. Xu. 2012. Treslin, DUE-B, and GEMC1 cannot complement Sld3 mutants in fission yeast. *FEMS Yeast Res.* 12:486-90.
- Wheeler, L.J., N.B. Ray, C. Ungermann, S.P. Hendricks, M.A. Bernard, E.S. Hanson, and C.K. Mathews. 1996. T4 phage gene 32 protein as a candidate organizing factor for the deoxyribonucleoside triphosphate synthetase complex. *J Biol Chem.* 271:11156-62.
- White, E.J., O. Emanuelsson, D. Scalzo, T. Royce, S. Kosak, E.J. Oakeley, S. Weissman, M. Gerstein, M. Groudine, M. Snyder, and D. Schubeler. 2004. DNA replication-timing analysis of human chromosome 22 at high resolution and different developmental states. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101:17771-6.
- Wickremasinghe, R.G., J.C. Yaxley, and A.V. Hoffbrand. 1982. Solubilization and partial characterization of a multienzyme complex of DNA synthesis from human lymphoblastoid cells. *Eur J Biochem.* 126:589-96.
- Wickremasinghe, R.G., J.C. Yaxley, and A.V. Hoffbrand. 1983. Gel filtration of a complex of DNA polymerase and DNA precursor-synthesizing enzymes from a human lymphoblastoid cell line. *Biochim Biophys Acta.* 740:243-8.
- Wiegant, W.W., R.M. Overmeer, B.C. Godthelp, P.P. van Buul, and M.Z. Zdzienicka. 2006. Chinese hamster cell mutant, V-C8, a model for analysis of Brca2 function. *Mutat Res.* 600:79-88.
- Willoughby, D., and D.M. Cooper. 2008. Live-cell imaging of cAMP dynamics. *Nat Methods.* 5:29-36.
- Wilsker, D., E. Petermann, T. Helleday, and F. Bunz. 2008. Essential function of Chk1 can be uncoupled from DNA damage checkpoint and replication control. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 105:20752-7.
- Woodfine, K., D.M. Beare, K. Ichimura, S. Debernardi, A.J. Mungall, H. Fiegler, V.P. Collins, N.P. Carter, and I. Dunham. 2005. Replication timing of human chromosome 6. *Cell Cycle.* 4:172-6.
- Wu, P.Y., and P. Nurse. 2009. Establishing the program of origin firing during S phase in fission Yeast. *Cell.* 136:852-64.
- Wu, X., and M. Huang. 2008. Dif1 controls subcellular localization of ribonucleotide reductase by mediating nuclear import of the R2 subunit. *Mol Cell Biol.* 28:7156-67.
- Wyrick, J.J., J.G. Aparicio, T. Chen, J.D. Barnett, E.G. Jennings, R.A. Young, S.P. Bell, and O.M. Aparicio. 2001. Genome-wide distribution of ORC and MCM proteins in *S. cerevisiae*: high-resolution mapping of replication origins. *Science.* 294:2357-60.
- Xiao, Z., Z. Chen, A.H. Gunasekera, T.J. Sowin, S.H. Rosenberg, S. Fesik, and H. Zhang. 2003. Chk1 mediates S and G2 arrests through Cdc25A degradation in response to DNA-damaging agents. *J Biol Chem.* 278:21767-73.
- Xu, J., Y. Yanagisawa, A.M. Tsankov, C. Hart, K. Aoki, N. Kommajosyula, K.E. Steinmann, J. Bochicchio, C. Russ, A. Regev, O.J. Rando, C. Nusbaum, H. Niki, P. Milos, Z. Weng,

- and N. Rhind. 2012. Genome-wide identification and characterization of replication origins by deep sequencing. *Genome Biol.* 13:R27.
- Xu, W., J.G. Aparicio, O.M. Aparicio, and S. Tavaré. 2006. Genome-wide mapping of ORC and Mcm2p binding sites on tiling arrays and identification of essential ARS consensus sequences in *S. cerevisiae*. *BMC Genomics.* 7:276.
- Xue, L., B. Zhou, X. Liu, W. Qiu, Z. Jin, and Y. Yen. 2003. Wild-type p53 regulates human ribonucleotide reductase by protein-protein interaction with p53R2 as well as hRRM2 subunits. *Cancer Res.* 63:980-6.
- Yaffe, E., S. Farkash-Amar, A. Polten, Z. Yakhini, A. Tanay, and I. Simon. 2010. Comparative analysis of DNA replication timing reveals conserved large-scale chromosomal architecture. *PLoS Genet.* 6:e1001011.
- Yamaguchi, T., K. Matsuda, Y. Sagiya, M. Iwadate, M.A. Fujino, Y. Nakamura, and H. Arakawa. 2001. p53R2-dependent pathway for DNA synthesis in a p53-regulated cell cycle checkpoint. *Cancer Res.* 61:8256-62.
- Yao, N.Y., R.E. Georgescu, J. Finkelstein, and M.E. O'Donnell. 2009. Single-molecule analysis reveals that the lagging strand increases replisome processivity but slows replication fork progression. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 106:13236-41.
- Yao, R., Z. Zhang, X. An, B. Bucci, D.L. Perlstein, J. Stubbe, and M. Huang. 2003. Subcellular localization of yeast ribonucleotide reductase regulated by the DNA replication and damage checkpoint pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100:6628-33.
- Yasuda, S., and Y. Hirota. 1977. Cloning and mapping of the replication origin of *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 74:5458-62.
- Yoon, J.H., P. Singh, D.H. Lee, J. Qiu, S. Cai, T.R. O'Connor, Y. Chen, B. Shen, and G.P. Pfeifer. 2005. Characterization of the 3' → 5' exonuclease activity found in human nucleoside diphosphate kinase 1 (NDK1) and several of its homologues. *Biochemistry.* 44:15774-86.
- Zegerman, P., and J.F. Diffley. 2007. Phosphorylation of Sld2 and Sld3 by cyclin-dependent kinases promotes DNA replication in budding yeast. *Nature.* 445:281-5.
- Zegerman, P., and J.F. Diffley. 2010. Checkpoint-dependent inhibition of DNA replication initiation by Sld3 and Dbf4 phosphorylation. *Nature.* 467:474-8.
- Zhang, A.T., A.R. Langley, C.P. Christov, E. Kheir, T. Shafee, T.J. Gardiner, and T. Krude. 2011a. Dynamic interaction of Y RNAs with chromatin and initiation proteins during human DNA replication. *J Cell Sci.* 124:2058-69.
- Zhang, K., S. Hu, J. Wu, L. Chen, J. Lu, X. Wang, X. Liu, B. Zhou, and Y. Yen. 2009a. Overexpression of RRM2 decreases thrombospondin-1 and increases VEGF production in human cancer cells in vitro and in vivo: implication of RRM2 in angiogenesis. *Mol Cancer.* 8:11.
- Zhang, K., J. Wu, X. Wu, X. Wang, Y. Wang, N. Zhou, M.L. Kuo, X. Liu, B. Zhou, L. Chang, D. Ann, and Y. Yen. 2011b. p53R2 inhibits the proliferation of human cancer cells in association with cell-cycle arrest. *Mol Cancer Ther.* 10:269-78.
- Zhang, Y.W., T.L. Jones, S.E. Martin, N.J. Caplen, and Y. Pommier. 2009b. Implication of checkpoint kinase-dependent up-regulation of ribonucleotide reductase R2 in DNA damage response. *J Biol Chem.* 284:18085-95.
- Zhang, Z., C.J. Wippo, M. Wal, E. Ward, P. Korber, and B.F. Pugh. 2011c. A packing mechanism for nucleosome organization reconstituted across a eukaryotic genome. *Science.* 332:977-80.
- Zhao, X., A. Chabes, V. Domkin, L. Thelander, and R. Rothstein. 2001. The ribonucleotide reductase inhibitor Sml1 is a new target of the Mec1/Rad53 kinase cascade during growth and in response to DNA damage. *EMBO J.* 20:3544-53.
- Zhao, X., B. Georgieva, A. Chabes, V. Domkin, J.H. Ippel, J. Schleucher, S. Wijmenga, L. Thelander, and R. Rothstein. 2000. Mutational and structural analyses of the ribonucleotide reductase inhibitor Sml1 define its Rnr1 interaction domain whose inactivation allows suppression of mec1 and rad53 lethality. *Mol Cell Biol.* 20:9076-83.

- Zhao, X., E.G. Muller, and R. Rothstein. 1998. A suppressor of two essential checkpoint genes identifies a novel protein that negatively affects dNTP pools. *Mol Cell*. 2:329-40.
- Zhao, X., and R. Rothstein. 2002. The Dun1 checkpoint kinase phosphorylates and regulates the ribonucleotide reductase inhibitor Sml1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 99:3746-51.
- Zhou, B.B., and J. Bartek. 2004. Targeting the checkpoint kinases: chemosensitization versus chemoprotection. *Nat Rev Cancer*. 4:216-25.
- Zou, L., and S.J. Elledge. 2003. Sensing DNA damage through ATRIP recognition of RPA-ssDNA complexes. *Science*. 300:1542-8.

Annexes

Les annexes regroupent une discussion sur le contrôle du choix des origines et de leur programme spatio-temporel d'activation et les trois publications associées à la partie résultats.

1 - Le choix des origines fonctionnelles et leur programme spatio-temporel d'activation

Cette partie est complémentaire à l'introduction.

2 - Chk1 and Rad51 deficiency perturbs replication dynamics via DDR-mediated modulation of dNTP pools

Hervé Técher, Therese Wilhelm*, Sandra Carignon*, Gaël A. Millot, Bernard S. Lopez, Olivier Brison and Michelle Debatisse

*These authors contributed equally

Publication soumise

3 - Spontaneous mitotic defects in homologous recombination-deficient cells result from slow replication fork velocity

Therese Wilhelm, Aurélia Barascu, Indiana Magdalou, Hervé Técher, Michelle Debatisse and Bernard S. Lopez

Publication soumise

4 - Stepwise activation of DNA-damage checkpoint upon increasing replication stress : impact on common fragile site integrity

Stéphane Koundrioukoff, Sandra Carignon*, Hervé Técher*, Anne Letessier, Olivier Brison and Michelle Debatisse

*These authors contributed equally

Publication soumise

1. Le choix des origines fonctionnelles et leur programme spatio-temporel d'activation.

1.A Chez les métazoaires, séquence origine ou chromatine origine ?

1.A.a L'origine de réplication chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* : l'exception qui ne fait pas la règle.

L'ARS, les séquences origine de *S. cerevisiae*.

Comme mentionné précédemment, les origines de réplication chez *S. cerevisiae* sont définies par la séquence d'ADN ; une exception parmi les eucaryotes. Les origines ont été identifiées par la capacité qu'a un fragment d'ADN génomique cloné dans un plasmide non-répliatif à maintenir ce plasmide au cours des générations. Cette technique du test de réplication autonome (Timmis et al., 1975), qui a d'abord permis d'identifier les origines des procaryotes, a été adaptée à l'étude de *S. cerevisiae*, permettant de découvrir les premières ARS (Struhl et al., 1976). Il a ensuite été montré que la plupart de ces ARS sont des origines de réplication fonctionnelles à leur locus d'origine (Brewer and Fangman, 1987; Huberman et al., 1987). Enfin, l'étude de la séquence de ces ARS (qui s'étendent sur environ 100 pb) a mis à jour une séquence consensus de 11 pb (5'(A/T)TTTAT(A/G)TTT(A/T)3'), nommée ACS (« ARS consensus sequence »). La séquence ACS est essentielle à l'initiation de la réplication sur les plasmides et dans les chromosomes (Marahrens and Stillman, 1992), néanmoins elle n'est pas suffisante. Une ARS est en effet composée de trois domaines (voir (Gilbert, 2004) pour revue). Le domaine A contient l'ACS, il permet le recrutement d'ORC. Le domaine B (boîte B1, B2 et B3) est un domaine d'ouverture de l'ADN riche en AT, mais dépourvu de motif consensus (DUE : « DNA unwinding element »), et intervient aussi dans le recrutement d'ORC (boîte B1). Le domaine C est une plateforme d'interaction protéique entre certains facteurs de transcription ou de réplication, qui n'est pas essentiel au fonctionnement de l'ARS mais stimule son efficacité. Le recrutement des facteurs de réplication peut être directement assisté par des facteurs de transcription, c'est le cas de Abf1 chez *S. cerevisiae* (Venditti et al., 1994). Le génome de *S. cerevisiae* contient 860 séquences ACS parfaites, c'est à dire correspondant strictement à la séquence consensus ACS de 11 pb (Chang et al., 2008a). Mais seulement 400 ARS sont réellement fonctionnelles ; confirmant que l'ACS est nécessaire mais pas suffisante pour déterminer une origine de réplication (Chang et al., 2011). La base de donnée OriDB (www.oridb.org) répertorie l'ensemble des ARS cartographiées et validées (Nieduszynski et al., 2007). L'efficacité d'activation des ARS est variable, seule 100 à 200 ARS, sont réellement utilisées au cours d'une phase S donnée. Parmi cette centaine d'ARS certaines sont très efficaces et

s'activent à chaque cycle de réplication, alors que d'autres ne sont activées que très rarement. Les origines non utilisées constituent un réservoir d'origines latentes (ou dormantes). De plus, la réplication est soumise à un programme temporel d'activation des ARS, on parle de « timing », certaines ARS étant activées précocement et d'autres plus tardivement (Raghuraman et al., 2001; Wyrick et al., 2001) (voir partie 2.E.a). Malgré la présence d'une séquence origine, ces données montrent que des facteurs épigénétiques interviennent pour déterminer l'efficacité et le « timing » d'activation d'une origine chez cette levure.

Si l'on compare les origines de réplication chez *Schizosaccharomyces pombe* à celle de *S. cerevisiae*, on s'aperçoit que l'origine n'est pas définie par une séquence consensus, mais par des motifs riches en AT qui interviennent dans le recrutement de ORC. Les séquences riches en AT sont reconnues par le domaine « AT-hook » de la sous-unité ORC4. Pour conclure, les origines de réplication chez *S. cerevisiae* sont une exception parmi les eucaryotes (voir (Gilbert, 2004; Mechali, 2010) pour revues).

1.A.b Avant l'avènement du « genome wide ».

Comme chez *S. pombe*, chez les métazoaires, ORC ne semble pas avoir de spécificité de séquence dans son mécanisme de reconnaissance de l'origine (MacAlpine et al., 2004; Vashee et al., 2003), aucune sous-unité de ORC ne possède de « AT-hook ». Quels sont les facteurs qui dirigent la fixation du pré-RC au niveau d'un locus origine ? Est-ce que la séquence intervient dans ce processus ? Pour répondre à ces questions, nous pouvons nous appuyer sur les quelques origines métazoaires, cartographiées avant le développement des techniques d'analyse à l'échelle du génome. Le nombre limité de loci décrits dans la littérature (une vingtaine d'origines avait été identifiée) à l'aide de ces techniques ne donnait qu'une vision parcellaire de la nature de l'origine.

1.A.c À la pêche aux origines potentielles : l'immuno-précipitation du pré-RC à la chromatine.

Les sites de fixation d'ORC chez les eucaryotes.

Le chargement du complexe ORC sur l'origine est considéré comme l'étape déterminante qui confère à un segment génomique la capacité de devenir une origine. En théorie alors, il est possible d'identifier les origines de réplication potentielles en immuno-précipitant ORC lié

à la chromatine (ChIP). La fixation d'ORC sur une séquence ne permet pas de dire si le segment chromosomique fixé sera une origine, et marque bien un site potentiel de l'initiation de la réplication. L'identification des origines potentielles peut aussi se faire par ChIP ciblant d'autres membres du pré-RC, comme le complexe MCM. Comme vous le verrez il est difficile de définir une origine potentielle par la reconnaissance d'une seule protéine au sein d'un complexe tel que le pré-RC, composé d'un hétéro hexamère ORC, de Cdt1, de Cdc6, et de deux hétéro hexamères MCM (au moins 14 protéines différentes).

Chez *S. cerevisiae*, le ChIP ORC ne permet pas d'identifier toutes les ACS, et certains sites de fixation de ORC ne sont pas des ACS (Eaton et al., 2010). Le ChIP ORC s'il est couplé au ChIP MCM permet de mieux sélectionner les séquences origine (Wyrick et al., 2001; Xu et al., 2006). Chez *S. cerevisiae* les sites de fixation de ORC sont des régions dépourvues de nucléosomes (« nucleosome free region », NFR), entourées par des nucléosomes positionnés à intervalles réguliers (Eaton et al., 2010). Ces données sont en accord avec l'enrichissement des origines dans des régions pauvres en nucléosomes chez *S. pombe* (Givens et al., 2012). L'ensemble de ces études suggère que les origines potentielles chez les levures sont des NFR.

Chez les métazoaires, l'immuno-précipitation du complexe ORC à la chromatine à l'échelle du génome n'a été publiée que chez *D. melanogaster* (MacAlpine et al., 2010), et constitue donc une étude fondatrice dans le domaine. ORC lie préférentiellement des régions dépourvues de nucléosomes et enrichies en variant d'histone H3.3, qui marquent une ouverture de la chromatine. Il a été observé que 65% des sites ORC sont associés à des TSS (« transcription start site »). ORC semble donc se lier à des régions ouvertes de la chromatine, et aux promoteurs. Les promoteurs étant eux-mêmes des régions souvent accessibles (Wang et al., 2011; Zhang et al., 2011c). Au locus DHFR du hamster Chinois, l'assemblage du pré-RC se fait aussi sur une région pauvre en nucléosomes (Lubelsky et al., 2011), suggérant que la fixation de ORC chez les mammifères pourrait obéir aux mêmes règles que chez *D. melanogaster*. Le choix de l'origine résulte donc, au moins en partie, de l'accessibilité de la chromatine aux facteurs du pré-RC, cette hypothèse devra être confirmée chez les mammifères.

Cependant, une étude, montre que le complexe ORC de mammifère possède la capacité de reconnaître les lysines tri-méthylées des histones (H3K9me3, H3K27me3 et H4K20me3) (Vermeulen et al., 2010). Ceci semble paradoxal puisque ces tri-méthylations des histones sont une marque de fermeture de la chromatine. Ces résultats contradictoires illustrent le

travail qui reste à faire pour comprendre le mode de reconnaissance du complexe ORC pour son site de fixation.

Les difficultés du CHIP contre ORC et les membres du pré-RC.

Techniquement le CHIP ORC est difficile à réaliser, et aucune étude visant à cartographier ORC ou d'autres facteurs du pré-RC à l'échelle du génome chez les mammifères n'est publiée à ce jour. Les raisons expliquant le peu d'efficacité de cette technique sont multiples. Il a été remarqué que le complexe ORC se solubilise facilement, et qu'il est donc difficilement purifié à la chromatine (Sophie Gay, résultats non publiés) (voir (Schepers and Papior, 2010) pour revue). Le complexe MCM quant à lui, forme un cercle autour de l'ADN (Remus et al., 2009), et donc reste plus fréquemment lié à la chromatine. Mais les complexes MCM sont très abondants à la chromatine et ne se localisent pas uniquement à proximité du complexe ORC, leur localisation est donc peu informative (Edwards et al., 2002; Mahubani et al., 1997; Ritzi et al., 1998). Comme mentionné dans le préambule, ORC est multifonctionnel chez les métazoaires. Il est associé, entre autres, au dépôt des cohésines et révèle leurs sites de fixation chez *D. melanogaster* (MacAlpine et al., 2010). Ces résultats illustrent le fait que le complexe ORC est enrichi sur certaines parties du génome qui n'ont pas vocation à devenir des origines (voir (Scholefield et al., 2011) pour revue). Pour pallier ce biais, il faudra confirmer la carte des origines potentielles déterminées par CHIP ORC par le CHIP contre d'autres membres du pré-RC, comme chez la levure. À l'heure actuelle, ces analyses sont à la fois difficile à réaliser, et à interpréter.

1.A.d À la pêche aux origines actives (ou sites d'initiation).

Les techniques permettant de caractériser les origines actives.

L'identification des origines actives peut se faire grâce à la structure de la bulle de réplication (« bubble-trap ») ou par l'isolement des brins naissants courts (« short nascent strands », SNS) issus du site d'initiation (voir la [figure 22](#) illustrant ces techniques) (voir (Gilbert, 2010b) pour revue). Néanmoins ces techniques sont délicates car il faut purifier des intermédiaires de réplication qui ont une durée de vie très courte et qui sont générés à relativement basse fréquence au niveau de la population cellulaire (il a été estimé qu'une origine efficace s'active dans moins de 10% des cycles) (Lebofsky et al., 2006; Norio et al., 2005).

Pour isoler les bulles de réplication (« bubble-trap »), le génome est purifié, puis digéré de façon ménagée par des enzymes de restriction. Les fragments d'ADN sont emprisonnés dans des blocs d'agarose et soumis à une électrophorèse longue. La migration n'est possible que pour les fourches et les ADN double-brins linéaires, les bulles de réplication

restent piégées au niveau du bloc par le maillage de l'agarose. Après extraction des séquences piégées dans le gel, l'ADN est hybridé sur des puces ou séquencé. On peut alors avoir une carte des origines de réplication actives au temps t auquel on a extrait l'ADN (voir (Gilbert, 2010b) pour revue). Cette technique a été mise au point et validée par le laboratoire de J. Hamlin en 2006 (Mesner et al., 2006), cependant les résultats à l'échelle du génome complet ne sont pas encore publiés.

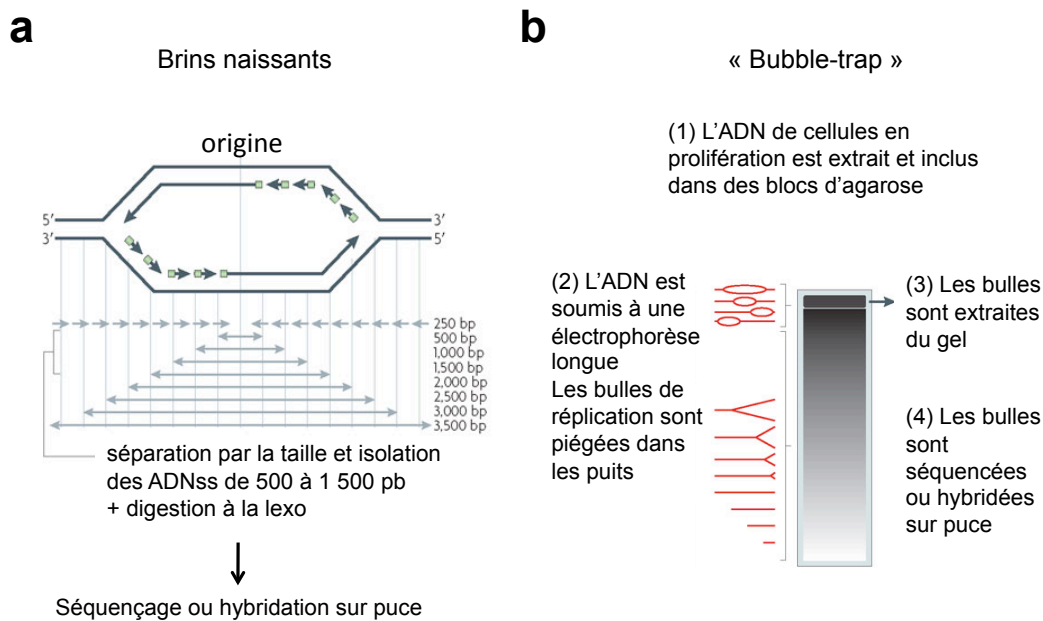


Figure 22 : Les techniques pour identifier les origines actives à l'échelle du génome. (a) Les brins naissants (SNS) sont les ADN nouvellement synthétisés par la machinerie de réplication précoce (brin continu). Leur purification nécessite une sélection par la taille des fragments compris entre 500 et 1 500 pb, pour éliminer les fragments d'okazaki et l'ADN contaminant. Une digestion par l'exonucléase lambda (lexo) permet d'enrichir en brins naissants, car ils sont les seuls à posséder une amorce ARN. Les NS sont finalement hybridés sur puce ou séquencés. (b) La purification des bulles de réplication (« bubble-trap ») repose sur leur structure. Les bulles ne peuvent migrer dans le gel d'agarose, ce qui les sépare des autres molécules d'ADN. Les bulles purifiées à partir du gel peuvent être séquencées. Figure adaptée de Gilbert 2010.

Après dénaturation de l'ADN, les brins naissants sont purifiés par deux étapes successives. Une première étape de discrimination par la taille permet d'éliminer les plus petites molécules qui sont lourdement contaminées par les fragments d'okazaki (50 à 350 pb). Cette étape permet aussi de s'affranchir des grands fragments d'ADN situés à distance des sites d'initiation. La deuxième étape – critique – est une digestion à l'exonucléase λ (Lexo). Cette étape permet d'éliminer les fragments d'ADN contaminant de même taille que les brins naissants d'intérêt, car contrairement aux SNS ils n'ont pas d'amorce ARN à leur extrémité

5'. Sans cette étape de digestion l'ADN récupéré est composé en grande partie d'ADN contaminant (Lucas et al., 2007).

Une méthode alternative consiste à synchroniser les cellules en G1, puis à les relâcher en phase S, souvent en présence d'un inhibiteur de la réplication, comme l'HU. Les brins nouvellement synthétisés sont marqués par un analogue de thymidine (comme le BrdU), ou sont reconnus par l'augmentation du nombre de copies après duplication. Ces techniques mises en oeuvre avec succès chez la levure (Feng et al., 2006; Hayashi et al., 2007; Heichinger et al., 2006; Wu and Nurse, 2009; Xu et al., 2012) et *D. Melanogaster* (MacAlpine et al., 2010), ont confirmé l'association des origines avec des régions pauvres en nucléosomes et des promoteurs. Cependant, l'utilisation de l'HU (ou d'un autre inhibiteur de la réplication) introduit un stress réplicatif qui affecte la dynamique de réplication (Poli et al., 2012), ceci est discuté en parties 2.E.d et 3.D. De plus, ces techniques ne permettent d'isoler que les origines précoces. Malgré ce biais, ces méthodes se sont avérées très efficaces pour comparer les profils de réplication de différents mutants de *S. cerevisiae* (Crabbe et al., 2010).

Quelles sont les caractéristiques des brins naissants ?

Trois études pionnières ont cartographié les brins naissants sur environ 1% du génome humain (région ENCODE) dans des cellules Hela (Cadoret et al., 2008; Karnani et al., 2010), et sur 10 Mb du génome murin dans des cellules souches embryonnaires (ESc) (Sequeira-Mendes et al., 2009). L'ensemble de ces études montre que les SNS sont enrichis à proximité des TSS et d'éléments régulateurs de la transcription. De même, les bulles de réplication sont trouvées préférentiellement au niveau de ces régions (J. Hamlin, résultats non publiés, voir (Gilbert, 2010b) pour revue). Les SNS se répartissent pour environ 50% dans un CpGi, et un peu moins de 50% à l'intérieur des gènes. Comme précédemment, ces résultats indiquent une association des origines avec les unités de transcription.

Récemment les groupes de Marcel Méchali et de Jean-Marc Lemaître, ont étendu la cartographie des SNS chez *D. melanogaster* (cellules Kc), *Mus musculus* (ESc, MEF, P19), et l'homme (IMR-90, Hela, ESc H9, iPSc) (Besnard et al., 2012; Cayrou et al., 2012; Cayrou et al., 2011). Ces données confirment l'enrichissement des SNS au niveau des CpGi et des TSS chez *D. melanogaster* et *M. musculus*. Mais moins de 18% des SNS sont associés à des TSS chez l'homme, alors que la moitié des SNS est localisée dans les gènes, souvent au niveau des premiers introns. Les différences observées entre les données issues de l'analyse de la région ENCODE et du laboratoire de JM. Lemaître chez l'homme, peuvent provenir de la taille de la région ENCODE (1% du génome humain) ou de la profondeur de

séquençage atteinte dans l'étude de JM. Lemaître. Cette profondeur de séquençage permet de détecter les origines peu actives qui n'avaient pas été cartographiées lors des études précédentes, fournissant une cartographie des origines fonctionnelles. Ces données suggèrent que les cellules humaines possèdent un réservoir d'environ 250 000 origines fonctionnelles (Besnard et al., 2012). Avant les années 70, des analyses par autoradiographie de fibres d'ADN ont montrées que chaque chromosome est répliqué par des centaines ou milliers d'origines (Huberman and Riggs, 1968; Taylor, 1968). Ainsi il avait été estimé que le génome humain utilise 20 000 à 50 000 origines pour se répliquer. La différence entre ces études confirme le modèle proposé il y a 20 ans par DePamphilis ; les génomes sont composés d'un excès d'origines potentielles (fonctionnelles), dont une petite partie seulement est activée au cours d'un cycle dans une cellule donnée (voir (DePamphilis, 1993) pour revue).

La richesse en GC des sites d'initiation est une propriété commune à toutes les espèces étudiées, avec un biais de nucléotides autour du site d'initiation, caractérisé par une surreprésentation des G-T en 5', et des C-A en 3'. Ces données suggèrent fortement une certaine conservation de la séquence au niveau des sites d'initiation chez les métazoaires. En effet, les SNS sont à 67% et 90% formés, respectivement chez *D. melanogaster* et la souris, de motifs riches en G (« origin G-rich repeated element », OGRE) (Cayrou et al., 2012). Chez l'homme, 91% des origines cartographiées sont associées à un motif riche en GC ayant le potentiel de former des G-quadruplexes (G4) avec une boucle de 1 à 15 nucléotides (G4 L1-15) (Besnard et al., 2012). De façon surprenante, les motifs OGRE ont aussi le potentiel de former des G4. Les G4 sont des structures secondaires en épingles formées par l'association de plateaux de G au sein d'une répétition (Huppert and Balasubramanian, 2005). De manière indépendante le groupe de Marie-Noëlle Prioleau a également identifié des motifs similaires dans des cellules humaines et de poulet (DT40) (MN. Prioleau, communication personnelle) (Cadoret et al., 2008).

Le motif G4 est-il la séquence origine ?

Des séquences capables de former des G4 pourraient être dépourvues de fonction dans l'initiation, reflétant seulement la richesse en GC des séquences initiateur et leur association à des CpGi. Aussi, ces séquences ne pourront être considérées comme une véritable structure consensus, tant que leur implication dans l'initiation n'aura pas été démontrée. Il faut noter que ce motif riche en G n'a pas été trouvé par ChIP ORC chez *D. melanogaster* (MacAlpine et al., 2010). Toutefois, la distribution et la densité des motifs G4 le long du génome humain est corrélée à la densité locale des origines et à leur efficacité. Suggérant un rôle du motif dans le positionnement du pré-RC et dans l'initiation (Besnard et al., 2012).

Le motif G4 se trouve à 200 pb du site d'initiation, suggérant qu'il n'est pas directement impliqué dans le recrutement d'ORC (Cayrou et al., 2012). Il est connu que de tels éléments de séquence jouent indirectement sur l'exclusion des nucléosomes et la torsion de l'ADN ; des facteurs qui pourraient favoriser la formation de NFR et/ou le recrutement de ORC (Wang et al., 2011; Zhang et al., 2011c). Des études de mutagenèse de motifs G4 sont en cours dans les cellules DT40 (laboratoire de MN. Prioleau), elles devraient permettre de déterminer si ces structures jouent un rôle dans le choix ou l'activation des origines. De plus, il sera intéressant de voir si les études de CHIP ORC ou de « bubble trap » qui seront publiées prochainement confirment la présence d'un motif riche en G capable de former des G4 au niveau des origines chez les métazoaires. Il semble déjà que les différentes techniques ne sont pas équivalentes. En effet, seulement la moitié des origines purifiées par « bubble-trap » dans le laboratoire de J. Hamlin sont retrouvées dans le jeu de données de JM. Lemaître, ceci dans la même lignée cellulaire (Hela) (Besnard et al., 2012; Mesner et al., 2006; Mesner et al., 2011) (voir (Gilbert, 2012) pour revue). Il semblerait donc que la technique de « bubble-trap » permette de purifier certaines origines qui ne peuvent être détectées par purification des SNS. Nous ne savons toujours pas à l'heure actuelle si les origines identifiées par « bubble-trap » possèdent aussi des motifs capables de former des G4.

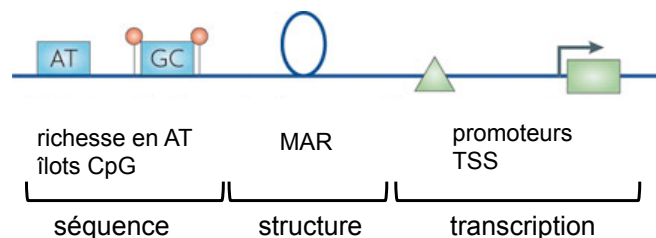


Figure 23 : Les éléments de séquence associés aux origines de réplication. La séquence pourrait intervenir directement dans le choix des origines. Les origines de réplication chez les métazoaires présentent une certaine richesse en di-nucléotides AT et en îlots CpG. Des séquences d'attachement à la matrice nucléaire (MAR), et des éléments de transcription, comme les promoteurs et les sites de démarrage de la transcription (TSS). Les îlots CpG sont souvent retrouvés au niveau des promoteurs des gènes. Figure adaptée de Méchali 2010.

Est-ce que d'autres éléments de séquence interviennent dans le choix des origines ?

La présence d'éléments de séquence, tels que les séquences riches en AT, les répétitions de di-nucléotides, les sites d'attachement à la matrice nucléaire (MAR), les sites de fixation pour des facteurs de transcription, les îlots CpG (CpGi), sont présents au niveau de

certaines origines (voir la [figure 23](#) et ([Aladjem, 2007](#)) pour revue). Lorsque certains sites ou zones d'initiation sont placés à un autre emplacement dans le génome que leur locus d'origine, ils conservent la capacité à initier, suggérant un rôle en *cis* de la séquence dans l'initiation ([Aladjem et al., 1998](#); [Liu et al., 2003](#); [Paixao et al., 2004](#)). Au niveau du locus DHFR, l'initiation est organisée en zone dans une région intergénique en 3' du gène DHFR. La délétion du promoteur du gène DHFR entraîne l'élargissement de cette zone, les événements d'initiations débordant sur le gène DHFR ([Kalejta et al., 1998](#)). La délétion de séquences en 3' du gène DHFR, entraîne l'extension de la région transcrite et l'éloignement des événements d'initiation, à distance de l'extrémité 3' du gène DHFR ([Mesner and Hamlin, 2005](#)). Ces résultats suggèrent un rôle de la séquence dans le choix des origines fonctionnelles. Comme nous le verrons par la suite le choix des origines dépend de l'identité cellulaire, la séquence intervenant probablement peu dans la spécification des origines. Néanmoins, ces éléments de séquence établissent un lien, direct ou indirect, entre les origines de réplication, la transcription et l'architecture du noyau. Les îlots CpG (CpGi) sont des éléments de séquence retrouvés en amont de beaucoup de gènes. La présence de CpGi et de sites de fixation pour des facteurs de transcription, suggère un rôle de la transcription dans le choix des origines. Ce rôle pourrait être direct, à travers une interférence entre transcription et réplication, ou indirect, notamment si la conformation de la chromatine aux promoteurs favorise le recrutement des complexes de réplication.

La matrice nucléaire.

La matrice nucléaire et les boucles de chromatine qui y sont attachées reflètent la structure de la chromatine dans le noyau. Cette structure particulière est révélée par des étapes d'extraction saline des noyaux, qui permettent de décrocher une majorité des protéines chromatiniques, libérant les boucles d'ADN, alors que la matrice nucléaire, résiste à l'extraction. Les séquences qui sont ancrées à la matrice nucléaire sont des MAR. Il avait été observé après marquage à la thymidine tritiée ou au BrdU que la matrice est le support de la réplication ([Berezney and Coffey, 1975](#); [Neri et al., 1992](#); [Pardoll et al., 1980](#)). De plus il est connu qu'entre différentes espèces la taille moyenne d'un réplicon est corrélée à la taille des boucles de chromatine ([Buongiorno-Nardelli et al., 1982](#)). De la même façon, lorsque la densité d'événements d'initiation varie, la taille des boucles de chromatine varie aussi, dans des cellules de hamster Chinois ou humaines ([Courbet et al., 2008](#); [Guillou et al., 2010](#)). En effet, lorsque la densité d'événements d'initiation est forte, les boucles sont petites, alors que lorsque la densité d'événements d'initiation est faible les boucles sont grandes. Il a été montré au sein du locus AMPD2 chez le hamster Chinois, que l'attachement des origines de ce locus à la matrice nucléaire est corrélé à leur efficacité d'activation ([Courbet et al., 2008](#)). Les origines qui ne sont pas ancrées à la matrice nucléaire sont inefficaces, et inversement,

les origines ancrées à la matrice sont efficaces. La matrice nucléaire semble importante dans le choix de l'origine à activer, et suggère que la structure du noyau et de la chromatine sont décisives au cours du processus (voir [figure 24](#)).

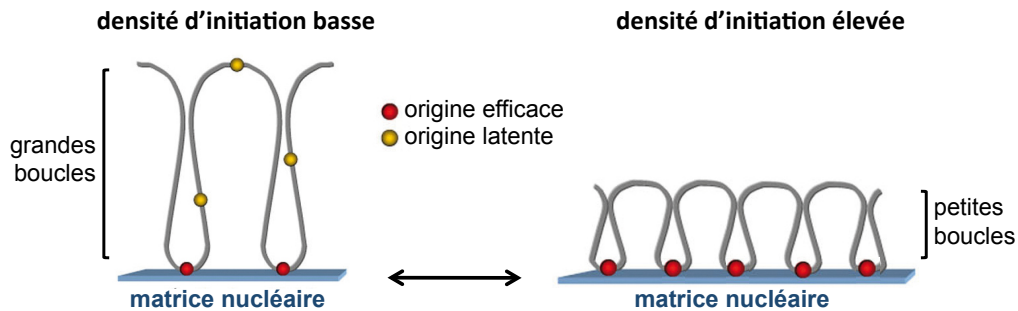


Figure 24 : L'attachement à la matrice nucléaire est corrélé à l'efficacité des origines. La taille des boucles de chromatine est corrélée à la densité d'événements d'initiation, et donc à la taille des réplicons. Il a été observé que les origines efficaces sont ancrées à la matrice nucléaire. Figure adaptée de Courbet 2008.

1.A.e L'origine n'est pas uniquement déterminée par un motif de séquence.

Fixation opportuniste du pré-RC sur des régions de chromatine ouverte.

L'ensemble des études à l'échelle du génome permet d'esquisser un portrait de l'origine de réplication chez les métazoaires. Les sites d'initiation semblent enrichis au niveau des gènes, à proximité directe des TSS, des CpGi, et à l'intérieur des gènes. Cet enrichissement concerne environ la moitié de ces sites, et ne peut donc pas être considéré comme le critère absolu de spécification des origines. Cependant l'association des origines aux promoteurs ne peut pas non plus être fortuite, suggérant que les promoteurs constituent un environnement privilégié pour l'établissement des origines. Les promoteurs sont souvent des régions dépourvues de nucléosomes et constituent des zones de chromatine ouverte (voir [\(Lenhard et al., 2012\)](#) pour revue). Il a été proposé que l'acétylation des histones influence le choix des origines actives, ainsi HBO1, une histone acétyl-transférase importante pour la régulation de l'expression des gènes, assiste le chargement de MCM lors du « licencing » [\(Miotto and Struhl, 2010\)](#). Néanmoins, au niveau du locus AMPD2 chez le hamster Chinois, le niveau d'acétylation n'est pas corrélé au choix des origines actives [\(Gay et al., 2010\)](#). HBO1 pourrait constituer un lien entre transcription et réplication, sans que le niveau d'acétylation lui-même intervienne dans le choix de l'origine. De manière similaire, certains facteurs de transcription ou de remodelage de la chromatine pourraient influencer

indirectement l'environnement chromatinien (Bodmer-Glavas et al., 2001), indépendamment d'une transcription active. Actuellement le modèle privilégié pour expliquer le positionnement des origines propose qu'en absence de reconnaissance d'une séquence spécifique, ORC va profiter de l'ouverture de la chromatine, et notamment par les facteurs de transcription, pour interagir avec l'ADN (voir (Sequeira-Mendes and Gomez, 2012) pour revue). Ainsi la détermination d'une origine résulte d'une combinaison d'éléments de séquence, et de statut de la chromatine favorisant le recrutement du pré-RC. Mais la combinaison de ces facteurs peut varier d'un type cellulaire à un autre, expliquant la variabilité observée du positionnement et de l'efficacité des origines.

Et les ARN non-codants dans tout ça ?

De manière surprenante des petits ARN non-codants Y (ARN Y) sont associés à l'initiation de la réplication (Krude et al., 2009). Les ARN Y interagissent avec ORC et Cdt1, et contribuent potentiellement à l'établissement du pré-RC (Zhang et al., 2011a). De manière similaire, le recrutement d'ORC au niveau de l'origine de réplication du virus de l'Epstein-Barr (EBV), est dirigé par un mécanisme dépendant de l'ARN (Norseen et al., 2008). Les ARN non-codants pourraient jouer à divers niveaux, ils pourraient assister les complexes de réplication dans leur positionnement ou leur activation. De manière indirecte, la découverte des ARN non-codants et de la transcription « pervasive » suggère qu'en dehors des gènes, le nombre des régions transcrites est largement sous estimé (voir (Jacquier, 2009) pour revue). Ainsi le nombre des origines associé à des unités de transcription (TSS, CpGi, gènes) est sans doute aussi sous estimé.

1.B Le programme spatio-temporel de réplication.

1.B.a La réplication est un processus dynamique contrôlé dans l'espace et le temps.

Domaines chromatiniens et nucléaires.

Il est connu depuis longtemps que les chromosomes sont constitués d'une mosaïque de domaines dont la réplication survient à différents moments au cours de la phase S ; on parle de « timing » de réplication. Il a été montré par l'analyse des bandes chromosomiques que l'euchromatine qui contient les gènes transcrits se réplique précocement, et que l'hétérochromatine peu ou pas transcrite se réplique tardivement (Lima-de-Faria and Jaworska, 1968), suggérant une corrélation entre le « timing », l'expression des gènes et la structure de la chromatine. Néanmoins cette simplification ne rend pas compte de l'ensemble

des observations. Par exemple, certaines régions de l'hétérochromatine comme les centromères et le locus du « malting-type » se répliquent précocement chez *S. pombe* (Kim et al., 2003). L'organisation du noyau peut aussi jouer un rôle dans le « timing ». En effet, des expériences d'immuno-fluorescence (IF) ont montré que la réplication s'organise en foyers et que la distribution de ces foyers évolue au cours de la phase S (Dimitrova and Gilbert, 1999) (voir (Gillespie and Blow, 2010) pour revue) (voir [figure 25](#)). Le programme spatio-temporel de réplication dépend donc de la structure de la chromatine et du positionnement des séquences au sein du noyau. Chaque type cellulaire possède un programme de réplication propre, celui-ci étant défini au cours du développement et de la différenciation.

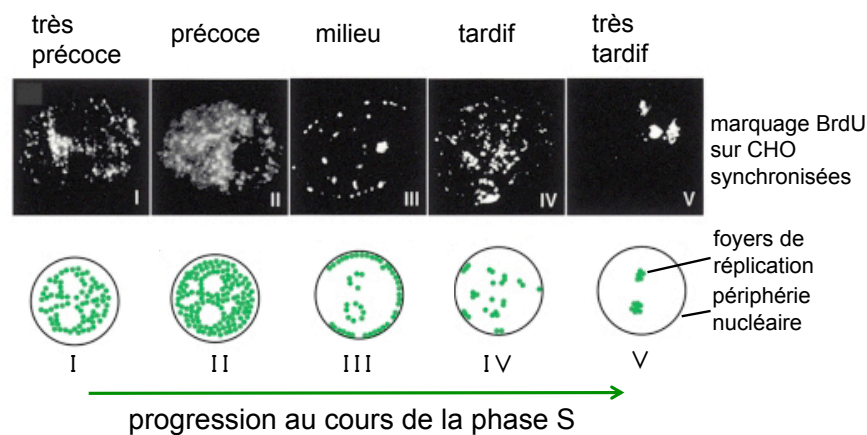


Figure 26 : Les foyers de réplication au cours de la phase S. La réplication s'organise en foyers dont la quantité et la localisation varie au cours de la phase S. Les foyers de réplication sont marqués au BrdU dans des cellules CHO (« Chinese Hamster Ovary ») synchronisées à la transition G1/S, puis relâchées pour être récupérées à différents moments de la phase S (Dimitrova and Gilbert, 1999). Il est possible de visualiser les foyers de réplication par l'immuno-détection de facteurs de réplication associés aux fourches, comme PCNA (« proliferating cell nuclear antigen »). Il est possible de voir que le programme temporel de réplication dépend de la localisation des régions répliquées au sein du noyau. Figure adaptée de Gillespie 2010.

Quelques considérations techniques, le « timing » à l'échelle du génome.

Pour étudier le « timing » de réplication à l'échelle du génome, plus finement que par l'étude des bandes chromosomiques, chez les métazoaires, les techniques les plus couramment utilisées consistent à récupérer les cellules à différents moments de la phase S, la séparation des cellules peut être effectuée à l'aide d'un trieur de cellules (FACS) (voir [figure 26](#)). L'ADN répliqué est alors reconnu par l'augmentation du nombre de copies ou par l'incorporation d'un analogue de thymidine (comme le BrdU) qui est ensuite immuno-

précipité. Les ADN sont ensuite hybridés sur puce ou séquencés. Dans l'ensemble, quand elles sont appliquées sur les mêmes cellules, ces deux techniques de reconnaissance de l'ADN répliqué, fournissent des résultats comparables (Desprat et al., 2009). Il est aussi possible de synchroniser les cellules en G1 et de les relâcher en phase S, pour les récupérer à différents temps. Si la synchronisation est maîtrisée chez les levures, ce n'est pas le cas pour les cellules de métazoaires. La réplication d'un domaine donné peut être précoce (« early »), intermédiaire (« middle »), tardif (« late »), ou pan-S. Les régions pan-S représentent soit une différence de « timing » entre les deux allèles d'une région, ou le caractère aléatoire du « timing » dans différents cycles (Hansen et al., 2010). Il est à l'heure actuelle possible de détecter par fractionnement de la phase S en 6 compartiments, les régions présentant des différences de « timing » entre deux allèles (Hansen et al., 2010). Le séquençage à haut débit est suffisamment sensible pour détecter du polymorphisme de nucléotides (SNP), et permettra de différencier l'allèle paternel de l'allèle maternel dans les régions soumises à ces variations alléliques.

Qu'est-ce qui définit le « timing » ?

Chez la levure, le « timing » n'est pas corrélé à la transcription, il a été montré que c'est la quantité limitante des facteurs d'initiation Sld2, Sld3, Sld7 et Cdc45 qui détermine le « timing » de réplication (Mantiero et al., 2011; Tanaka et al., 2011). L'impact de ces facteurs limitants sur le « timing » de réplication indique que les régions accessibles à ces facteurs initient la réplication plus précocement que les régions qui le sont peu. Les régions peu accessibles doivent attendre le recyclage de ces facteurs limitants pour être répliquées à leur tour. Les facteurs d'initiation qui pourraient être limitant chez les métazoaires ne sont pas connus.

Les analyses de « timing » à l'échelle du génome chez les métazoaires confirment une corrélation avec la transcription, et l'organisation du noyau et de la chromatine. La réplication s'organise en domaines de réplication, précoces et tardifs, de 400 kb à 1 Mb, qui sont constitués de multiples réplicons (Farkash-Amar et al., 2008; Pope et al., 2010). Ces domaines peuvent s'apparenter aux « clusters » d'origines visualisés par analyse de molécules uniques, puisque des groupes d'origines relativement synchrones constituent ceux-ci. Certains travaux suggèrent que les domaines sont séparés par des zones sans origines, traversées par des fourches unidirectionnelles (Farkash-Amar et al., 2008; Hiratani et al., 2008; Ryba et al., 2010). Ces zones sont dites de transition (TTR, « timing/temporal transition region »). D'autres travaux suggèrent que les TTR sont des régions constituées d'origines s'activant en cascade au cours du temps et le long de ces régions (Guilbaud et al., 2011). Le « timing » est corrélé avec le niveau d'expression des gènes chez *D.*

melanogaster (MacAlpine et al., 2004) et dans des cellules humaines (Desprat et al., 2009; White et al., 2004; Woodfine et al., 2005). Le « timing » est aussi corrélé à l'organisation des domaines chromatiniens, c'est à dire par la proximité physique qui existe entre différentes séquences du génome au sein du noyau (données de « Hi-C », une technique qui cartographie le positionnement des séquences au sein du noyau) (De and Michor, 2011; Ryba et al., 2010; Yaffe et al., 2010). Les frontières entre les domaines d'interaction physique des séquences d'ADN au sein du noyau correspondent aux frontières entre les différents domaines de « timing ». Comme chez les levures, l'établissement du « timing » pourrait être la conséquence de l'accessibilité de la chromatine à certains facteurs de réplication limitant. La relation entre le « timing » et la transcription et/ou l'organisation de la chromatine pourrait donc être indirecte.

Les domaines précoces : richesse en origines potentielles et facteur(s) limitant.

Les domaines précoces sont riches en brins naissants et en sites de fixation d'ORC (Benoît Miotto, résultats non publiés) (Besnard et al., 2012; Cayrou et al., 2011; MacAlpine et al., 2004). Ceci suggère que la densité en origines actives est particulièrement élevée dans les domaines précoces. En effet on peut imaginer que les régions de l'euchromatine, qui sont transcrites et accessibles peuvent efficacement fixer le pré-RC et/ou les facteurs d'initiation, ce qui favoriserait l'initiation précoce. Les régions fermées, difficilement accessibles aux facteurs de réplication seront activées plus tardivement. Si l'on prend en compte la limitation potentielle en facteurs d'initiation et l'abondance des pré-RC dans les régions précoces, on peut alors proposer le modèle suivant : les régions très accessibles vont titrer les facteurs d'initiation au détriment des domaines qui le sont peu. Dans cette hypothèse, les régions fermées doivent attendre le recyclage des facteurs d'initiation à partir des origines précoces pour être initiées à leur tour. Ce modèle en étapes successives de recyclage d'un facteur limitant a été modélisé *in silico* avec succès, à partir des données de peignage moléculaire et de « timing » de réplication (Goldar et al., 2009; Guilbaud et al., 2011; Hyrien and Goldar, 2010). Pour tester cette hypothèse, il faudra attendre une meilleure connaissance du positionnement et de l'abondance locale d'ORC, ou du pré-RC, ainsi que l'identification des facteurs limitant l'initiation chez les métazoaires.

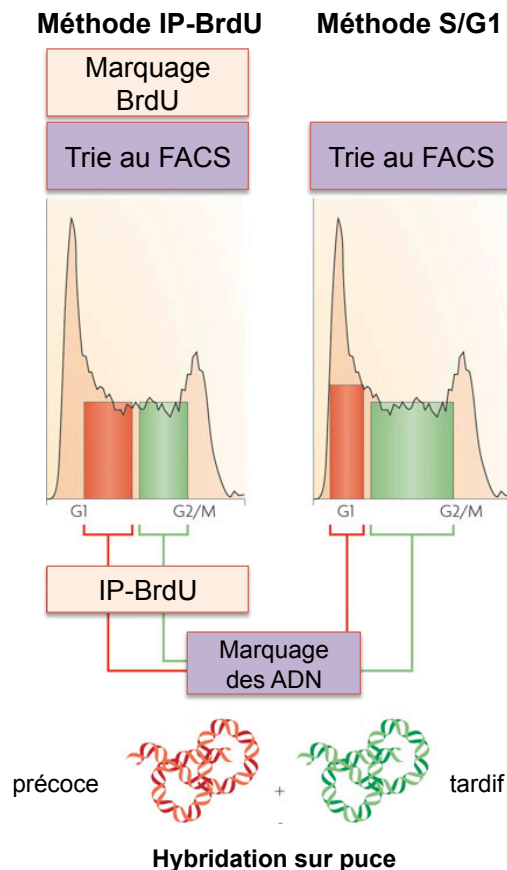


Figure 26 : Techniques d'analyse du « timing » à l'échelle du génome. La première méthode consiste à marquer l'ADN en cours de réplication avec du BrdU. Les cellules sont triées, en deux populations : début de S et fin de S. On réalise une immuno-précipitation de l'ADN ayant incorporé le BrdU, et on marque différemment l'ADN précoce et tardif avant de l'hybrider sur puce. La seconde technique consiste à trier des cellules en G1 et en phase S. L'ADN répliqué est reconnu par l'augmentation de son nombre de copies. Les ADN issus de G1 et de S sont marqués avant d'être hybridés sur puce. Pour les deux méthodes il est possible d'affiner le trie et de découper la phase S en plusieurs fractions (jusqu'à 6). Figure adaptée de Gilbert 2010.

1.B.b Le programme de réplication est défini au cours du développement et de la différenciation.

Le choix des origines au cours du développement.

Les premières études montrant une influence du développement sur la réplication proviennent de l'analyse du développement embryonnaire précoce chez le Xénope et *D. melanogaster*. Lors du développement précoce, lorsqu'il n'y a pas de transcription, les origines sont distribuées aléatoirement le long du génome tout les 10-20 kb (Blumenthal et al., 1974; Hyrien and Mechali, 1993). Lorsque que la transcription se met en place, les

événements d'initiation sont confinés dans les régions intergéniques, qui apparaissent alors comme des zones d'initiation (Hyrien et al., 1995). Il existe donc un lien étroit entre l'établissement du programme transcriptionnel et l'établissement du programme de réplication au cours du développement. Il a été proposé que la concentration élevée en facteurs dans les embryons précoces favorise l'initiation sur l'ensemble du génome. Comme dans l'hypothèse formulée précédemment, ces facteurs pourraient devenir limitant au cours du développement, et restreindre ainsi l'initiation aux régions les plus accessibles, ici les régions intergéniques.

L'analyse des brins naissants nous apprend que le choix des origines est spécifique d'un type cellulaire donné, en effet le réservoir d'origines fonctionnelles est commun à une espèce donnée, mais le niveau d'activation (efficacité) de ces origines dépend du type cellulaire. De plus les origines ne sont pas positionnées au hasard, moins de 10% sont isolées et la majorité forme des zones groupées d'origines de 240 kb (Besnard et al., 2012), confirmant l'existence des « cluster » d'origines ou des zones d'initiation. Différents types cellulaires utilisent une combinaison d'origines différentes, et souligne le lien entre l'identité cellulaire et le programme de réplication.

Le « timing » est une marque épigénétique acquise au cours du développement.

Il est maintenant connu que le « timing » s'établit au cours du développement (Hiratani et al., 2010; Pope et al., 2010; Ryba et al., 2010), et que la différenciation cellulaire, permet de reprogrammer le « timing » (Hiratani et al., 2008; Shufaro et al., 2010). Si par exemple on compare différentes cellules embryonnaires, elles ont un profil de réplication très proche. De plus, si l'on force des cellules différenciées à se dédifférencier (iPS, « induced-pluripotent stem cells »), on s'aperçoit que le choix des origines et le « timing » change au cours du processus. Au final une cellule iPS a un programme de réplication similaire à une cellule souche, très éloigné de son « timing » originel. La moitié des domaines de réplication sont spécifiques d'un type cellulaire, et la signature que procure le « timing » permet de reconnaître différents types cellulaires (Hansen et al., 2010; Ryba et al., 2010). Les profils de « timing » sont conservés entre différentes espèces, comme l'homme et la souris, ceci indépendamment de la séquence, notamment du contenu en GC (Yaffe et al., 2010). Le « timing » dépend de l'organisation de la chromatine et du programme transcriptionnel ; il peut donc être considéré comme une marque épigénétique. Il est connu que le programme temporel de réplication est défini en fin de mitose et début de G1, lors du TDP (« timing decision point ») par la réorganisation des domaines chromatiniens (voir (Gilbert, 2010a) pour revue).

2. Publication #1

Chk1 and Rad51 deficiency perturbs replication dynamics via DDR-mediated modulation of dNTP pools

Hervé Técher, Therese Wilhelm*, Sandra Carignon*, Gaël A. Millot, Bernard S. Lopez, Olivier Brison and Michelle Debatisse

*These authors contributed equally

Publication soumise

Chk1 or Rad51 deficiency perturbs replication dynamics *via* p53R2-mediated modulation of dNTP pools

Hervé Técher^{1,2,3}, Therese Wilhelm^{1,2,3*}, Sandra Carignon^{1,2,3*}, Gaël A. Millot^{1,2,3}, Bernard S. Lopez^{4,5,6}, Olivier Brison^{1,2,3} and Michelle Debatisse^{1,2,3*}

¹Institut Curie, Centre de Recherche, 26 rue d'Ulm, 75248 Paris cedex 05, France.

²UPMC Université Paris 06, F-75005 Paris, France.

³CNRS UMR 3244, F-75248 Paris, France.

⁴Institut Gustave Roussy, 114 rue Edouard Vaillant, 94805 Villejuif, France.

⁵CNRS UMR 8200, Villejuif, France.

⁶Université Paris Sud, Orsay, France.

+ co-second authors

*correspondence should be addressed to: E-mail: michelle.debatisse@curie.fr

Running title: Interplay between DNA replication & DDR

Keywords: nucleotide pools / Ribonucleotide reductase / DNA damage response / fork speed / replication origins

Abstract

Mammalian cells deficient in various proteins of the DNA damage response consistently display slow replication forks and high initiation density, suggesting that a common mechanism elicits their replication phenotype. Here we show that Chk1 or Rad51 deficiency limits the amount of precursors available for replication, which slows fork movement then passively increases initiation density. We correlate this switch in replication dynamics to over-expression of p53R2, the p53-inducible subunit of the ribonucleotide reductase. This over-expression results from activation of the ATM-Chk2-p53 pathway by lesions arising spontaneously in such deficient cells. We thus identify a new mechanism by which repair cross talks with replication. We hypothesize that the excess of ribonucleotide reductase complexes containing p53R2 channels part of the precursors towards the repair machinery, facilitating repair at the expense of replication fork speed. Fork slowing then permits firing of latent origins, helping replication to proceed when forks stall along damaged sequences.

Introduction

The DNA damage response (DDR) is a signal transduction pathway activated upon DNA damage and replication stress that elicits appropriate cellular responses to maintain genome integrity. Notably, the ATR-Chk1 branch of the DDR senses problems in S phase and allows cells to overcome various types of impediments to fork progression, of exogenous and endogenous origin (*reviewed in* (Branzei & Foiani, 2010; Lisby & Rothstein, 2009)). In metazoan cells, depletion or inactivation of various proteins involved in the DDR, notably ATR (Marheineke & Hyrien, 2004; Speroni et al, 2012), Chk1 (Katsuno et al, 2009; Maya-Mendoza et al, 2007; Petermann et al, 2010; Scolah & McGowan, 2009), Claspin (Petermann et al, 2008), Wee1 (Dominguez-Kelly et al, 2011), RAD51 and BRCA2 (Daboussi et al, 2008), leads to a 20 to 40 percent decrease in fork speed and to an increase in the density of initiation events.

The impact of Chk1 deficiency on replication dynamics has been intensively studied, but the underlying mechanism remains unclear. Some authors proposed that Chk1 primarily controls origin firing (Katsuno et al, 2009; Petermann et al, 2010; Scolah & McGowan, 2009; Syljuasen et al, 2005). In this model, Chk1 represses origin firing during normal S phases, as it does in response to replication stress, by inhibiting the cyclin-dependent kinase Cdk2 (Petermann et al, 2010). Chk1 inactivation might thus increase the density of initiation events, starving the cells for some limiting factors, which would lead to fork slowing. Alternatively, Chk1 inactivation might primarily slow down fork movement. In this hypothesis, the increased density of initiation would result from the operation of the so-called compensation mechanism. This regulatory process has been shown to maintain the rate of DNA synthesis through modulation of initiation density accordingly to fork speed variations (Anglana et al, 2003; Chabosseau et al, 2011; Conti et al, 2007; Courbet et al, 2008; Gay et al, 2010; Taylor, 1977).

If Chk1 inactivation primarily slows down fork movement, several mechanisms may be involved in this process. First, Chk1 displays a PIP box permitting interaction with PCNA (Scolah et al, 2008), which may assist progression of replication forks. Second, Chk1 may stimulate the synthesis of deoxyribonucleoside triphosphates (dNTPs), notably through up-regulation of the ribonucleotide reductase (RNR) activity. Indeed, RNR catalyzes the limiting step in endogenous dNTP biosynthesis and is crucial to both DNA replication and repair (*reviewed in* (Nordlund & Reichard, 2006)), and cells have evolved several mechanisms to regulate its activity (Fairman et al, 2011). In budding yeast, Mec1p and Rad53p (the equivalents of metazoan ATR and Chk1, respectively) have been shown to control both the activity of the enzyme and the transcription of the RNR subunits ((Andreson et al, 2010), *reviewed in* (Branzei & Foiani, 2009)). Noticeably, re-localization of the regulatory sub-units

has been observed upon checkpoint activation (Lee & Elledge, 2006; Yao et al, 2003). Together, DDR activation substantially expands the dNTP pools in both budding and fission yeast and facilitates repair, notably *via* homologous recombination (Moss et al, 2010), at the expense of replication fidelity (Davidson et al, 2012; Kumar et al, 2011; Poli et al, 2012). In striking contrast, DNA damage does not induce global pool expansion in mammalian cells (Hakansson et al, 2006). However, transcription of the RRM2B gene, that encodes the p53R2 regulatory subunit in mammals, increases in a p53-dependent manner upon DNA damage, and the protein is further stabilized by an ATM-dependent phosphorylation (Chang et al, 2008; Tanaka et al, 2000). These results suggest that the DDR also controls RNR activity and dNTP availability in mammalian cells. Strikingly, it has been shown that RNR redistributes to foci of DNA damage, which most probably results in local delivery of dNTPs that facilitates repair (Hu et al, 2012; Niida et al, 2010).

Interestingly, deficiency in components of the DDR, such as Chk1 (reviewed in (Enders, 2008)) or Rad51 (reviewed in (Costanzo, 2011)) leads to genomic instability in vertebrate cells. For example, Rad51 activity is crucial for the processing of broken DNA and stalled forks, notably through inhibition of Mre11 dependent degradation of nascent-strands (Hashimoto et al, 2010). Depletion or inhibition of Chk1 also leads to DNA damage, which triggers the DDR through activation of the ATM branch of the pathway (Niida et al, 2005; Syljuasen et al, 2005). This damage arises specifically in S-phase and appears to rely on MUS81/Eme1 activity (Forment et al, 2011), a structure-specific endonuclease that processes joint DNA molecules resembling replication forks (Schwartz & Heyer, 2011). Mus81/Eme1 has also been implicated in the cleavage of replication forks in fission yeasts deficient in S-phase checkpoint (Froget et al, 2008; Roseaulin et al, 2008).

Taken together, these data suggest a general mechanism implicating DNA damage, activation of the DDR and modulation and/or localization of RNR activity as key regulators of the replication dynamics, an hypothesis further supported by previous results showing that mammalian cells exposed to DNA damaging agents have reduced fork movement (Merrick et al, 2004; Shimura et al, 2006). Here we show that addition of deoxyribonucleosides (dNs) in the growth medium alleviates fork slowing in mammalian cells depleted of Chk1 or Rad51, indicating that the pools of dNTPs available for the replication machinery are low in such cells. Strikingly, precursor addition also suppresses the consequences of Chk1 depletion on origin density. Thus, the spacing of initiation events depends on dNTPs availability or on fork movement rather than on a direct repression of latent origins by Chk1 activity. Furthermore, we confirm that Rad51 or Chk1 depletion triggers DNA damage, resulting in accumulation of p53R2. We show that depletion of p53R2 restores fork movement in Chk1 and Rad51 deficient cells. Our results support the model that DNA damage induced in DDR mutant cells

reduces the delivery of dNTPs to the replication machinery. By slowing fork movement this phenomenon leads to activation of latent origins, which ensures an efficient backup in case of fork stalling along damaged sequences.

Results

Fork movement decreases in Chk1 deficient cells

We used molecular combing to determine fork speed in JEFF (human B-lymphocytes immortalized with Epstein Barr virus) and CHEF (normal Chinese hamster embryonic fibroblasts) cells depleted or not of Chk1 by RNA silencing (Figure 1A). The mean fork speed in JEFF and CHEF cells is 1.9 ± 0.22 kb/min and 1.5 ± 0.15 kb/min, respectively (Supplementary Figure 1). To facilitate comparison, fork speed was expressed as percentage of the control in each experiment. Regardless of cell type and species, we find that Chk1 depletion leads to an approximately 30% decrease in fork speed compared to non-transfected cells or cells transfected with control RNAs (Figure 1B). This difference is statistically significant and unlikely to result from non-specific effects of Chk1 siRNA since different sets of oligonucleotides were used to target human or Chinese hamster transcripts (see experimental procedures). We also studied the consequences of treatments of CHEF cells with 50 nM of UCN-01, an inhibitor of Chk1 kinase activity (Syljuasen et al, 2005). Fork speed decreases similarly upon treatment with the drug than in Chk1 depleted cells (Figure 1C), showing that the kinase activity of Chk1 is involved in the control of fork movement. Our results thus confirm the conclusions of previous work showing that Chk1 deficiency slows fork movement in metazoan cells (Maya-Mendoza et al, 2007; Nakanishi et al, 2010; Petermann et al, 2010).

Exogenous precursors rescue fork slowing induced by Chk1 depletion

Fork slowing often results from limiting or imbalanced dNTP pools, which can be corrected by addition of precursors in the culture medium (Anglana et al, 2003; Bester et al, 2011; Chabosseau et al, 2011; Courbet et al, 2008; Gay et al, 2010). We therefore asked whether addition of deoxyribonucleosides (dA, dC, dG and dT; here-after referred to as dNs) alleviates fork slowing in Chk1-depleted cells (Figure 1A). Strikingly, exogenous dNs fully rescue fork progression in Chk1 depleted JEFF and CHEF cells, without changes of Chk1 levels (Figure 1B). Addition of dNs also suppresses fork slowing in CHEF cells treated with UCN-01 (Figure 1C). These results show that Chk1 deficiency alters the concentration or the balance of dNTPs available for the replication machinery.

Global pools do not accurately reflect dNTPs available for replication

Next, we quantified cellular dNTP pools using a classical enzymatic assay (Sherman & Fyfe, 1989). We first assessed the reliability of the technique by determining pool size in JEFF cells treated for six hours with increasing concentrations of hydroxyurea (HU), a well-known RNR inhibitor that triggers pool imbalance and fork slowing. In good agreement with previous reports (Nicander & Reichard, 1985; Skoog & Nordenskjold, 1971), we find that treatments with high doses of HU (0.1 to 1 mM) reduce the purine pools, with a major impact on the dATP pool, while the dCTP and dTTP pools increase (Figure 2A). Cell treatment with moderate doses of HU (20 μ M) specifically lowers the dATP pool and treatments with low doses of HU (5 or 10 μ M) do not impact the pools.

In parallel, we determined fork speed in cells treated with HU and find that all concentrations of the drug lead to a significant and dose-dependant reduction of fork movement in JEFF and CHEF cells (Figure 2B). Thus, in the presence of 5 or 10 μ M of HU, replication forks slow down significantly while global dNTP pools remain unaffected. These results suggest that fork speed is a more sensitive indicator of the dNTPs truly available for replication than measured pool sizes. By comparison, the level of fork speed reduction observed upon Chk1 depletion is equivalent to that resulting from treatment with 10 μ M of HU. It was thus not surprising to find no significant changes in pool sizes in Chk1-depleted JEFF and CHEF cells (Figure 2C).

Origin firing is fine-tuned by fork speed, independently of the Chk1 status

Several studies have shown that the median inter-origins distance (IOD) (Figure 3A) decreases in cells deprived of Chk1 activity, indicating that the density of initiation events increases in these cells (Katsuno et al, 2009; Maya-Mendoza et al, 2007). Similarly, we find that the median IOD decreases by approximately 45% in JEFF and 25% in CHEF cells upon Chk1 depletion (Figure 3B). Such IOD modulation may reflect, as previously suggested, a direct role of Chk1 in the repression of some origins (Ge & Blow, 2010; Katsuno et al, 2009; Petermann et al, 2010; Syljuasen et al, 2005). Alternatively, activation of latent origins in Chk1-depleted cells may be a consequence of fork speed reduction. To distinguish between these two possibilities, we asked if conditions that rescue fork movement in Chk1-depleted cells also impact origin firing. We find that the median IOD goes back to control levels in both JEFF and CHEF cells depleted of Chk1 upon precursor supply (Figure 3B). This result shows that the spacing of initiation events is determined by fork speed, or directly by the dNTP pools, independently of the Chk1 status.

A predictable consequence of this finding is that the level of recruitment of latent origins should be comparable whether fork movement is affected by treatments with HU or by Chk1 depletion. We thus determined the median IOD in JEFF and CHEF cells treated with doses of HU leading to a large range of fork impediment (Figure 3C). We find that the median fork speeds and the median IOD are linearly correlated ($r=0.97$ in JEFF and $r=0.98$ in CHEF cells) (Figure 3D and Supplementary Figure 2). We then plotted on these graphs the median IOD and the median fork speed determined in cells depleted or not for Chk1 and complemented or not with dNs. As expected, all these values are congruent with those determined in cells treated with HU (Figure 3D and Supplementary figure 2). Since the IOD mainly takes into account initiation events occurring within origin clusters, we also measured fork densities, which constitute a more global estimation of origin usage. When compared to non-depleted cells, fork density in JEFF cells depleted of Chk1 increases approximately by a factor of two, and this increase is abrogated in the presence of dNs (Figure 3E). In addition, we observe that neither the percentage of cells in S-phase nor the incorporation of BrdU is dramatically altered in JEFF cells depleted for Chk1 or treated with 10 μ M of HU (Supplementary Figure 3). Thus, the increase in active origins efficiently compensates for fork slowing, which enables the cells to progress normally through S-phase. Together, these results confirm that origin spacing is fine-tuned by fork speed, or directly by dNTP pools, regardless of whether dNTP starvation is induced by Chk1 depletion or HU treatment. However, it remains to be determined how Chk1 depletion promotes dNTP starvation.

Chk1 deficiency promotes DNA damages and induces the DDR

It was previously established that depletion or inhibition of Chk1 leads to accumulation of DNA damage that triggers activation of the ATM branch of the DDR (Forment et al, 2011; Niida et al, 2005; Syljuasen et al, 2005). Accordingly, we observe an approximately five-fold increase of histone H2AX phosphorylated on serine 139 (γ H2AX), and of p53 phosphorylated on serine 15 (p53-s15P) in whole-cell extracts of Chk1-depleted JEFF cells compared to control cells (Figure 4A). As previously suggested (Sorensen & Syljuasen, 2012; Syljuasen et al, 2005), DNA damage may arise from reduced fork movement or increased initiation. Noticeably, we find that the levels of p53-s15P and γ H2AX remain high in Chk1-depleted cells supplemented with exogenous dNs (Figure 4A), which shows that reduced fork speed or increased origin activation is not responsible for breakage. In agreement with this conclusion, cell treatment with 10 μ M of HU, a dose leading to a replication phenotype equivalent to that resulting from Chk1 depletion does not induce γ H2AX accumulation in JEFF cells (Supplementary Figure 4). Alternatively, DNA damage induced upon Chk1 deficiency could originate from fork stalling and subsequent fork

collapse, however, in agreement with published data (Speroni et al, 2012), we fail to observe a significant increase in fork asymmetry in both Chk1-depleted JEFF and CHEF cells compared to control cells (Supplementary Figure 5).

RRM2B gene over-expression triggers fork slowing in Chk1-depleted cells

Active RNR contains two copies of a large catalytic subunit (R1) and two copies of a small regulatory subunit (either R2 or p53R2) (reviewed in (Thelander, 2007)). Transcription of the gene coding for the p53R2 subunit is up regulated upon DNA damage in a p53-dependent manner (Chang et al, 2008; Tanaka et al, 2000). We therefore asked whether activation of the DDR we observe in Chk1-depleted cells impacts the level and the localization of p53R2. We find that the level of p53R2 mRNA increases in Chk1-depleted JEFF and CHEF cells while that of the R1 and R2 mRNA remains unchanged (Figure 4B and Supplementary Figure 6). The accumulation of p53R2 transcripts correlates with an increased level of p53R2 subunit in whole-cell extracts of JEFF cells (Figure 4A). We are unable to study the levels of p53R2 in CHEF cells because the available antibodies fail to recognize the Chinese hamster protein.

We next used cell-fractionation to study the distribution of the RNR in the cytoplasm, the soluble nuclear fraction and the chromatin of JEFF cells depleted or not of Chk1. We find that most R1, R2 and p53R2 proteins are cytoplasmic, but a fraction of each subunit is present in the nucleus, a part of which is associated with the chromatin fraction (Figure 4C). Noticeably, we find that the level of chromatin-bound p53R2 increases approximately two-fold while those of R1 and R2 increase weakly or not, respectively, in Chk1-depleted cells (Figure 4C). We reasoned that p53R2 accumulation could favor its association with R1 at the expense of the R1-R2 complex, which could play a role in fork slowing. In this hypothesis, co-depletion of Chk1 and p53R2 is expected to suppress fork slowing. Depletion of p53R2 significantly speeds up fork movement in Chk1-depleted JEFF cells (Figure 4D) and completely restores fork speed in Chk1-depleted CHEF cells (Figure 4E), in which the efficiency of p53R2 depletion was assayed by RT-qPCR (Supplementary Figure 6). Together, these results link fork slowing induced by Chk1 deficiency to DNA damage-dependent over-expression of p53R2, and show that the type of regulatory subunit associated with the catalytic R1 subunit modulates dNTP pools available for replication.

Defective DNA damage signaling alleviates fork slowing in Chk1-depleted cells

As mentioned above, the levels of p53R2 depends on DDR activation. Failure of damage signaling is thus expected to abrogate fork slowing in Chk1-depleted cells. To check this hypothesis, we co-depleted Chk2 and Chk1 in JEFF cells. Noticeably, depletion of Chk2 alone does not trigger the DDR and does not impact fork movement in these cells (Figure 4F). Upon co-depletion of Chk1 and Chk2, p53-s15P and γ H2AX levels decreased markedly compared to that found in JEFF cells depleted of Chk1 alone, which confirms that the ATM/Chk2 branch of the checkpoint contributes to signal the damages arising in Chk1 deficient cells (Niida et al, 2005; Syljuasen et al, 2005). In addition, co-depletion significantly speeds up replication forks (Figure 4F). Thus, shutting down the signaling network upstream of p53 suppresses fork impediment, further confirming that DNA damage induced in Chk1 deficient cells is involved in fork slowing.

Rad51 deficiency also leads to p53R2-dependent dNTP starvation

Chinese hamster fibroblasts over-expressing a dominant-negative form of RAD51 (cell line V79 SMRad51) exhibit a 15-20% fork speed reduction associated with a decrease in the median IOD comparable to that observed in Chk1-deficient cells (Daboussi et al, 2008). In agreement with these results, we show that JEFF cells depleted of Rad51 by RNA silencing display a 35% reduction of fork movement (Figure 5A). In addition, Rad51 depletion leads to the formation of γ H2AX and p53-s15P, indicating that DNA damage takes place in depleted JEFF cells (Figure 5B). DDR activation in depleted cells correlates with a two-fold increase in the level of p53R2 mRNA and p53R2 protein (Figures 5B and C). It is thus tempting to hypothesize that the very same mechanism controls fork speed in cells deficient for Chk1 or Rad51. Strikingly, addition of exogenous dNs or p53R2 depletion restores fork progression in both Rad51-depleted JEFF and V79 SMRad51 cells (Figures 5A, D, E and F). Furthermore, we find that the levels of γ H2AX remain high in Rad51-depleted JEFF cells either supplemented with dNs or depleted for p53R2 (Figure 5B), further confirming that most DNA damage occurring in such deficient cells is independent of fork slowing.

Discussion

Chk1 and Rad51 depletion starve the replication machinery of dNTPs

As previously reported for different cell types (Katsuno et al, 2009; Maya-Mendoza et al, 2007; Petermann et al, 2010; Scora & McGowan, 2009), we observe that Chk1 deficiency leads to fork slowing and activation of extra-origins in human lymphoblastoid JEFF cells and in normal CHEF fibroblasts. Until now, the process altering the replication dynamics in the context of Chk1 deficiency has remained unclear. It has been proposed that the primary effect of Chk1 depletion is to de-repress latent origins, which increases the number of active forks, resulting in enhanced consumption of heretofore unidentified limiting factors and fork slowing (Petermann et al, 2010). Here we show that the exogenous supply of DNA precursors rescues fork progression in Chk1-depleted cells, identifying dNTPs as the factors limiting fork movement. Strikingly, origin spacing also goes back to normal values upon exogenous precursor supply, showing that the increase in origin firing observed in Chk1 deficient cells is also a consequence of dNTP starvation. Origin spacing is thus fine-tuned independently of Chk1 status, either directly by the size of dNTP pools or by fork slowing that results from dNTP shortage. We favor the latter hypothesis because aphidicolin, an inhibitor of DNA polymerases that does not affect the pools, similarly increases initiation density in proportion to fork slowing (Courbet et al, 2008). Previous work has shown that reduction of origin firing upon Cdk2 or Cdc7 down-regulation restores fork speed in Chk1-deficient cells (Petermann et al, 2010), leading the authors to conclude that Chk1 plays a direct role in the repression of latent origins. Rather, we propose that a decrease in active origins reduces the number of ongoing forks, which saves precursors and stimulates fork progression in conditions of limited dNTP availability.

We have shown previously that over-expression of a dominant-negative form of Rad51 in Chinese hamster fibroblasts (V79 SMRad51) also leads to fork slowing and increased origin density (Daboussi et al, 2008). Here we confirm these observations and show that Rad51-depleted JEFF cells display a similar phenotype. Moreover, addition of dNs in the growth medium of V79 SMRad51 and Rad51-depleted JEFF cells alleviates fork slowing. Thus, Rad51 and Chk1 deficiencies both perturb dNTP availability, suggesting that a common mechanism dictates replication dynamics in DDR deficient cells.

Chk1 and Rad51 deficiencies may impact local dNTP availability

No significant changes in the global dNTP pools were detected in Chk1-depleted cells or in cells challenged with HU concentrations that slow forks to the same extent than Chk1 or

Rad51 depletion, suggesting that the pools may be affected in specific sub-cellular compartments in mammalian cells. The results of several studies support this possibility. First, although ribonucleotide reduction essentially takes place in the cytoplasm, where most of active RNR localizes (Pontarin et al, 2008), a portion of the enzyme resides in the nucleus (Chen et al, 2010; Tanaka et al, 2000; Zhang et al, 2009). Second, it has been shown that a sub-fraction of the nuclear RNR is bound to the chromatin (D'Angiolella et al, 2012; Niida et al, 2010). Third, in cells treated with camptothecin, induction of DNA damages correlates with the re-localization of RNR sub-units from the cytoplasm to the nucleus (D'Angiolella et al, 2012; Zhang et al, 2009). In addition, nuclear RNR is recruited to repair foci in a Tip60 dependant-manner upon UV- and γ -irradiation (Hu et al, 2012; Niida et al, 2010). RNR activity may thus redistribute upon DNA damage, resulting in local delivery of dNTPs that facilitates repair. The phosphorylation of H2AX and p53 we observed in Chk1 and Rad51 deficient cells confirms the presence of damages in these genetic contexts, which may provoke fork slowing upon redistribution of nuclear dNTPs.

Fork slowing relies on DDR activation and p53R2 accumulation

We reasoned that damage signaling could be a key event in fork speed modulation. To check this possibility, control and Chk1-deficient cells were depleted of Chk2. We found that co-depletion of Chk1 and Chk2 suppresses Chk1-dependent fork slowing while depletion of Chk2 alone does not impact the replication dynamics. In addition, like in yeast and other mammalian cells (Chang et al, 2008; Davidson et al, 2012; Poli et al, 2012; Tanaka et al, 2000), we observed that DDR activation is associated with over-expression of p53R2. Strikingly, depletion of p53R2 speeds up replication forks in Chinese hamster fibroblasts and in human lymphoblastoid cells deficient for either Chk1 or Rad51, revealing that fork slowing results from accumulation of p53R2. This accumulation correlates with an increased chromatin recruitment of p53R2. We propose that p53R2 accumulation perturbs the ratio of RNR complexes, namely R1/p53R2 and R1/R2, leading to preferential targeting of precursors towards the repair machinery, at the expense of fork speed. This may be achieved through re-localization of part of the RNR from replication to repair foci. Together, our results reveal a new pathway that orchestrates the crosstalk between repair and replication and show that fork slowing relies on DDR signaling (model in Figure 6).

In addition, our results demonstrate, in strong contrast with the common view, that Chk1 activity plays no role in the control of fork speed and initiation density in normal S phases. Indeed, fork slowing relies on DNA damage induced by the absence of Chk1. Noticeably, it has been suggested that damage results from fork slowing or from increased

initiation density taking place in these cells (Syljuasen et al, 2005). We show here that restoration of the replication dynamics does not turn off the DDR, indicating that these replication features are not responsible for the damage. Alternatively, damage may originate from fork stalling and subsequent fork collapse, but we fail to observe significant increase in fork asymmetry in Chk1-depleted cells compared to control cells. However, we cannot exclude that forks stall at specific loci, rare enough to not impact whole genome data. Further work will thus be necessary to determine the source of the damage.

Local regulation of dNTP pools could prevent mutagenesis

In yeast cells, up-regulation of RNR appears to be a common consequence of mutations leading to genomic instability. Subsequent expansion of the dNTP pools improves survival following DNA damage but elicits high mutation rates (Davidson et al, 2012; Kumar et al, 2011; Poli et al, 2012). Our results show that, in contrast to the situation observed in yeast cells, the dNTP pools available for replication decrease upon DNA damage in mammalian cells, resulting in fork slowing. Such a 20-30% reduction of fork movement is not detrimental for cell survival because increased initiation density maintains the rate of DNA replication. We propose that mammalian cells evolved a mechanism regulating local dNTP pools allowing accurate repair without impairing replication fidelity. Moreover, by slowing fork movement, the pathway we identified contributes to stabilize fork progressing along a damaged template, and activation of latent origins ensures an efficient backup in case of fork stalling.

Materials and methods

Cell culture, HU treatment and nucleotide precursors complementation

Epstein Barr virus-immortalized human B-lymphocytes (JEFF cells) were grown in RPMI 1640 + GlutaMAX-I medium (GIBCO). Chinese hamster embryonic fibroblast (CHEF) were grown in MEM medium supplemented with Earle's salts, 1% MEM Non-Essential Amino Acids, 1 mM Sodium pyruvate and 2 mM L-glutamine (all compounds were purchased from GIBCO). In both media 10% foetal calf serum (PAN-Biotech GmbH) was added, and 100 µg/mL of penicillin and streptomycin (GIBCO). V79 puro and V79 SMRad51 were cultured as described previously (Daboussi et al, 2008). The Chk1 inhibitor UCN-01 was purchased from SIGMA and added at a concentration of 50 nM, for 4 hrs. Hydroxyurea (purchased from SIGMA) was added for 6 hrs at the indicated concentrations. Nucleotide precursors were all purchased from SIGMA, deoxyribonucleosides, at 20 µM each, were supplemented overnight in JEFF cells and for 6 hrs in CHEF cells prior to cell recovery.

siRNA transfection

Transfections were carried out with the Nucleofector device (LONZA), according to the manufacturer's instructions. Briefly, 2×10^6 JEFF cells were resuspended in 100 µL of Nucleofector C solution (LONZA) containing 0.6 µM of a mixture of 3 siRNAs targeted against Chk1 (HSS101854, HSS101855, HSS101856), p53R2 (HSS121295, HSS121296, HSS181703), Chk2 (HSS117406, HSS174161, HSS117408) or Rad51 (HSS109012, HSS109013, HSS109014) mRNA and transfected with the Z-001 program. Chinese hamster fibroblasts (V79puro, V79 SMRad51 and CHEF) were transfected with the program T-020 in Nucleofector V solution containing, 1 µM of each of two siRNAs targeting Chinese Hamster Chk1 mRNA (target-1: ACGCTTCTTCACCAAATTGGA; target-2: AAGATGTTAAATCATGAGAAT, purchased from QIAGEN), or 1 µM of each of four siRNAs targeting Chinese Hamster p53R2 mRNA (target-1: UUCUCUCCGACUUAAGCUUGUUC; target-2: UCGCAGCCAGCGAUGGAAUUGUAAA; target-3: UGCCUGAUGUUUCAGUACCUGGUAA; target-4: UGGCCUCAUUGGAAUGAACUGUGUU, purchased from Invitrogen). For control experiments, cells were transfected with the AllStars Negative Control siRNA (NONsi) (1027281, QIAGEN). JEFF and V79 cells were harvested 48 hrs after transfection, CHEF 24 hrs after.

Molecular combing and immunofluorescent detection

Combing and immunodetection were performed as described previously (Anglana et al, 2003). Briefly, cells were pulse-labeled with iododeoxyuridine (IdU) then chlorodeoxyuridine (CldU). Pulses lasted 20 min, excepted in HU-treated cells (30 min). Immunodetection of neo-synthesized DNA and DNA fibers, was performed by successive incubations with the following antibodies: 1) mouse anti-bromodeoxyuridine (BrdU) (BD Biosciences) and rat anti-BrdU (AbD Serotec), 2) A488 conjugated goat anti-mouse (Invitrogen) and cy3 conjugated goat anti-rat (Abcam), 3) mouse anti-single-stranded DNA (Millipore), 4) cy5.5 conjugated goat anti-mouse (Abcam), 5) cy5.5 conjugated donkey anti-goat (Abcam). Image acquisition was performed on an epifluorescence microscope driven by the Metamorph software (Molecular devices). A DM6000 B (Leica) was used for fork speed analysis. For IOD and fork density, an Imager.z2 (Zeiss) equipped with a PIEZO stage (Physik instrumente) was used for scan-slide acquisition of long DNA molecules. Measurements of fork speed, fork density and IOD were done with Photoshop software (Adobe). DNA counterstaining enabled to discard broken fibers and ensured that multiple replication events belonged to the same molecule (Tuduri et al, 2010).

Statistical analysis of molecular combing data

The R environment was used for all the analyses (R Development Core Team (2011). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <http://www.R-project.org/>). Tables, graphs and R code will be sent upon request. Statistical significance was set to $P \leq 0.05$. Two-tailed tests were systematically used. Type I error was not controlled by any procedure of correction (exploratory statistical analysis). The results are summarized in Supplementary table S1. The replication fork speed variable was calculated using $(d_I + d_{Cl}) / (t_I + t_{Cl})$, with d_I and t_I being the measured distance (in kb) and labelling time (in min) for IdU incorporation, respectively, and d_{Cl} and t_{Cl} the corresponding parameters for CldU incorporation. The fork asymmetry variable corresponded to $\max(d_I / d_{Cl}, d_{Cl} / d_I)$, which varies between 1 (no asymmetry) and $+\infty$ (theoretical maximal asymmetry). Distributions of these variables were systematically examined. Medians were compared with the Mann-Whitney-Wilcoxon (MWW) test using normal approximation due to identical values and continuity correction. Statistical conclusions applied to central parameters (medians) as assumption that the two compared distributions were identical except for central parameters was visually validated. In Figures 3D and S2, the drawn line corresponds to the regression line of y on x.

Whole-cell extracts, cell-fractionation and antibodies

Whole-cell extracts were obtained by lysing 2×10^6 cells in 100 μ L of the following buffer: 20 mM Hepes pH7.3, 0.35 M NaCl, 10 mM KCl, 1 mM EDTA, 20% glycerol, 1% Triton X-100, 1/100 phosphatase and protease inhibitor cocktail for 30 min at 4 C°. Alternatively cells were directly resuspended in 1X SDS sample buffer (Biolabs). For cell-fractionation, 5×10^6 cells were resuspended in 200 μ L of buffer 1 (0.25% NP-40, 10 mM Tris-HCl pH7.4, 10 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 1/100 protease inhibitor cocktail) for 5 min on ice. After centrifugation (5 min at 10 000 g), the supernatant was stored as the cytoplasmic fraction. The pellet of nuclei was resuspended in 100 μ L of buffer 2 (20 mM Hepes pH7.3, 0.35 M NaCl, 10 mM KCl, 1 mM EDTA, 20% glycerol, 1% Triton X-100, 1/100 protease inhibitor cocktail) for 30 min on ice. After centrifugation (10 min at 10 000 g), the supernatant was stored as the nuclear fraction. Finally the pellet of chromatin was resuspended in 50 μ L of 1X SDS sample buffer (Biolabs) and digested for 30 min with 5 units of benzonase nuclease (Novagen). Antibodies are listed in supplemental information.

Measurement of dNTP pool size

Briefly, cells were lysed in 10% ice-cold trichloroacetic acid (TCA), 15 mM MgCl₂ (15 min on ice). After centrifugation (10 min at 10 000 g), the supernatant was neutralized by two extractions with a mixture of trifluoromethane (78% v/v) – trioctylamine (22% v/v). The aqueous phase was stored at -80 C° for later analysis. Quantification of dNTPs was carried out by the enzymatic assay described by Sherman and Fyfe (Sherman & Fyfe, 1989).

Real Time quantitative PCR

Quantifications were carried out using the 7500 Real time PCR system (Applied Biosystem) with the SYBR green PCR Master Mix (Applied Biosystem). All quantifications were done in duplicate and in the indicated number of independent experiments. The same set of primers was used to amplify RNR coding (RRM1, RRM2, RRM2B) and CHK1 sequences in CHEF and JEFF cells. RNA levels were normalized to that of reference genes: GNAI3 alpha in CHEF cells and cyclophilin B in JEFF cells. Primers are listed in supplemental information.

Acknowledgments

We thank the Nikon Imaging Centre at Institut Curie and the PICT-IBiSa Imaging Facility. The M.D. team is supported by the Institut National du Cancer (INCa) (2009-1-PLBIO-10-IC-1), by the Agence Nationale de la Recherche (ANR-09-GENO-000/repinsCFS) and by the Association pour la Recherche sur le Cancer (ARC Subvention Libre n° SL220100601348 and Equipements mi-lourds n° 8514). HT has been supported by a MENRT graduate student fellowship, then by fellowship from the ARC. TW is supported by a fellowship from the ANR.

Author contributions

H.T., T.W. and S.C. carried out molecular combing. H.T. and S.C. carried out RT-qPCR, protein extraction, cell fractionation and western-blots. T.W. and B.S.L. provided and analyzed Chinese hamster cellular model. H.T. and O.B. carried out dNTP pools measurement. G.A.M. performed statistical analysis. M.D. planned the project. H.T., O.B. and M.D. wrote and edited the paper.

Conflict of interest

The authors declare no competing financial interests.

Supplementary information is available at The EMBO Journal Online

References

- Andreson BL, Gupta A, Georgieva BP, Rothstein R (2010) The ribonucleotide reductase inhibitor, Sml1, is sequentially phosphorylated, ubiquitylated and degraded in response to DNA damage. *Nucleic Acids Res* **38**(19): 6490-6501
- Anglana M, Apiou F, Bensimon A, Debatisse M (2003) Dynamics of DNA replication in mammalian somatic cells: nucleotide pool modulates origin choice and interorigin spacing. *Cell* **114**(3): 385-394
- Bester AC, Roniger M, Oren YS, Im MM, Sarni D, Chaoat M, Bensimon A, Zamir G, Shewach DS, Kerem B (2011) Nucleotide deficiency promotes genomic instability in early stages of cancer development. *Cell* **145**(3): 435-446
- Branzei D, Foiani M (2009) The checkpoint response to replication stress. *DNA Repair (Amst)* **8**(9): 1038-1046
- Branzei D, Foiani M (2010) Maintaining genome stability at the replication fork. *Nat Rev Mol Cell Biol* **11**(3): 208-219
- Chabosseau P, Buhagiar-Labarchede G, Onclercq-Delic R, Lambert S, Debatisse M, Brison O, Amor-Gueret M (2011) Pyrimidine pool imbalance induced by BLM helicase deficiency contributes to genetic instability in Bloom syndrome. *Nat Commun* **2**: 368
- Chang L, Zhou B, Hu S, Guo R, Liu X, Jones SN, Yen Y (2008) ATM-mediated serine 72 phosphorylation stabilizes ribonucleotide reductase small subunit p53R2 protein against MDM2 to DNA damage. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**(47): 18519-18524
- Chen YL, Eriksson S, Chang ZF (2010) Regulation and functional contribution of thymidine kinase 1 in repair of DNA damage. *J Biol Chem* **285**(35): 27327-27335
- Conti C, Sacca B, Herrick J, Lalou C, Pommier Y, Bensimon A (2007) Replication fork velocities at adjacent replication origins are coordinately modified during DNA replication in human cells. *Mol Biol Cell* **18**(8): 3059-3067
- Costanzo V (2011) Brca2, Rad51 and Mre11: performing balancing acts on replication forks. *DNA Repair (Amst)* **10**(10): 1060-1065
- Courbet S, Gay S, Arnoult N, Wronka G, Anglana M, Brison O, Debatisse M (2008) Replication fork movement sets chromatin loop size and origin choice in mammalian cells. *Nature* **455**(7212): 557-560
- D'Angiolella V, Donato V, Forrester FM, Jeong YT, Pellacani C, Kudo Y, Saraf A, Florens L, Washburn MP, Pagano M (2012) Cyclin F-Mediated Degradation of Ribonucleotide Reductase M2 Controls Genome Integrity and DNA Repair. *Cell* **149**(5): 1023-1034
- Daboussi F, Courbet S, Benhamou S, Kannouche P, Zdzienicka MZ, Debatisse M, Lopez BS (2008) A homologous recombination defect affects replication-fork progression in mammalian cells. *J Cell Sci* **121**(Pt 2): 162-166
- Davidson MB, Katou Y, Keszthelyi A, Sing TL, Xia T, Ou J, Vaisica JA, Thevakumaran N, Marjavaara L, Myers CL, Chabes A, Shirahige K, Brown GW (2012) Endogenous DNA replication stress results in expansion of dNTP pools and a mutator phenotype. *EMBO J*

- Dominguez-Kelly R, Martin Y, Koundrioukoff S, Tanenbaum ME, Smits VA, Medema RH, Debatisse M, Freire R (2011) Wee1 controls genomic stability during replication by regulating the Mus81-Eme1 endonuclease. *J Cell Biol* **194**(4): 567-579
- Enders GH (2008) Expanded roles for Chk1 in genome maintenance. *J Biol Chem* **283**(26): 17749-17752
- Fairman JW, Wijerathna SR, Ahmad MF, Xu H, Nakano R, Jha S, Prendergast J, Welin RM, Flodin S, Roos A, Nordlund P, Li Z, Walz T, Dealwis CG (2011) Structural basis for allosteric regulation of human ribonucleotide reductase by nucleotide-induced oligomerization. *Nat Struct Mol Biol* **18**(3): 316-322
- Forment JV, Blasius M, Guerini I, Jackson SP (2011) Structure-specific DNA endonuclease Mus81/Eme1 generates DNA damage caused by Chk1 inactivation. *PLoS One* **6**(8): e23517
- Froget B, Blaisonneau J, Lambert S, Baldacci G (2008) Cleavage of stalled forks by fission yeast Mus81/Eme1 in absence of DNA replication checkpoint. *Mol Biol Cell* **19**(2): 445-456
- Gay S, Lachages AM, Millot GA, Courbet S, Letessier A, Debatisse M, Brison O (2010) Nucleotide supply, not local histone acetylation, sets replication origin usage in transcribed regions. *EMBO Rep* **11**(9): 698-704
- Ge XQ, Blow JJ (2010) Chk1 inhibits replication factory activation but allows dormant origin firing in existing factories. *J Cell Biol* **191**(7): 1285-1297
- Hakansson P, Hofer A, Thelander L (2006) Regulation of mammalian ribonucleotide reduction and dNTP pools after DNA damage and in resting cells. *J Biol Chem* **281**(12): 7834-7841
- Hashimoto Y, Chaudhuri AR, Lopes M, Costanzo V (2010) Rad51 protects nascent DNA from Mre11-dependent degradation and promotes continuous DNA synthesis. *Nat Struct Mol Biol* **17**(11): 1305-1311
- Hu CM, Yeh MT, Tsao N, Chen CW, Gao QZ, Chang CY, Lee MH, Fang JM, Sheu SY, Lin CJ, Tseng MC, Chen YJ, Chang ZF (2012) Tumor Cells Require Thymidylate Kinase to Prevent dUTP Incorporation during DNA Repair. *Cancer Cell* **22**(1): 36-50
- Katsuno Y, Suzuki A, Sugimura K, Okumura K, Zineldeen DH, Shimada M, Niida H, Mizuno T, Hanaoka F, Nakanishi M (2009) Cyclin A-Cdk1 regulates the origin firing program in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**(9): 3184-3189
- Kumar D, Abdulovic AL, Viberg J, Nilsson AK, Kunkel TA, Chabes A (2011) Mechanisms of mutagenesis in vivo due to imbalanced dNTP pools. *Nucleic Acids Res*
- Lee YD, Elledge SJ (2006) Control of ribonucleotide reductase localization through an anchoring mechanism involving Wtm1. *Genes Dev* **20**(3): 334-344
- Lisby M, Rothstein R (2009) Choreography of recombination proteins during the DNA damage response. *DNA Repair (Amst)* **8**(9): 1068-1076
- Marheineke K, Hyrien O (2004) Control of replication origin density and firing time in *Xenopus* egg extracts: role of a caffeine-sensitive, ATR-dependent checkpoint. *J Biol Chem* **279**(27): 28071-28081

- Maya-Mendoza A, Petermann E, Gillespie DA, Caldecott KW, Jackson DA (2007) Chk1 regulates the density of active replication origins during the vertebrate S phase. *Embo J* **26**(11): 2719-2731
- Merrick CJ, Jackson D, Diffley JF (2004) Visualization of altered replication dynamics after DNA damage in human cells. *J Biol Chem* **279**(19): 20067-20075
- Moss J, Tinline-Purvis H, Walker CA, Folkes LK, Stratford MR, Hayles J, Hoe KL, Kim DU, Park HO, Kearsey SE, Fleck O, Holmberg C, Nielsen O, Humphrey TC (2010) Break-induced ATR and Ddb1-Cul4(Cdt)2 ubiquitin ligase-dependent nucleotide synthesis promotes homologous recombination repair in fission yeast. *Genes Dev* **24**(23): 2705-2716
- Nakanishi M, Katsuno Y, Niida H, Murakami H, Shimada M (2010) Chk1-cyclin A/Cdk1 axis regulates origin firing programs in mammals. *Chromosome Res* **18**(1): 103-113
- Nicander B, Reichard P (1985) Relations between synthesis of deoxyribonucleotides and DNA replication in 3T6 fibroblasts. *J Biol Chem* **260**(9): 5376-5381
- Niida H, Katsuno Y, Sengoku M, Shimada M, Yukawa M, Ikura M, Ikura T, Kohno K, Shima H, Suzuki H, Tashiro S, Nakanishi M (2010) Essential role of Tip60-dependent recruitment of ribonucleotide reductase at DNA damage sites in DNA repair during G1 phase. *Genes Dev* **24**(4): 333-338
- Niida H, Tsuge S, Katsuno Y, Konishi A, Takeda N, Nakanishi M (2005) Depletion of Chk1 leads to premature activation of Cdc2-cyclin B and mitotic catastrophe. *J Biol Chem* **280**(47): 39246-39252
- Nordlund P, Reichard P (2006) Ribonucleotide reductases. *Annu Rev Biochem* **75**: 681-706
- Petermann E, Helleday T, Caldecott KW (2008) Claspin promotes normal replication fork rates in human cells. *Mol Biol Cell* **19**(6): 2373-2378
- Petermann E, Woodcock M, Helleday T (2010) Chk1 promotes replication fork progression by controlling replication initiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**(37): 16090-16095
- Poli J, Tsaponina O, Crabbe L, Keszthelyi A, Pantesco V, Chabes A, Lengronne A, Pasero P (2012) dNTP pools determine fork progression and origin usage under replication stress. *EMBO J*
- Pontarin G, Fijolek A, Pizzo P, Ferraro P, Rampazzo C, Pozzan T, Thelander L, Reichard PA, Bianchi V (2008) Ribonucleotide reduction is a cytosolic process in mammalian cells independently of DNA damage. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**(46): 17801-17806
- Roseaulin L, Yamada Y, Tsutsui Y, Russell P, Iwasaki H, Arcangioli B (2008) Mus81 is essential for sister chromatid recombination at broken replication forks. *EMBO J* **27**(9): 1378-1387
- Schwartz EK, Heyer WD (2011) Processing of joint molecule intermediates by structure-selective endonucleases during homologous recombination in eukaryotes. *Chromosoma* **120**(2): 109-127
- Scorah J, Dong MQ, Yates JR, 3rd, Scott M, Gillespie D, McGowan CH (2008) A conserved proliferating cell nuclear antigen-interacting protein sequence in Chk1 is required for checkpoint function. *J Biol Chem* **283**(25): 17250-17259

- Scorah J, McGowan CH (2009) Claspin and Chk1 regulate replication fork stability by different mechanisms. *Cell Cycle* **8**(7): 1036-1043
- Sherman PA, Fyfe JA (1989) Enzymatic assay for deoxyribonucleoside triphosphates using synthetic oligonucleotides as template primers. *Anal Biochem* **180**(2): 222-226
- Shimura T, Toyoshima M, Adiga SK, Kunoh T, Nagai H, Shimizu N, Inoue M, Niwa O (2006) Suppression of replication fork progression in low-dose-specific p53-dependent S-phase DNA damage checkpoint. *Oncogene* **25**(44): 5921-5932
- Skoog L, Nordenskjold B (1971) Effects of hydroxyurea and 1-beta-D-arabinofuranosylcytosine on deoxyribonucleotide pools in mouse embryo cells. *Eur J Biochem* **19**(1): 81-89
- Sorensen CS, Syljuasen RG (2012) Safeguarding genome integrity: the checkpoint kinases ATR, CHK1 and WEE1 restrain CDK activity during normal DNA replication. *Nucleic Acids Res* **40**(2): 477-486
- Speroni J, Federico MB, Mansilla SF, Soria G, Gottifredi V (2012) Kinase-independent function of checkpoint kinase 1 (Chk1) in the replication of damaged DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**(19): 7344-7349
- Syljuasen RG, Sorensen CS, Hansen LT, Fugger K, Lundin C, Johansson F, Helleday T, Sehested M, Lukas J, Bartek J (2005) Inhibition of human Chk1 causes increased initiation of DNA replication, phosphorylation of ATR targets, and DNA breakage. *Mol Cell Biol* **25**(9): 3553-3562
- Tanaka H, Arakawa H, Yamaguchi T, Shiraishi K, Fukuda S, Matsui K, Takei Y, Nakamura Y (2000) A ribonucleotide reductase gene involved in a p53-dependent cell-cycle checkpoint for DNA damage. *Nature* **404**(6773): 42-49
- Taylor JH (1977) Increase in DNA replication sites in cells held at the beginning of S phase. *Chromosoma* **62**(4): 291-300
- Thelander L (2007) Ribonucleotide reductase and mitochondrial DNA synthesis. *Nat Genet* **39**(6): 703-704
- Tuduri S, Tourriere H, Pasero P (2010) Defining replication origin efficiency using DNA fiber assays. *Chromosome Res* **18**(1): 91-102
- Yao R, Zhang Z, An X, Bucci B, Perlstein DL, Stubbe J, Huang M (2003) Subcellular localization of yeast ribonucleotide reductase regulated by the DNA replication and damage checkpoint pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(11): 6628-6633
- Zhang YW, Jones TL, Martin SE, Caplen NJ, Pommier Y (2009) Implication of checkpoint kinase-dependent up-regulation of ribonucleotide reductase R2 in DNA damage response. *J Biol Chem* **284**(27): 18085-18095

Figure legends

Figure 1. Exogenous nucleotide precursors can rescue replication fork slow down triggered by Chk1 depletion. (A) Scheme of the protocol used and of a DNA fiber obtained by the molecular combing technique. After transfection with siRNAs and supplementation of deoxyribonucleosides (dNs), replication forks are labeled by two consecutive pulses of thymidine analogs (IdU and CldU). After combing, DNA molecules are immuno-stained in blue, and IdU and CldU, in green and red respectively. DNA counterstaining ensures that replication signals belong to the same fiber and enables to discard broken fibers. (B) Upper panel. Western blots showing the 80-90% efficiency of Chk1-depletion in JEFF and CHEF cells. β actin is shown as a loading control. NT, NONsi, siChk1: Non-transfected, transfected with a control siRNA, or a set of Chk1 siRNAs, respectively. Different set of siRNAs were used to target Chinese hamster or human Chk1 mRNAs (see experimental procedures). Lower panel. Dot plots of relative fork speed in JEFF and CHEF cells. Mean replication fork speed of each cell-type is provided in Figure S1. Supplementation of dNs and transfections are as indicated on the figure. Only untruncated forks, as determined by DNA counterstaining were considered. Horizontal grey lines represent the median of relative fork speed distribution. Medians are indicated above each distribution (an asterisk indicates $p \leq 0.05$, and ns indicates $p > 0.05$). Note that each cell line behaves differently upon dNs addition. The data are from one representative out of two independent experiments. (C) Relative fork speed in UCN-01 or DMSO treated CHEF cells is represented as in (B). The data are from one representative out of two independent experiments.

Figure 2. Chk1 depletion does not affect dNTP pool size. (A) Barplot showing the mean dNTP pool size as determined by an enzymatic assay (see experimental procedures) in JEFF cells treated with the indicated doses of hydroxyurea (HU). Mean of two to four independent experiments is shown. Bars indicate standard deviation (SD). (B) Upper panel is an illustration of reduced fork progression, as observed on single DNA molecules of JEFF cells treated with the indicated concentrations of HU. Scale bar indicates the length of stretched DNA in kilobase (kb). Lower panel. Dot plots of relative fork speed are shown as in Figure 1. JEFF and CHEF cells were treated with the indicated doses of HU. Fork speed was determined in JEFF cells treated with 1 mM of HU (red). Although traveling very slowly, forks were not completely arrested (*: $p \leq 0.05$; ns, $p > 0.05$). (C) Barplot showing the mean \pm SD dNTP pool size as determined in JEFF (n=5) and CHEF cells (n=4) transfected or not with the indicated siRNAs. NT, NONsi, siChk1: Non-transfected, transfected with a control siRNA, or a set of Chk1 siRNAs.

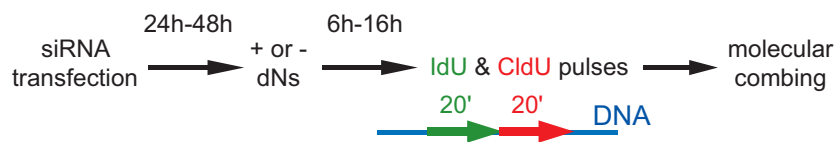
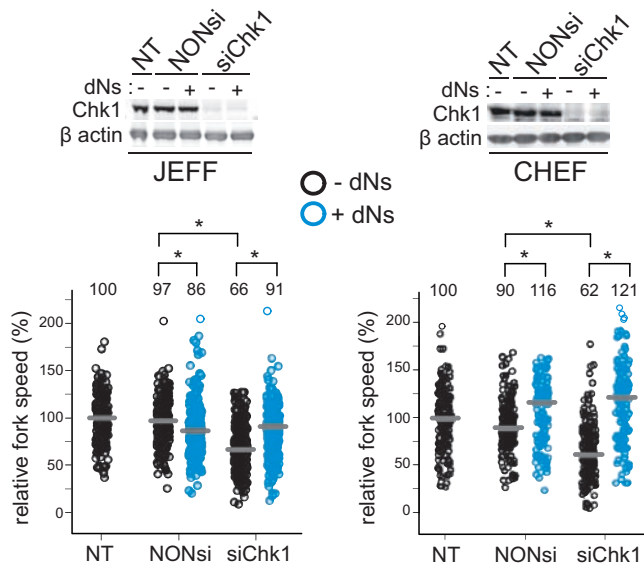
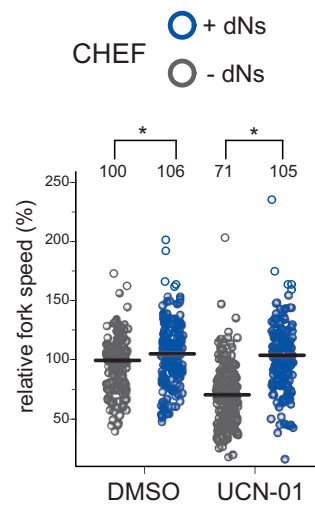
Figure 3. Origin firing is fine-tuned by fork speed independently of Chk1 status. (A) Example of a cluster of replication origins (ori). The inter-origins distance (IOD) is the length in kilobase (kb) between two adjacent origins. (B) Distribution of relative IOD in JEFF and CHEF cells. Medians IOD of respectively 117 kb and 84 kb were obtained in non-transfected -JEFF and -CHEF (NT) cells and were used to normalize the data. Transfections and addition of dNs are represented as in Figure 1. Horizontal grey lines represent the median relative IOD. Medians and significativities are indicated above the distribution (*: $p \leq 0.05$; ns: $p > 0.05$). (C) Distribution of relative IOD in JEFF and CHEF cells treated with the indicated doses of HU and shown as in (B). Median IOD of 99 kb was measured in non-transfected -JEFF and -CHEF cells. (D) Graph showing the linear correlation between relative median fork speed and relative median IOD in JEFF cells treated with increasing doses of HU. Values are that shown in Figures 2 and 3C, and relative medians were obtained by normalization of medians to controls values (without HU). The Pearson coefficient of linear correlation (r) is indicated. Data from the experiments showed in Figures 1 and 3B are represented. The same analysis was done with CHEF cells and is presented in Figure S2. (E) Fork density was assessed in JEFF cells transfected and supplemented or not with dNs as indicated on the figure. Fork density is the number of forks divided by the total length of DNA molecules (Mb) and normalized by the percentage of S-phase cells. The corresponding FACS analyses are shown in Figure S3.

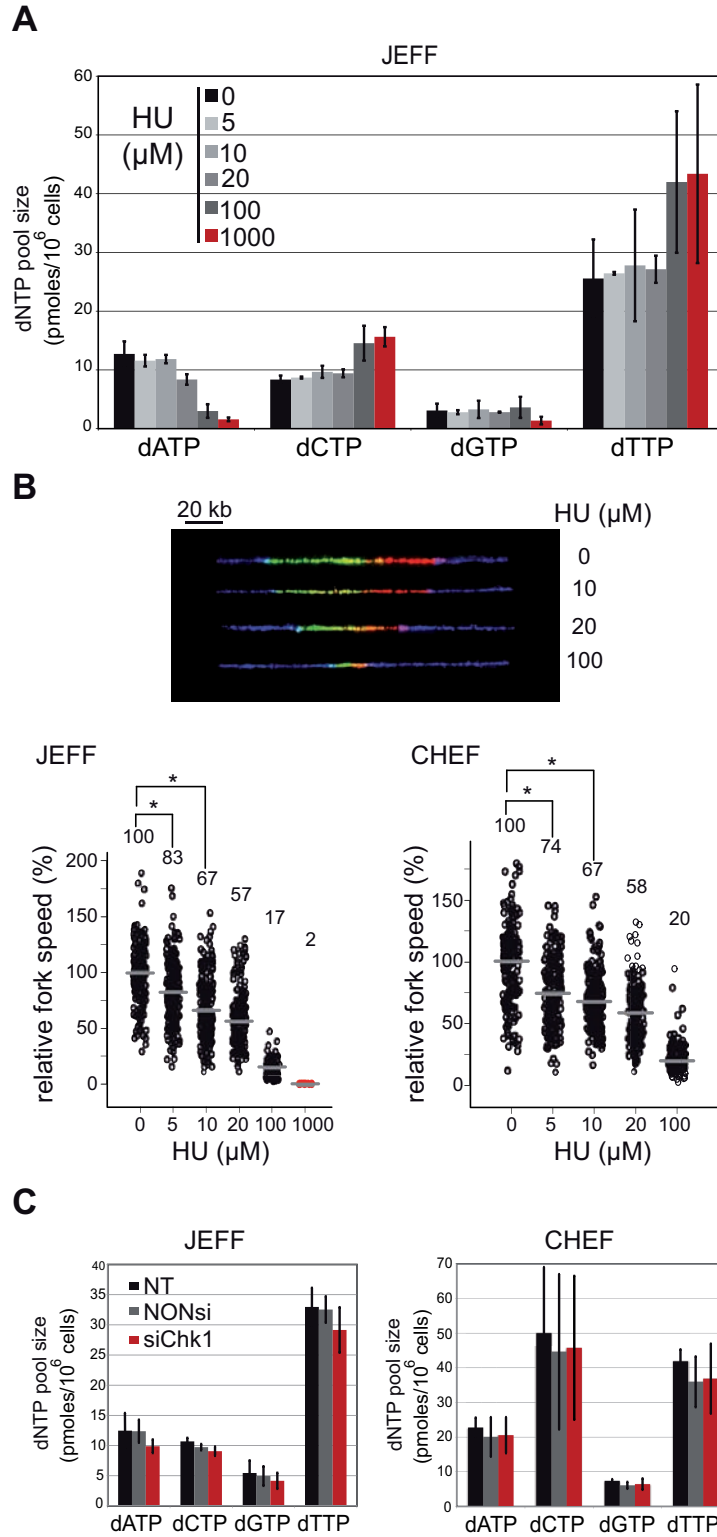
Figure 4. Chk1 deficiency leads to DNA damage and accumulation of p53R2, which impedes the progression of replication forks. (A) Left panel: JEFF whole-cell extracts (WCE) were separated by SDS-PAGE and analyzed by western blotting. Transfection conditions and supplementation or not with dNs are as indicated on the figure. β actin is shown as a loading control. Right panel: p53s15P and γ H2AX levels were normalized to that of β actin and expressed as a percentage of intensities obtained in Chk1-depleted cells. Mean \pm SD of two independent experiments. (B) Messenger RNAs were extracted and quantified by RT-qPCR. RRM2B, RRM2 and RRM1 are the genes encoding respectively for p53R2, R2 and R1 subunits of the RNR. Messenger RNAs levels were normalized to that of cyclophilin B housekeeping gene expression. Histograms represent the means \pm SD of three independent experiments. See Figure S6 for expression of RRM2B in Chk1-depleted CHEF cells. (C) Left panel: Western blot analysis of JEFF cell cytoplasmic (cyto), nuclear soluble (nuc) and chromatin (chroma) extracts. GAPDH, Orc2 and histone H3 are shown as internal quality controls of cell fractionation. Transfection conditions and antibodies are indicated. Right panel: Quantification of chromatin-bound levels of the three RNR subunits expressed as a percentage of NONsi signals. Intensities were normalized to the Orc2 signals. Means \pm SD of four independent experiments (D) Upper panel. Efficiency of Chk1

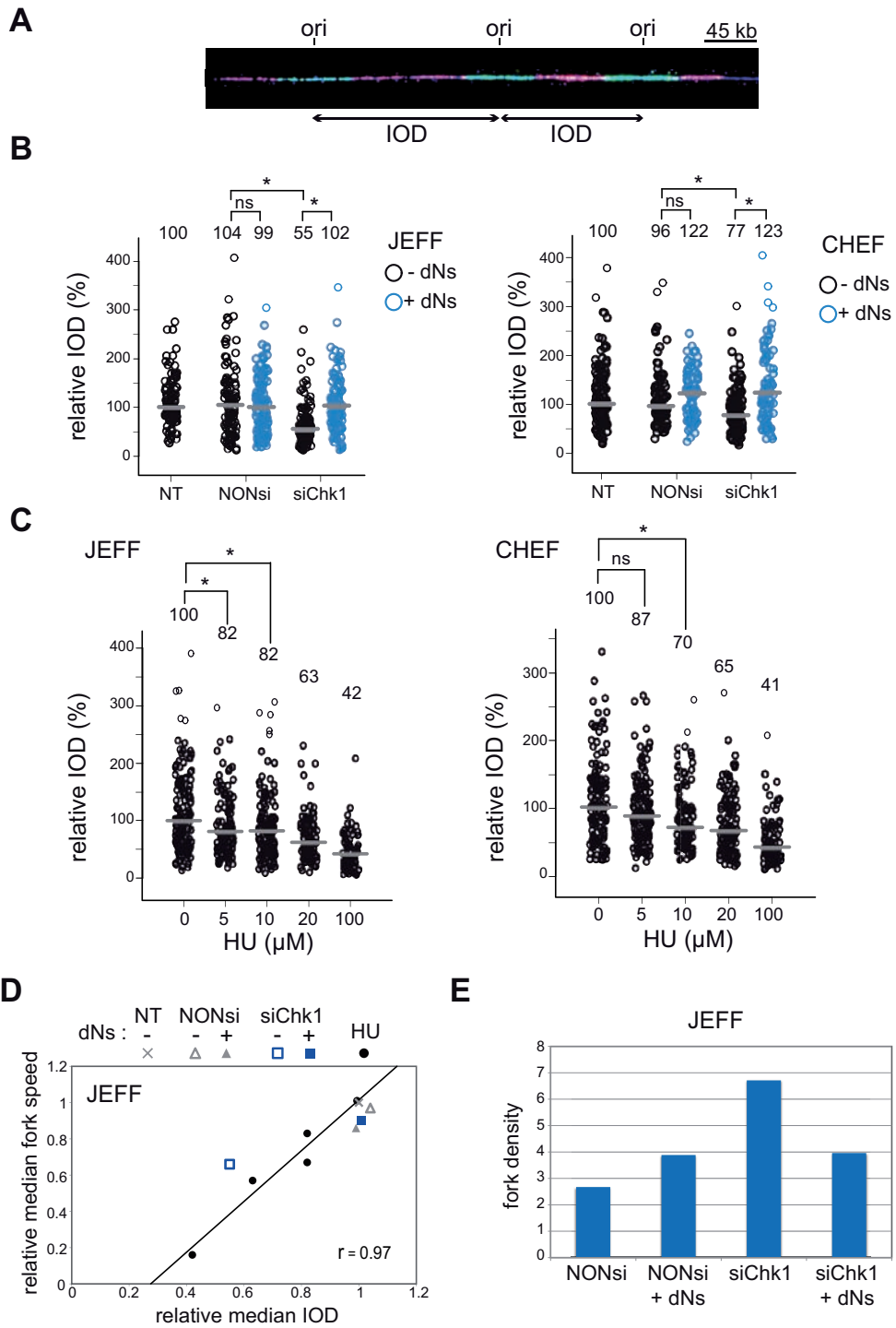
and p53R2 depletion in JEFF cells. Lower panel. Dot-plots of relative fork speed after depletion of Chk1 and/or p53R2. Medians and significativities are indicated above the distributions (*: $p \leq 0.05$; ns, $p > 0.05$). The data are one representative from two independent experiments. (E) Dot-plots of relative fork speed distribution after depletion of Chk1 and/or p53R2 in CHEF cells. Efficiency of p53R2 mRNA depletion was assessed by RT-qPCR and is shown in Figure S6. (F) Right panel: western-blot analysis of JEFF WCE. Ponceau staining is used as a loading control. Arrow indicates Chk2. Asterisk indicates non-specific bands. Left panel: Dot-plots of relative fork speed distribution after depletion of Chk1 and/or Chk2 in JEFF cells.

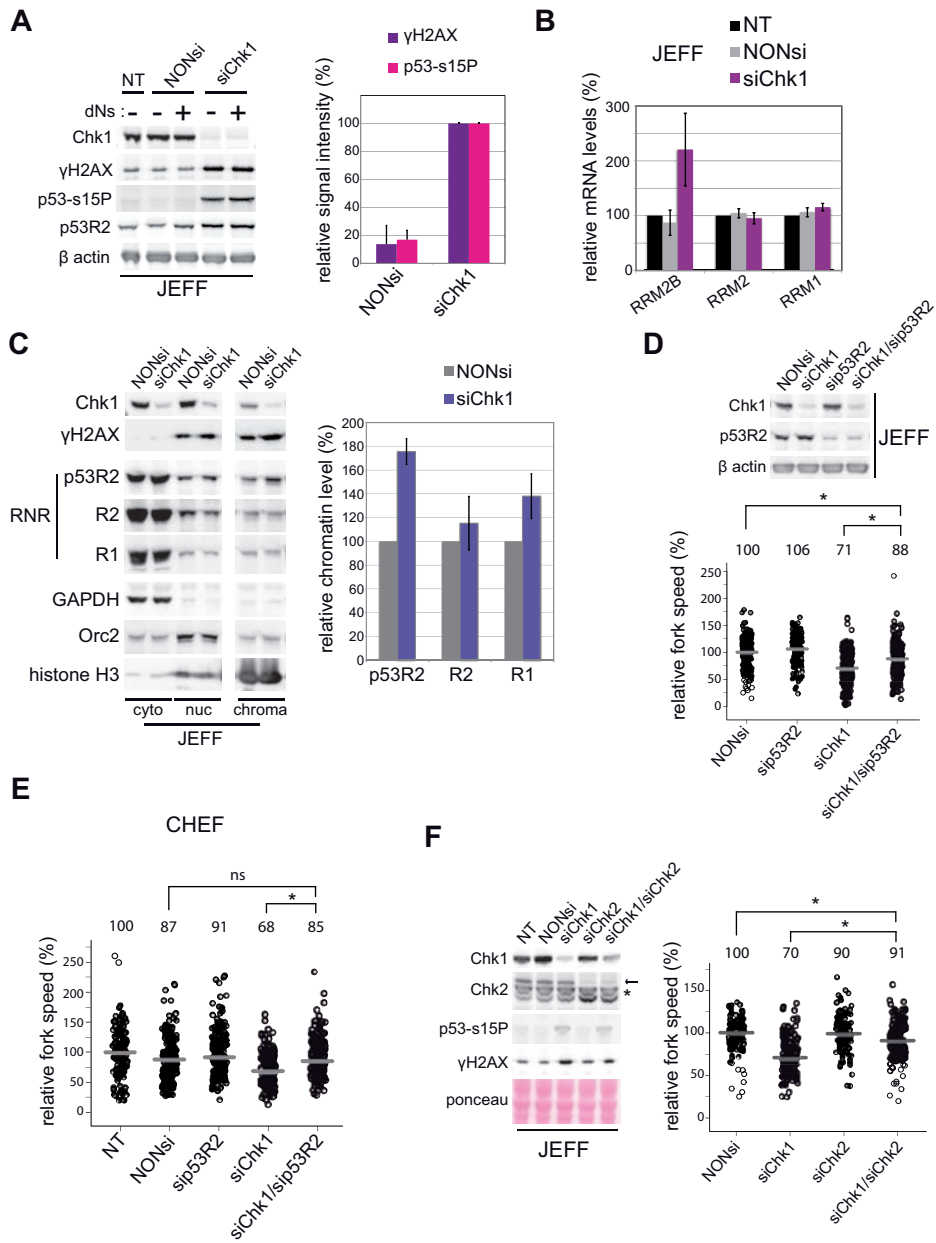
Figure 5. p53R2 up-regulation leads to the slowing down of forks in Rad51 deficient cells. (A) Dot-plots of relative fork speed distribution after depletion of Rad51 in JEFF cells and/or addition of dNs. (B) Western blot analysis of JEFF WCE. Transfection conditions, addition or not of dNs and antibodies are indicated. Ponceau staining is used as a loading control. (C) RNAs were extracted and RRM2B level was quantified by RT-qPCR. Expression levels were normalized to that of cyclophilin B. (D) Dot-plots of relative fork speed distribution in JEFF cells depleted for Rad51 and/or p53R2. Efficiency of depletion is shown in (B). (E and F) Relative fork speed in V79 cells carrying an empty vector (puro) or over-expressing a dominant-negative form of Rad51 (SMRad51) is represented as in (A). Transfections and addition of dNs are indicated on the figure. Mean fork speed in V79 cells is shown in Figure S1.

Figure 6. Model for the interplay between DDR and replication in Chk1 and Rad51 deficient cells. DNA damages arising spontaneously in Chk1 or Rad51 deficient cells activate the ATM-Chk2-p53 branch of the DDR. Active p53 up-regulates the expression of p53R2, the damage-dependant subunit of the RNR. Titration of the R1 subunit by over-expressed p53R2 and/or re-localization of active RNR redirect part of the precursors toward repair, at the expense of replication. This channeling of dNTPs then leads to fork slowing and passive recruitment of latent origins by the so-called compensation mechanism.

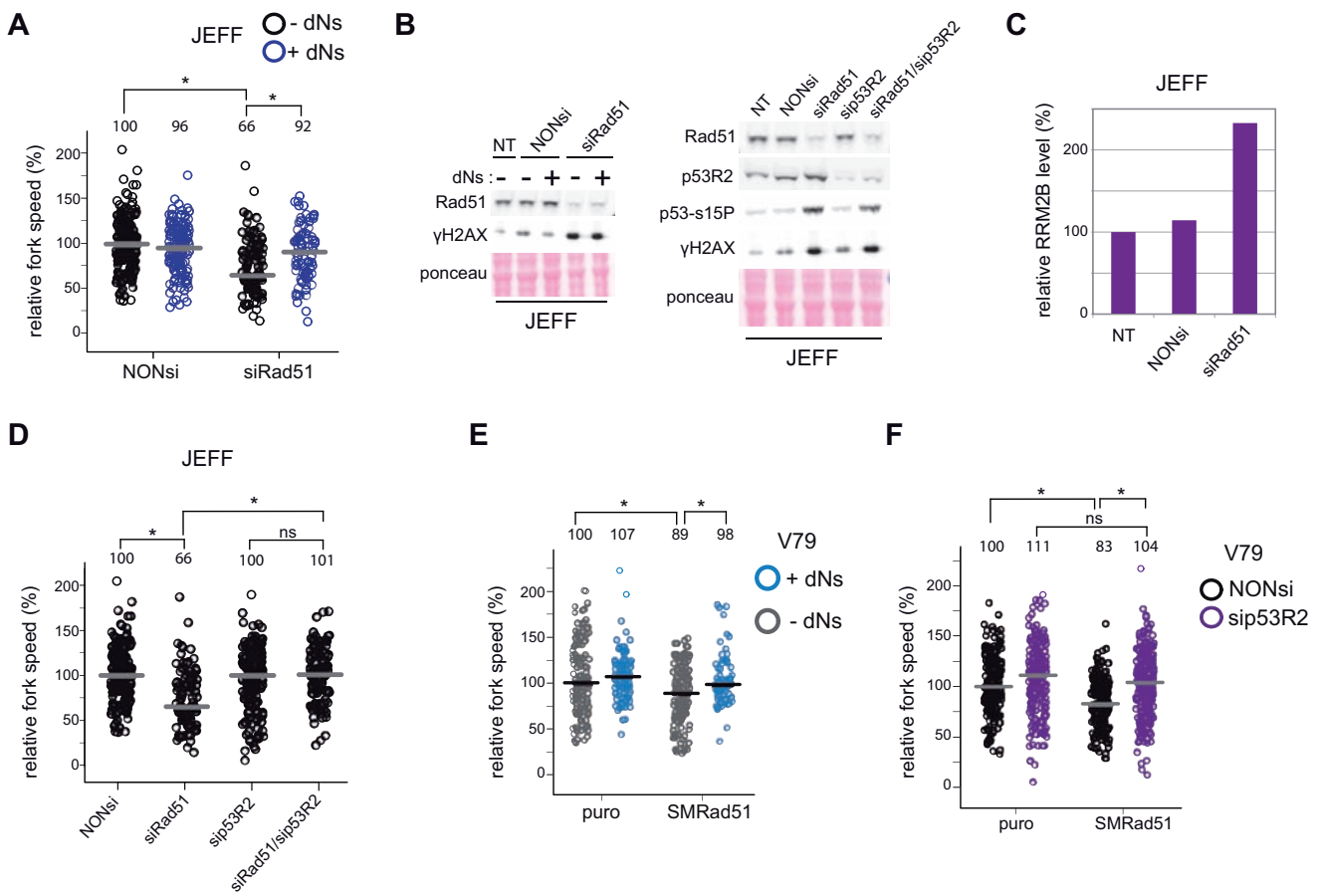
A**B****C**



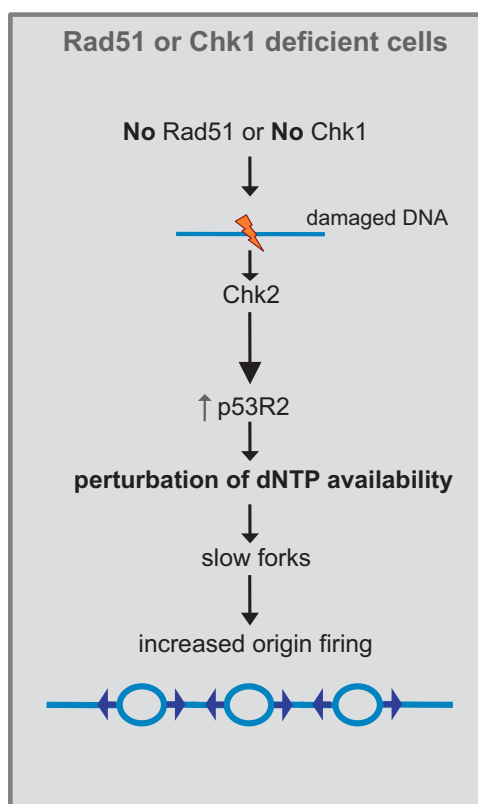




Técher_fig 5



Técher_fig 6



Supplementary information

Chk1 or Rad51 deficiency perturbs replication dynamics *via* p53R2-mediated modulation of dNTP pools

Hervé Técher, Therese Wilhelm, Sandra Carignon, Gaël A. Millot, Bernard S. Lopez, Olivier Brison and Michelle Debatisse*

* Correspondence should be addressed by email to: michelle.debatisse@curie.fr

Supplemental data

Supplementary table S1

Supplemental table S1 summarizes the statistical analysis performed in this study, and is provided as a separate file.

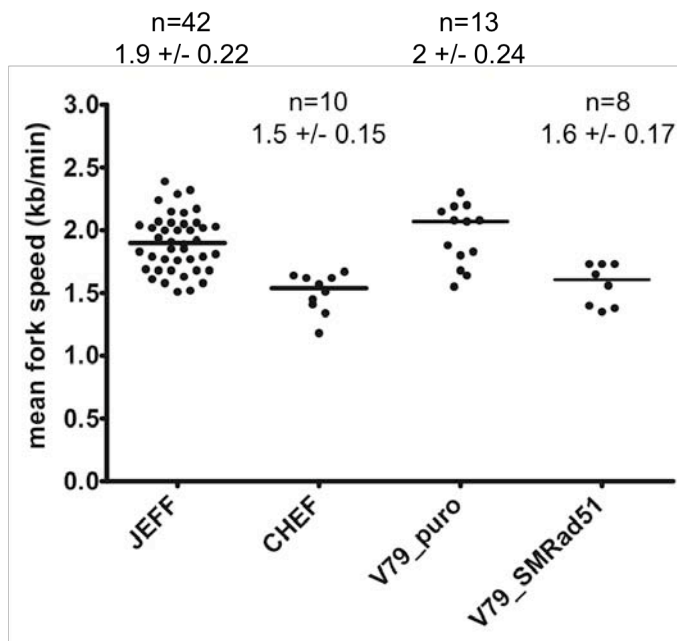


Figure S1. Determination of the mean replication fork speed for each cell-type. The DNA combing methodology was used to monitor fork speed in the four different type of cells used in this study. Dot plots of the mean fork speed in JEFF (EBV- immortalized human lymphocytes), CHEF (Chinese hamster embryonic fibroblasts), V79 puro (line of Chinese hamster fibroblasts carrying an empty vector) and V79 SMRad51 (over-expressing a dominant-negative form of Rad51) cells obtained from independent experiments. Horizontal black lines represent the mean of the mean distribution, and n the number of independent mean obtained from non-treated cells or cells transfected with a control siRNA. Means +/- standard deviation (SD) are indicated above distributions.

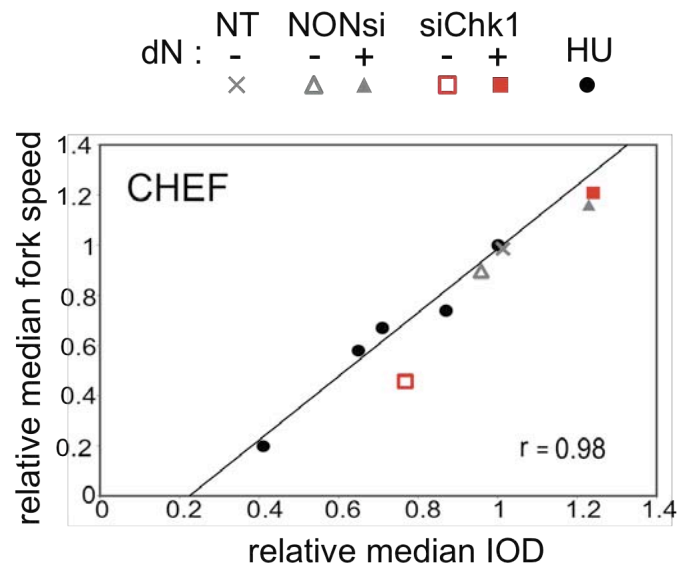


Figure S2. Origin spacing is linearly correlated to fork speed in CHEF cells. Graph showing the linear correlation between relative median fork speed and relative median IOD in CHEF cells treated with increasing doses of HU. The values are that shown in figures 2B and 3C, and relative medians were obtained by normalization of medians to controls values (without HU or non transfected). The Pearson coefficient of linear correlation (r) is indicated. Dots corresponding to the experiments showed in Figures 1B and 3B are represented, and the corresponding legends are above the graph.

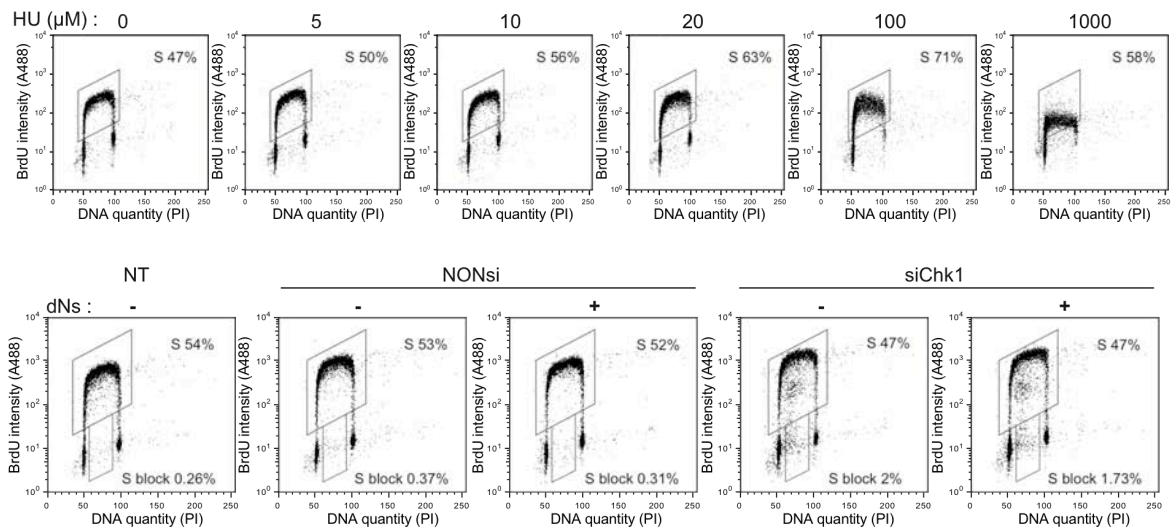


Figure S3. Low doses of HU or Chk1 depletion do not affect cell-cycle progression and BrdU incorporation in JEFF cells. JEFF cells were treated or transfected as indicated on the figure, and were then pulse-labeled with bromodeoxyuridine (BrdU) for 15 min. BrdU incorporation was revealed with Alexa 488 bound antibodies and DNA content was stained by propidium iodide (PI). The represented gate was used to count cells in S-phase and the associated percentage is shown. Cells that are in S phase but did not incorporate BrdU are indicated by S block percentage.

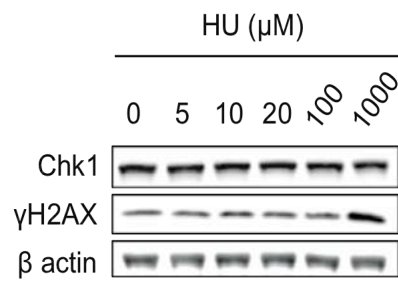


Figure S4. Low doses of HU do not lead to DNA damage in JEFF cells. JEFF cells were treated with the indicated doses of hydroxyurea (HU) and the apparition of DNA damage was followed by γ H2AX signal in whole-cell extracts. Chk1 and β -actin are used as loading controls. Chk1 level is not altered upon HU treatment.

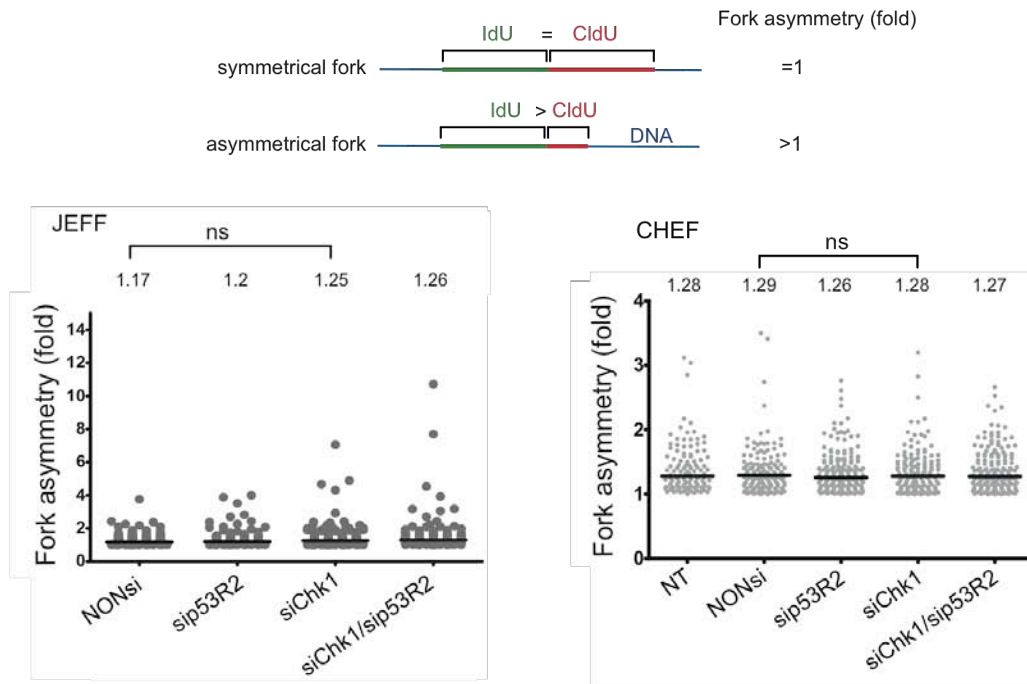


Figure S5. Analysis of fork asymmetry in CHEF and JEFF cells.

Upper panel. Stalling should lead to asymmetrical forks, namely to individual forks presenting unequal IdU and CldU tracks. Therefore, we calculated asymmetry as the ratio of the longest to the shortest track. Thus, fork asymmetry variable corresponded to $\max(d_I/d_{Cl}, d_{Cl}/d_I)$, which varies between 1 (no asymmetry) and $+\infty$ (theoretical maximal asymmetry), with d_I and t_I being the measured distance (in kb) and labelling time (in min) for IdU incorporation, respectively, and d_{Cl} and t_{Cl} the corresponding parameters for CldU incorporation. Lower panel. Distribution of fork asymmetry in JEFF and CHEF cells. Transfections are as indicated on the figure. Fork asymmetry does not increase in Chk1-depleted JEFF or CHEF cells as indicated by ns (p-value>0.05).

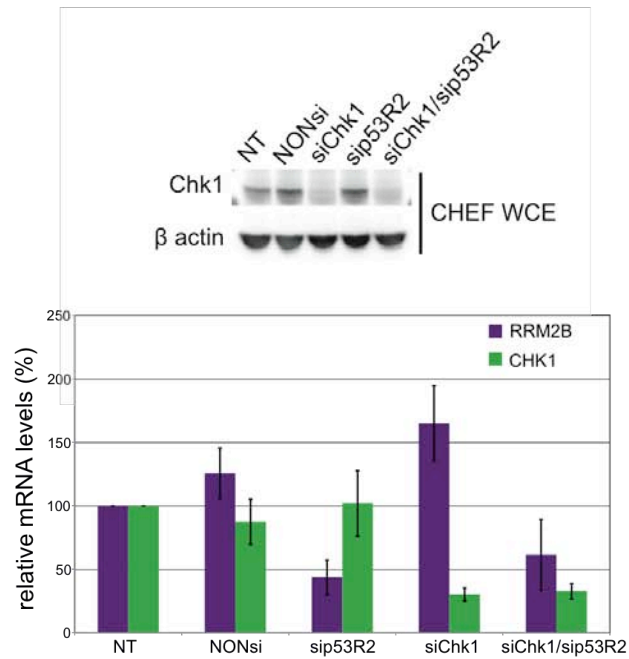


Figure S6. Analysis of p53R2 (RRM2B) expression in CHEF cells.

Silencing of p53R2 (RRM2B) was assayed by RT-qPCR in CHEF cells. Because antibodies targeting p53R2 were not able to recognize Chinese hamster p53R2 we extracted messenger RNAs from CHEF cells and quantified RRM2B expression levels in cells transfected as indicated. Chk1 depletion was assessed by western blotting (upper panel) and RT-qPCR (lower panel) as an internal quality control of the procedure. RRM2B and CHK1 transcripts levels were normalized on that of GNAI3 alpha. Mean +/- SD of two independent experiments.

Supplementary materials and methods

Antibodies

The primary antibodies used in these studies were: mouse anti- β -actin (Clone AC-74, SIGMA), mouse anti-GAPDH (MAB374, Millipore), mouse anti- γ H2AX S139 (clone JBW 301, Millipore), rabbit anti-p53s15P (#9284S, Cell Signaling), rabbit anti-histone H3 (ab1791-100, Abcam). From Santa Cruz: goat anti-Orc2 (sc-13238), goat anti-p53R2 (sc-10840), goat anti-R1 (sc-11733), goat anti-R2 (sc-10844), and mouse anti-Chk1 (sc-8408).

RT-qPCR primers

Cyclophilin B-Fw: 5'-GTGAGCGCTTCCCCGATGAG-3'
Cyclophilin B-Rv: 5'-TGCCAAACACCACATGCTTGC-3'
GNAI3 alpha-Fw : 5'-CATGGGCTGCACGTTGAG-3'
GNAI3 alpha-Rv : 5'-GTTGCGGTCAATCATCTTGCT-3'
CHK1-Fw: 5'-TGGTGAAGAAGCGTGTCATTCT-3'
CHK1-Rv: 5'-GGTACCCCTGGATCCTCACA-3'
RRM2B-Fw: 5'-CCAGTGATGGAATTGTAAATGAAAA-3'
RRM2B-Rv: 5'-CAGCGAGCCTCTGGAACCT-3'
RRM2-Fw: 5'-GGCATTCTTTTCCGGTTCT-3'
RRM2-Rv: 5'-ATGTGAGGCCAGGCATCAG-3'
RRM1-Fw: 5'-CAAGGTCGTGTCCGCAAAG-3'
RRM1-Rv: 5'-GGTGCCTGTTTCCGTCTGA-3'

Fw: forward: Rv: reverse.

FACS analysis of BrdU pulse-labeled cells

After the indicated treatment, JEFF cells were pulse-labeled for 15 minutes with 30 μ M of Bromodeoxyuridine (BrdU) purchased from sigma. Cells were rinsed in PBS before fixation in 70% ethanol. Nuclei were isolated in pepsin solution (0.5 mg/mL of pepsin in 30 mM HCl) for 20 minutes at 37 °C. Then nuclei were resuspended in HCl 2N for 20 minutes at room temperature. BrdU was detected by successive incubations with 1/100 of rat anti-BrdU (AbD Serotec) antibody and 2/50 chicken anti-rat Alexa 488 (Invitrogen) antibody. Nuclei were

finally resuspended in propidium iodide (Sigma) before acquisition of data on a FACsort (BD Dickinson). Results were analyzed with FlowJo software.

3. Publication #2

Spontaneous mitotic defects in homologous recombination-deficient cells result from slow replication fork velocity

Therese Wilhelm, Aurélia Barascu, Indiana Magdalou, Hervé Técher, Michelle Debatisse and Bernard S. Lopez

Publication soumise

Spontaneous supernumerary centrosomes result from endogenous slow replication fork progression, in homologous recombination-deficient mammalian cells.

Therese Wilhelm^{2,3}, Aurélia Barascu^{1,2}, Indiana Magdalou^{1,2}, Hervé Técher³, Michelle Debatisse³ and Bernard S. Lopez^{1,2*}

¹Université Paris Sud, Laboratoire «Stabilité Génétique et Oncogénèse» CNRS, UMR 8200 and Institut de Cancérologie Gustave-Roussy, PR2, 114, Rue Edouard Vaillant, 94805 VILLEJUIF.

²CNRS UMR217, CEA, DSV, Institut de radiobiologie cellulaire et moléculaire, 18 route du panorama, Fontenay aux Roses, F-92265, France. ³Institut Curie, Centre de Recherche, 26 rue d'Ulm, 75248 Paris cedex 05, France, UPMC Université Paris 06, F-75005 Paris, France, CNRS UMR 3244, F-75248 Paris, France.

*Corresponding author: bernard.lopez@igr.fr

ABSTRACT

We defined very low hydroxyurea (HU) doses (5 to 10 μ M) that decrease replication fork (RF) speed of wild-type cells to that of unchallenged homologous recombination (HR)-deficient cells. Such HU doses generated supernumerary centrosomes to the level of unchallenged HR-deficient cells. Reciprocally, supplying nucleotides precursors to HR-deficient cells concomitantly rescued the RF velocity, the frequency of spontaneous supernumerary centrosomes and pChk1 activation. This shows that, in HR-deficient cells, spontaneous centrosome amplification results from slow RF speed. These data underline the role of HR at the interface between replication forks progression and chromosome segregation, faced to endogenous or low genotoxic stress.

Keywords: homologous recombination, replication, BRCA, centrosome, genetic instability, breast cancer, mitosis, low doses

Introduction

DNA is continuously subjected to injury by exogenous or endogenous sources. The faithful transmission of genetic material requires precise control of the DNA damage response (DDR), which brings together and coordinates a network of pathways including DNA replication with DNA repair/recombination, the cell cycle checkpoint, and chromosome segregation. A defect in either one of these pathways leads to genetic instability and cancer predisposition. Of note, in pre-cancerous and early-stage malignancies, both spontaneous DDR activation, interpreted as a consequence of endogenous replication stress, and centrosome abnormalities, leading to aneuploidy and genomic instability, have been reported (Nigg, 2002; Sluder and Nordberg, 2004; Bartkova et al., 2005; Gorgoulis et al., 2005). Therefore, endogenous stresses must play a key role in spontaneous genetic instability and the etiology of cancer.

Homologous recombination (HR) is an evolutionarily conserved process that controls the balance between genetic stability and diversity. Particularly, HR plays a pivotal role in the reactivation of replication forks that have been blocked (Michel et al., 2001; Saintigny et al., 2001; Lomonosov et al., 2003; Petermann et al., 2010; Schlacher et al., 2011). Because replication forks are routinely inactivated by endogenous stress (Hyrien, 2000), HR should play an essential role in protection against spontaneous replication stress and thus against spontaneous genetic instability. Remarkably, unchallenged HR-defective cells exhibit a spontaneous genome-wide deceleration of replication fork progression, associated with an increased number of active replication origins (Daboussi et al., 2008). On the other hand, HR-deficient cells also display a spontaneous increase in the frequency of supernumerary centrosomes and in aneuploid cells (Griffin et al., 2000; Deng, 2002; Kraakman-van der Zwet et al., 2002; Bertrand et al., 2003;

Daboussi et al., 2005; Plo and Lopez, 2009). Since centrosomes do not contain DNA, the impact of the HR process on centrosomes duplication remains puzzling.

Here, we address the question as whether, similarly to the firing of replication origins, spontaneous supernumerary centrosomes actually result from endogenous slow replication fork velocity, in untreated HR-deficient cells. More generally, we address the question of the origin of spontaneous chromosome instability in HR-deficient cells. Of note, such HR deficiency is encountered in most of the familial breast cancer situations (Walsh et al., 2011), but also in sporadic breast cancer: indeed, AKT1 activation, which has been described in found in 40 to 60% of sporadic breast cancer, or PTEN inactivation also lead to HR inhibition (Shen et al., 2007; Plo et al., 2008; Plo and Lopez, 2009; McEllin et al., 2010). We showed here that decreasing replication forks speed by very low doses of hydroxyurea (HU) mimics the mitotic defects observed in unchallenged HR-deficient cells. Moreover, the addition of nucleotide precursors alleviates fork slowing and the appearance of supernumerary centrosomes in HR-defective cells. The data presented here underline the potentially dramatic consequences of very subtle, spontaneous, endogenous nucleotide pool variation on faithful chromosome segregation and the importance of HR at the molecular interface between replication and mitosis for protection against spontaneous aneuploidy and genomic instability.

RESULTS AND DISCUSSION

Impact of low HU doses on the cell cycle checkpoint and replication fork velocity.

The cell lines used in this study are derived from hamster V79 cells because several extensively characterized HR-defective mutants exist in this background. Notably, we used cells that were affected by a mutation in the endogenous *BRCA2* gene (VC-8 cells) (Kraakman-van der Zwet et al., 2002) and cells that express a non-toxic dominant negative form of RAD51 (SMRAD51), which specifically inhibits gene conversion without affecting cell viability (Lambert and Lopez, 2000; Bertrand et al., 2003).

In an attempt to reproduce the spontaneous slow replication fork progression of HR-deficient cells, we analyzed genome-wide replication fork velocity following the treatment of wild-type and mutant cells with increasing doses of HU, which depletes the deoxyribonucleotide (dNTP) pools (Skoog and Nordenskjold, 1971). Indeed, doses between 1 and 5 mM are commonly used to arrest cells in S phase; however, it was expected that lower doses could reduce replication forks progression instead of blocking them.

Flow cytometry (FACS) analysis demonstrated that increasing the dose of HU results in a progressive increase in the number of S phase cells accompanied by a reduction in the number of cells in the G1 phase, thus revealing a progressive accumulation of cells in S phase (Supplementary Data S1). A significant accumulation of cells in S phase began at doses between 50 and 250 μ M HU, in wild-type cell lines, and at 50 μ M HU in HR-deficient cell lines. 10- μ M HU significantly affected neither cell cycle distribution nor BrdU incorporation (Supplementary

Data S1), demonstrating that the cells were actively replicating their DNA and progressing efficiently through the S phase.

Interestingly, untreated HR-deficient cells exhibit a spontaneous higher level of phosphorylated pCHK1 than their respective controls (Figures 1A and 1B), thus revealing endogenous replication stress in this genetic context. Consistently with the cell cycle data (supplementary data S1), the level of pCHK1 progressively increased in a HU dose dependent manner: 10 μ M HU increased pCHK1 neither in wild-type nor HR-mutant cells, pCHK1 activation began to be detectable at 50 μ M (except for the VC8#13) and the high HU doses strongly activated pChk1 (Figure 1B).

Replication fork velocity was monitored using single molecule analysis (molecular combing) , which was not possible at 250 μ M to 1 mM HU doses because the cells did not efficiently incorporate nucleotide analogues as confirmed by FACS analysis with BrdU (see Supplementary Data S1). To focus on the kinetics of replication forks that travel unimpeded, we measured symmetrically double-labeled DNA fibers (Figure 2, upper panel). Although cell cycle progression was only moderately affected in wild-type cells treated with 100 μ M HU, (Supplementary Data S1), the replication tracts were much shorter than those in untreated cells, demonstrating that genome-wide replication fork progression was strongly affected by treatment with 100 μ M HU (Figure 2, see single molecules in the upper panels); the mean fork speeds were reduced five-fold ($p < 0.0001$) and six-fold ($p < 0.0001$) in wild-type and *BRCA2*-complemented cells, respectively (Figure 2, lower panels). The fact that the cell cycle distribution was only moderately affected suggests that the activation of silent replication origins could partially compensate for slow replication progression. Indeed, inter-origin distance was also reduced five- and six-fold in V79 and VC-8#13 cells, respectively (Supplementary data S2A). In addition, the

replication fork density (see the example illustrated in Figure 2, upper panels and the mean values in Supplementary data S2B) was increased upon 100 μ M HU exposure. This shows that HU doses lower than those classically used (1 to 5mM) can actually decelerate replication forks progression instead of arresting them.

Although it did not affect the cell cycle distribution (Supplementary Data S1), surprisingly, 10 μ M HU was able to affect the genome-wide fork speed of wild-type cells (Figure 3). This treatment should correspond to a very subtle and moderate alteration of the nucleotides pools, not measurable by classical assays. In addition, a lower dose i.e., 5 μ M HU, also affected genome wide replication fork elongation kinetics (Figure 3). Of note, the fork speed of wild-type cells treated with 5 or 10 μ M HU were similar to those of untreated HR-defective cells. Inter-origin distances were also significantly reduced in wild-type cells treated with 5 or 10 μ M HU (Supplementary data S3); importantly, these values were not different from those measured in untreated HR-defective cells. Therefore, we determined that treatment of wild-type cells with 5 to 10 μ M HU mimics the replication velocity and origin firing of untreated HR-deficient cells.

These data show that, consistently with recent observation in yeast (Davidson et al., 2012; Poli et al., 2012), regulation of the nucleotide pools can precisely modulate the progression of replication forks, in mammalian cells. Noteworthy, HU treatment progressively affects replication velocity in a dose dependent manner, without the necessity to reach a threshold. Consequently, even very low doses, which do not induce detectable levels of pCHK1, are able to slow down genome-wide RF velocity, suggesting that very low dNTP shortage is sufficient to decelerate replication and that the nucleotides pool is thus a very tight limiting factor in mammalian cells.

Consequences of slow replication fork progression on the frequency of extra centrosomes.

We then analyzed the effect of slowing fork progression on the appearance of supernumerary centrosomes (Figure 4A). The treatment of wild-type cells with 100 μ M HU resulted in a 13-fold increase in the frequency of cells with supernumerary centrosomes, up to 70% and 50% in V79 and VC-8#13 cells, respectively (Figure 4B). Interestingly, at 5 and 10 μ M HU, the frequency of supernumerary centrosome-containing cells was stimulated 4-to 5.5-fold, i.e., to a level comparable to that of unchallenged HR-deficient cells (Figure 4C). Doses of 5 and 10 μ M HU also reduced the replication fork velocity of wild-type cells to the level observed in untreated HR-deficient cells (compare Figure 3 and 4). Noteworthy, similarly to replication velocity, HU treatment also progressively affects supernumerary centrosomes, in a dose dependent manner.

A century ago, Theodor Boveri hypothesized that tumors derived from the clonal expansion of a single cell with improper chromosome segregation generating aneuploidy. He proposed that, in some cases, abnormal chromosome segregation and aneuploidy were due to supernumerary centrosomes leading to multipolar cells (Boveri, 2008). Indeed, supernumerary centrosomes have been shown to lead to the formation of multipolar cells and aneuploidy (Nigg, 2002). However, challenging these observations, bipolar mitoses and balanced chromosome segregation to two daughter cells have been observed in the presence of supernumerary centrosome, resulting from the clustering of the extra centrosome (Godinho et al., 2009). Thus, it is worth verify whether the reduced fork progression can actually lead to multipolar mitosis and aberrant chromosomal segregation, in unchallenged HR-deficient cells and in wild-type cells exposed at very low HU doses. Indeed, unchallenged HR-deficient cells as well as wild-type cells exposed to low doses of HU exhibit mitosis defects. First we calculated the mitotic index under

the conditions used in this study (Supplementary Data S4). The mitotic index was spontaneously increased three-to-four-fold in HR-defective cells compared to their respective controls (Supplementary Data S4). Of note, 5 μ M HU increased the mitotic index to a level comparable to that of unchallenged HR-deficient cells (Supplementary Data S4C and S4D). Second, time-lapse video microscopy revealed a delay in mitosis resulting from prolonged metaphase arrest followed by aberrant chromosome segregation in HR-deficient cells (Supplementary Data S5A and S6). Corroborating this point, Bub1-dependent spontaneous mitotic arrest has been observed in *brca2*^{-/-} cells (Lee et al., 1999). Third the percentage of cells displaying anaphase bridges (Supplementary Data S5A, S5B, S7) increased 3-fold in HR-deficient cells, from 18.5% in wild-type cells to 58.2% in HR-deficient cells (Supplementary Data S5C), as has been previously described in other cell systems (Lahkim Bennani-Belhaj et al., 2010; Laulier et al., 2011). Fourth, we show here that HR-deficient cells undergo aberrant mitosis and chromosome segregation. Here, aberrant mitosis refers to unequal chromosome segregation and division in more than two cells, which is generally generated by multipolar mitosis (supplementary data S5A, S8). Strikingly, the frequency of aberrant mitosis was 9-fold increased, in HR-deficient cells, from 2.2% in wild-type cells to 20% in HR-deficient cells (Supplementary Data S5D). Exposure to 100 μ M HU led to a strong stimulation (>80% of cells) of both anaphase bridges and aberrant mitosis. Interestingly, exposure to 5 and 10 μ M HU also led to anaphase bridge and abnormal mitosis levels that were similar to that of unchallenged HR-defective cells (Supplementary Data S5C and S5D). Note that these doses also similarly affected replication dynamics, mitotic index and supernumerary centrosomes.

These data show that supernumerary centrosomes are accompanied with mitosis troubles both in HR-deficient cells and in wild-type cells submitted to low doses of HU.

Adding nucleotides precursors to HR-defective cells restored fork speed and centrosome duplication.

In order to confirm that the occurrence of extra centrosome actually results from slow RF velocity, we added exogenous precursors of nucleotides (dNs) to culture medium of HR-deficient cells. Indeed, fork slowing often results from limiting or imbalanced dNTP pools, which can be corrected by adding precursors in the culture medium (Anglana et al., 2003; Gay et al., 2010; Bester et al., 2011; Chabosseau et al., 2011). Single molecule molecular combing analysis demonstrated that whereas fork progression of wild-type cells was not modified by dNs addition, this treatment restored the replication fork speed of HR-deficient cells to the level of their respective control (Figure 5A). Interestingly, this treatment also restored the level of spontaneous pChK1 in HR-deficient cells to the level of wild-type cells (Figure 5B). We then measured the frequency of cells developing extra centrosomes upon dNs supply. Strikingly and concomitantly with fork speed restoration, the addition of dNS also restored the frequency of supernumerary centrosomes in both HR-deficient cell lines to the level observed in wild-type cells (Figure 5C). These data also confirmed that the centrosome duplication defect is linked to altered progression of replication forks and that the spontaneous supernumerary centrosomes observed in unchallenged HR-deficient cells result from their slow RF velocity.

Slow replication progression can be in part compensated by silent replication origins firing. However, in some regions of the genome, silent origins cannot be activated, resulting in non-replicated regions (Letessier et al., 2011). Thus, one can propose that unchallenged HR-deficient cells bearing spontaneously blocked replication forks and/or partially replicated regions are able to reach mitosis. Note that this process should be facilitated by the fact that cells are not

arrested by an intraS/G2 checkpoint. Nevertheless, mitotic arrest should be activated. Indeed, an increased mitotic index, prolonged metaphase and delay in chromosomal segregation were recorded here in unchallenged HR-defective cells. Moreover, these cells should exhibit chromosome mis-segregation. For instance, anaphase bridges have been proposed to correspond to unresolved HR intermediates, blocked replication forks (Chan et al., 2009) and non-fully replicated regions. Here, because anaphase bridges occur in HR-deficient cells, they are unlikely to correspond to HR intermediates. One can thus propose that the observed mitotic defects arise from non-disjunction of the chromosomes in non-replicated regions. This conclusion is consistent with the fact that wild-type cells treated with low HU doses also undergo unbalanced chromosome segregation due to the formation of multipolar cells.

Of note, because replication stress frequently leads to the expression of common fragile sites (CFS), the finding of CFS expression in *brca2* defective cells (Ingvarsson et al., 1999) is consistent with our conclusions.

We show here that slowed RF progression (in unchallenged HR-deficient cells or wild-type cells exposed to very low HU doses) leads *in fine* to mitosis alteration, anaphase bridges and multipolar chromosome segregation. Since HR is affected in most of familial breast cancer cases (Walsh and King, 2007), as well as in 40 to 60% of sporadic cases (Plo et al., 2008), the data presented here should account for spontaneous genetic instability in such frequent situations.

Our data emphasize that the nucleotide pool is a very sensitive limiting factor and that even subtle modification triggers dramatic consequences on chromosome stability. The data also shed light on the importance of HR associated with the tight control of the nucleotide pools at the molecular interface between replication and mitosis for protection against spontaneous aneuploidy and chromosome instability, in unchallenged cells.

MATERIAL AND METHODS

Cells. The cell lines were cultured at 37°C under 5% CO₂ in MEM supplemented with 10% fetal bovine serum, 2 mM glutamine, 200 IU/ml penicillin, and 200 µg/ml streptomycin. Stable transfectants expressing SMRAD51 were derived from the V79 cell line. For controls, V79 cells were stably transfected with the pCDNA-puro expression vector (Lambert and Lopez, 2000; Daboussi et al., 2005), which produces V79 puro. We also used the V-C8 cell line, which is defective in the BRCA2 gene, and its counterpart V-C8#13, which is complemented with chromosome 13 (Kraakman-van der Zwet et al., 2002; Wiegant et al., 2006), corresponding to a second wild-type source.

Western blot analysis

Cells were suspended in lysis buffer (600 mM NaCl, Tris pH 7.5, 1 mM EDTA, pH 8, 0.5% NP40) containing protease and phosphatase inhibitor cocktails (Complete Lysis Buffer, Roche, Meylan, France and Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA, respectively). After incubation for 1 hour at 4°C, the samples were cleared by centrifugation at 13000 rpm. For each blot, equal amounts (30 µg) of protein were loaded per sample. Electrophoretic separation, transfer onto nitrocellulose membranes and antibody probing were performed using standard techniques. Proteins were visualized using the ECL Western Blotting System. Chk1 and p-(Ser317)-Chk1 were probed using antibodies at 1:500 dilution (Cell Signaling Technology, Danvers), and actin was probed using a specific antibody at 1:1000 dilution (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA).

Molecular combing. Molecular combing was performed as previously described (Michalet et al., 1997). IdU and CldU labeling (20-min pulse labeling for each) were performed as previously described (Anglana et al., 2003). Briefly, coverslips were incubated for 1 hour with mouse anti-BrdU FITC antibody at 1/5 dilution (Becton Dickson) and rat anti-BrdU antibody at 1/25 dilution (Seralab). Following a wash in 0.5 M NaCl, 20 mM Tris, pH 7.8, and 0.5% Tween 20, the coverslips were incubated with the secondary antibodies Alexa Fluor 488-conjugated goat anti-mouse (Molecular Probes) and Alexa Fluor 594-conjugated goat anti-rat (Molecular Probes), both at 1/50 dilution. After washing, the coverslips were sequentially incubated with three antibodies: mouse anti-DNA at 1/100 dilution (Milipore), rabbit anti-mouse Alexa Fluor 350 at 1/50 dilution (Molecular Probes), and goat anti-rabbit Alexa Fluor 350 at 1/25 dilution (Molecular Probes). For each cell line, 120 fibers with symmetrical green-red labeling were analyzed. To measure the replication origin density, the DNA molecules were uniformly labeled with an anti-DNA antibody as previously described (Anglana et al., 2003). Molecules bearing at least one symmetrical green-red signal were analyzed. A sufficient number of fibers was analyzed such that the total cumulative fiber length was between 7 and 10 Mb, and the number of replication forks traveling along the DNA was determined. Images were obtained and processed as previously described (Anglana et al., 2003).

Centrosome analysis. Cells were fixed in methanol for 15 min at -20°C and permeabilized with acetone. After three washes in PBS, the samples were incubated in 2% bovine serum albumin for 30 min and washed three times in PBS. Centrosomes were stained using a γ -tubulin antibody (Sigma), which was diluted 1/300 in a solution of 0.5% BSA and 0.05% Tween 20 for 1 hour at 37°C . The cells were washed three times in a solution of PBS and 0.05% Tween 20 and were

then incubated with an Alexa Fluor 594-conjugated goat anti-rabbit antibody (Molecular Probes), which was diluted 1/400 in a solution of 0.5% BSA and 0.05% Tween 20 for 1 hour at 37°C. After three washes in a solution of PBS and 0.05% Tween 20, the cells were incubated with DAPI (1 µg/ml). A total of 150 metaphase cells were analyzed per condition.

Statistical analysis. The distributions of replication fork velocity and origin firing in HR-defective and wild-type cells were compared using the Mann-Whitney test.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by “l’Association pour la Recherche contre le Cancer” (ARC) and “l’Institut National du cancer” (INCa). IM received a fellowship from « La Ligue Nationale contre le Cancer».

References

- Anglana, M., F. Apiou, A. Bensimon and M. Debatisse. 2003. Dynamics of DNA replication in mammalian somatic cells: nucleotide pool modulates origin choice and interorigin spacing. *Cell* **114**: 385-394.
- Bartkova, J., Z. Horejsi, K. Koed, A. Kramer, F. Tort, K. Zieger, P. Guldborg, M. Sehested, J.M. Nesland, C. Lukas, T. Orntoft, J. Lukas and J. Bartek. 2005. DNA damage response as a candidate anti-cancer barrier in early human tumorigenesis. *Nature* **434**: 864-870.
- Bertrand, P., S. Lambert, C. Joubert and B.S. Lopez. 2003. Overexpression of mammalian Rad51 does not stimulate tumorigenesis while a dominant-negative Rad51 affects centrosome fragmentation, ploidy and stimulates tumorigenesis, in p53-defective CHO cells. *Oncogene* **22**: 7587-7592.
- Bester, A.C., M. Roniger, Y.S. Oren, M.M. Im, D. Sarni, M. Chaoat, A. Bensimon, G. Zamir, D.S. Shewach and B. Kerem. 2011. Nucleotide deficiency promotes genomic instability in early stages of cancer development. *Cell* **145**: 435-446.
- Boveri, T. 2008. Concerning the origin of malignant tumours by Theodor Boveri. Translated and annotated by Henry Harris. *J Cell Sci* **121 Suppl 1**: 1-84.
- Chabosseau, P., G. Buhagiar-Labarchede, R. Onclercq-Delic, S. Lambert, M. Debatisse, O. Brison and M. Amor-Gueret. 2011. Pyrimidine pool imbalance induced by BLM helicase deficiency contributes to genetic instability in Bloom syndrome. *Nat Commun* **2**: 368.
- Chan, K.L., T. Palmai-Pallag, S. Ying and I.D. Hickson. 2009. Replication stress induces sister-chromatid bridging at fragile site loci in mitosis. *Nat Cell Biol* **11**: 753-760.

- Daboussi, F., S. Courbet, S. Benhamou, P. Kannouche, M.Z. Zdzienicka, M. Debatisse and B.S. Lopez. 2008. A homologous recombination defect affects replication-fork progression in mammalian cells. *J Cell Sci* **121**: 162-166.
- Daboussi, F., J. Thacker and B.S. Lopez. 2005. Genetic interactions between RAD51 and its paralogues for centrosome fragmentation and ploidy control, independently of the sensitivity to genotoxic stresses. *Oncogene* **24**: 3691-3696.
- Davidson, M.B., Y. Katou, A. Keszthelyi, T.L. Sing, T. Xia, J. Ou, J.A. Vaisica, N. Thevakumaran, L. Marjavaara, C.L. Myers, A. Chabes, K. Shirahige and G.W. Brown. 2012. Endogenous DNA replication stress results in expansion of dNTP pools and a mutator phenotype. *EMBO J* **31**: 895-907.
- Deng, C.X. 2002. Roles of BRCA1 in centrosome duplication. *Oncogene* **21**: 6222-6227.
- Gay, S., A.M. Lachages, G.A. Millot, S. Courbet, A. Letessier, M. Debatisse and O. Brison. 2010. Nucleotide supply, not local histone acetylation, sets replication origin usage in transcribed regions. *EMBO Rep* **11**: 698-704.
- Godinho, S.A., M. Kwon and D. Pellman. 2009. Centrosomes and cancer: how cancer cells divide with too many centrosomes. *Cancer Metastasis Rev* **28**: 85-98.
- Gorgoulis, V.G., L.V. Vassiliou, P. Karakaidos, P. Zacharatos, A. Kotsinas, T. Liloglou, M. Venere, R.A.J. Dittullo, N.G. Kastrinakis, B. Levy, D. Kletsas, A. Yoneta, M. Herlyn, C. Kittas and T.D. Halazonetis. 2005. Activation of the DNA damage checkpoint and genomic instability in human precancerous lesions. *Nature* **434**: 907-913.
- Griffin, C.S., P.J. Simpson, C.R. Wilson and J. Thacker. 2000. Mammalian recombination-repair genes XRCC2 and XRCC3 promote correct chromosome segregation. *Nat Cell Biol* **2**: 757-761.

- Hyrien, O. 2000. Mechanisms and consequences of replication fork arrest. *Biochimie* **82**: 5-17.
- Ingvarsson, S., B.A. Agnarsson, B.I. Sigbjornsdottir, J. Kononen, O.P. Kallioniemi, R.B. Barkardottir, A.J. Kovatich, R. Schwarting, W.W. Hauck, K. Huebner and P.A. McCue. 1999. Reduced Fhit expression in sporadic and BRCA2-linked breast carcinomas. *Cancer Res* **59**: 2682-2689.
- Kraakman-van der Zwet, M., W.J. Overkamp, R.E. van Lange, J. Essers, A. van Duijn-Goedhart, I. Wiggers, S. Swaminathan, P.P. van Buul, A. Errami, R.T. Tan, N.G. Jaspers, S.K. Sharan, R. Kanaar and M.Z. Zdzienicka. 2002. Brca2 (XRCC11) deficiency results in radioresistant DNA synthesis and a higher frequency of spontaneous deletions. *Mol Cell Biol* **22**: 669-679.
- Lahkim Bennani-Belhaj, K., S. Rouzeau, G. Buhagiar-Labarchede, P. Chabosseau, R. Onclercq-Delic, E. Bayart, F. Cordelieres, J. Couturier and M. Amor-Gueret. 2010. The Bloom syndrome protein limits the lethality associated with RAD51 deficiency. *Mol Cancer Res* **8**: 385-394.
- Lambert, S. and B.S. Lopez. 2000. Characterization of mammalian RAD51 double strand break repair using non lethal dominant negative forms. *EMBO J.* **19**: 3090-3099.
- Laulier, C., A. Cheng and J.M. Stark. 2011. The relative efficiency of homology-directed repair has distinct effects on proper anaphase chromosome separation. *Nucleic Acids Res*
- Lee, H., A.H. Trainer, L.S. Friedman, F.C. Thistlethwaite, M.J. Evans, B.A. Ponder and A.R. Venkitaraman. 1999. Mitotic checkpoint inactivation fosters transformation in cells lacking the breast cancer susceptibility gene, Brca2. *Mol Cell* **4**: 1-10.
- Letessier, A., G.A. Millot, S. Koundrioukoff, A.M. Lachages, N. Vogt, R.S. Hansen, B. Malfoy, O. Brison and M. Debatisse. 2011. Cell-type-specific replication initiation programs set fragility of the FRA3B fragile site. *Nature* **470**: 120-123.

- Lomonosov, M., S. Anand, M. Sangrithi, R. Davies and A.R. Venkitaraman. 2003. Stabilization of stalled DNA replication forks by the BRCA2 breast cancer susceptibility protein. *17*: 3017-3022.
- McEllin, B., C.V. Camacho, B. Mukherjee, B. Hahm, N. Tomimatsu, R.M. Bachoo and S. Burma. 2010. PTEN loss compromises homologous recombination repair in astrocytes: implications for glioblastoma therapy with temozolomide or poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors. *Cancer Res* **70**: 5457-5464.
- Michalet, X., R. Ekong, F. Fougerousse, S. Rousseaux, C. Schurra, N. Hornigold, M. van Slegtenhorst, J. Wolfe, S. Povey, J.S. Beckmann and A. Bensimon. 1997. Dynamic molecular combing: stretching the whole human genome for high-resolution studies. *Science* **277**: 1518-1523.
- Michel, B., M.J. Flores, E. Viguera, G. Grompone, M. Seigneur and V. Bidnenko. 2001. Rescue of arrested replication forks by homologous recombination. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 8181-8188.
- Nigg, E.A. 2002. Centrosome aberrations: cause or consequence of cancer progression? *Nat Rev Cancer* **2**: 815-825.
- Petermann, E., M.L. Orta, N. Issaeva, N. Schultz and T. Helleday. 2010. Hydroxyurea-stalled replication forks become progressively inactivated and require two different RAD51-mediated pathways for restart and repair. *Mol Cell* **37**: 492-502.
- Plo, I., C. Laulier, L. Gauthier, F. Lebrun, F. Calvo and B.S. Lopez. 2008. AKT1 inhibits homologous recombination by inducing cytoplasmic retention of BRCA1 and RAD51. *Cancer Res* **68**: 9404-9412.

- Plo, I. and B. Lopez. 2009. AKT1 represses gene conversion induced by different genotoxic stresses and induces supernumerary centrosomes and aneuploidy in hamster ovary cells. *Oncogene* **28**: 2231-2237.
- Poli, J., O. Tsaponina, L. Crabbe, A. Keszthelyi, V. Pantesco, A. Chabes, A. Lengronne and P. Pasero. 2012. dNTP pools determine fork progression and origin usage under replication stress. *EMBO J* **31**: 883-894.
- Saintigny, Y., F. Delacote, G. Vares, F. Petitot, S. Lambert, D. Aeverbeck and B.S. Lopez. 2001. Characterization of homologous recombination induced by replication inhibition in mammalian cells. *EMBO J* **20**: 3861-3870.
- Schlacher, K., N. Christ, N. Siaud, A. Egashira, H. Wu and M. Jasin. 2011. Double-strand break repair-independent role for BRCA2 in blocking stalled replication fork degradation by MRE11. *Cell* **145**: 529-542.
- Shen, W.H., A.S. Balajee, J. Wang, H. Wu, C. Eng, P.P. Pandolfi and Y. Yin. 2007. Essential role for nuclear PTEN in maintaining chromosomal integrity. *Cell* **128**: 157-170.
- Skoog, L. and B. Nordenskjold. 1971. Effects of hydroxyurea and 1-beta-D-arabinofuranosylcytosine on deoxyribonucleotide pools in mouse embryo cells. *Eur J Biochem* **19**: 81-89.
- Sluder, G. and J.J. Nordberg. 2004. The good, the bad and the ugly: the practical consequences of centrosome amplification. *Curr Opin Cell Biol* **16**: 49-54.
- Walsh, T., S. Casadei, M.K. Lee, C.C. Pennil, A.S. Nord, A.M. Thornton, W. Roeb, K.J. Agnew, S.M. Stray, A. Wickramanayake, B. Norquist, K.P. Pennington, R.L. Garcia, M.C. King and E.M. Swisher. 2011. Mutations in 12 genes for inherited ovarian, fallopian tube, and peritoneal carcinoma identified by massively parallel sequencing. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**: 18032-18037.

Walsh, T. and M.C. King. 2007. Ten genes for inherited breast cancer. *Cancer Cell* **11**: 103-105.

Wiegant, W.W., R.M. Overmeer, B.C. Godthelp, P.P. van Buul and M.Z. Zdzienicka. 2006.

Chinese hamster cell mutant, V-C8, a model for analysis of Brca2 function. *Mutat Res* **600**:
79-88.

Figure legends

Figure 1. Phosphorylation of Chk1 (pChk1). **A/** in untreated cells. **B/** After exposure to increasing doses of HU.

Figure 2. The effect of low doses of HU on replication speed. **A/** Molecular combing following treatment with 100 μ M HU. Upper panels: sample fibers; lower panels: kinetic distributions of replication tracts; the mean replication speed is indicated in kb/min. The histogram distributions are aligned, and the dotted line corresponds to the mean replication velocity in control cells (NT). At least 120 fibers were counted per condition.

Figure 3. Effect of very low doses of HU. Molecular combing following treatment with 5 or 10 μ M HU: kinetics of fork progression; the mean replication speed is indicated in kb/min. The distributions of replication speed are aligned, and the dotted lines correspond to non-treated (NT), HR-proficient cells. At least 120 fibers were counted per condition.

Figure 4. The effect of low HU doses on supernumerary centrosomes. **A/** Examples of centrosomes monitored using immunofluorescence. Left panels: DAPI staining of chromosomes (metaphasic plaques). Right panels: centrosome staining using an anti- γ -tubulin antibody. Examples of faithfully duplicated centrosomes (=2) (yellow arrow) or supernumerary centrosomes (>2) (white arrows). **B/** Histograms of the frequency of cells with supernumerary centrosomes following exposure to 100 μ M HU in HR-proficient cells. **C/** The frequency of cells with supernumerary centrosomes following exposure to low HU doses in HR-proficient *versus*

untreated HR-deficient cells. Left panel: V79 and derivatives. Right panel: VC-8 *versus* brca2-complemented VC-8#13 cells. The cell lines and HU doses used are indicated in each panel. The values correspond to at least three independent experiments. A total of 150 mitotic cells per cell line were analyzed per condition.

Figure 5. The effect of adding dNS. **A/** Replication fork speed after dNS addition. The mean speeds are indicated in the figure. Nd: not different. *, Statistically significant difference ($p < 0.05$). **B/** The pChk1 activation. **C/** The frequency of supernumerary centrosomes.

Figure 1 Wilhelm et al.

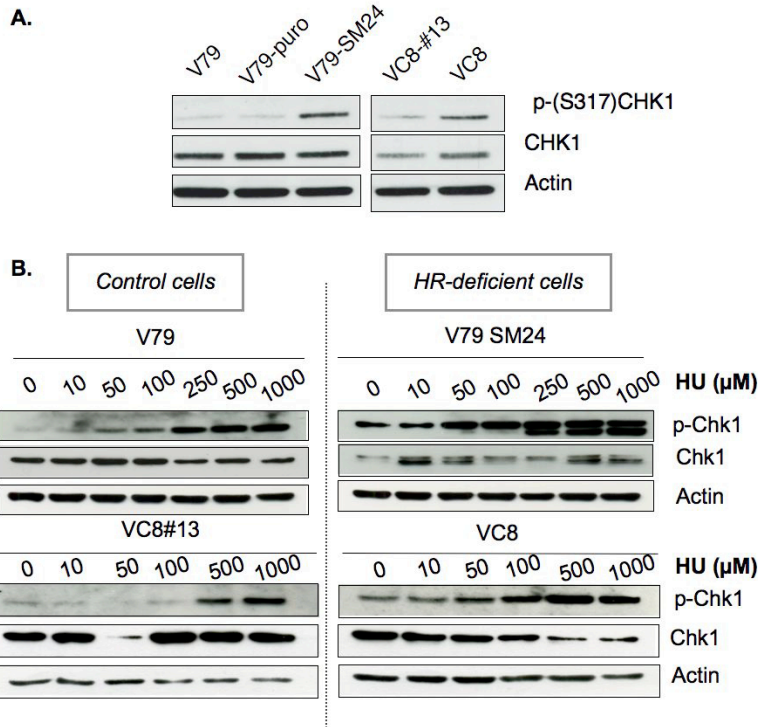


Figure 2 Wilhelm et al.

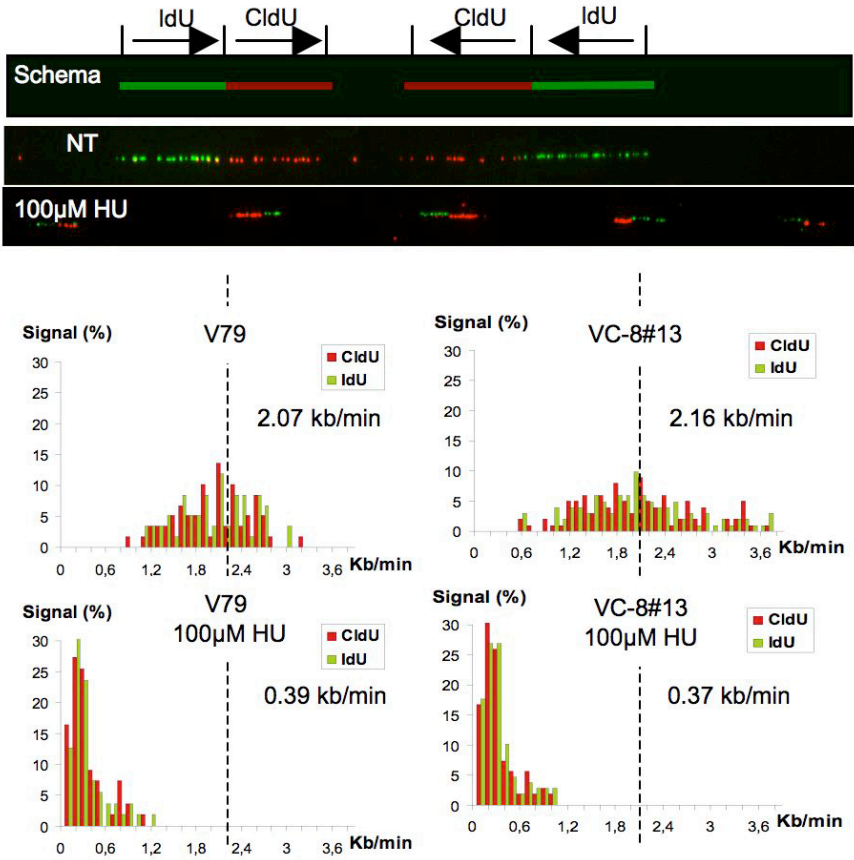


Figure 3 Wilhelm et al.

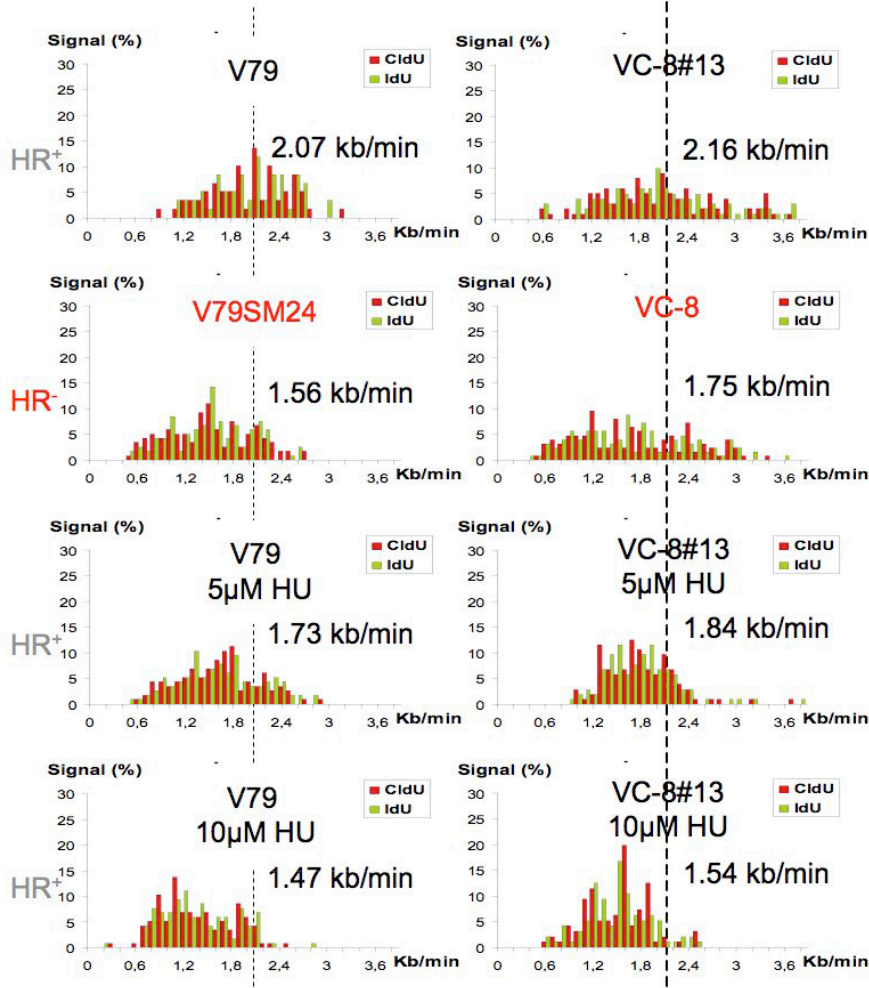


Figure 4 Wilhelm et al.

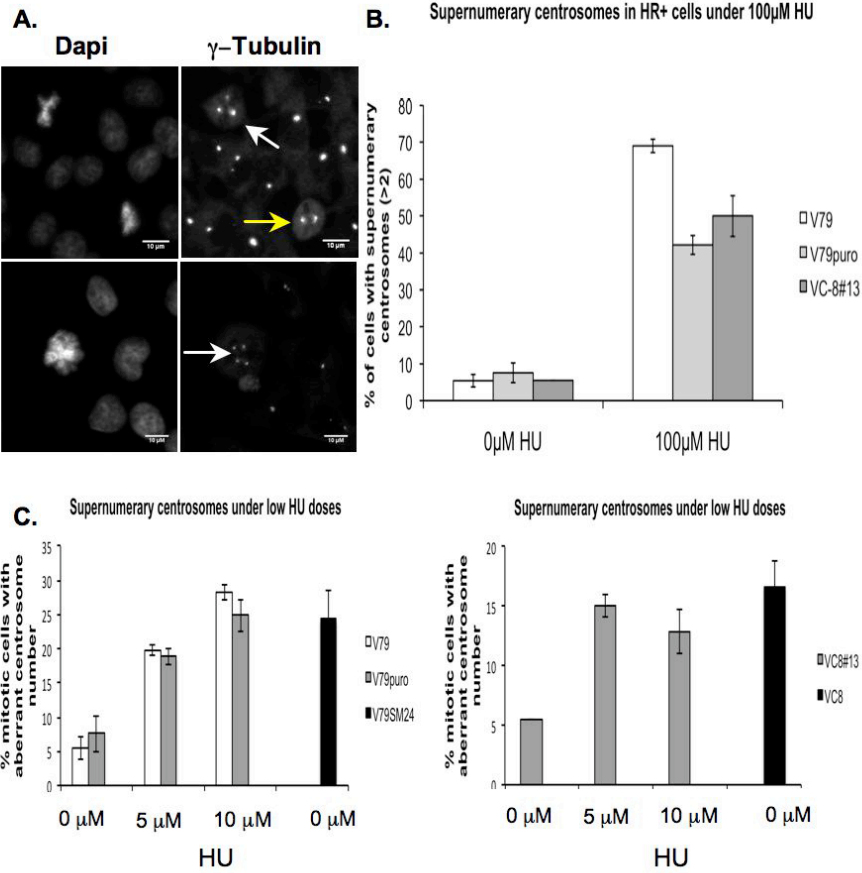
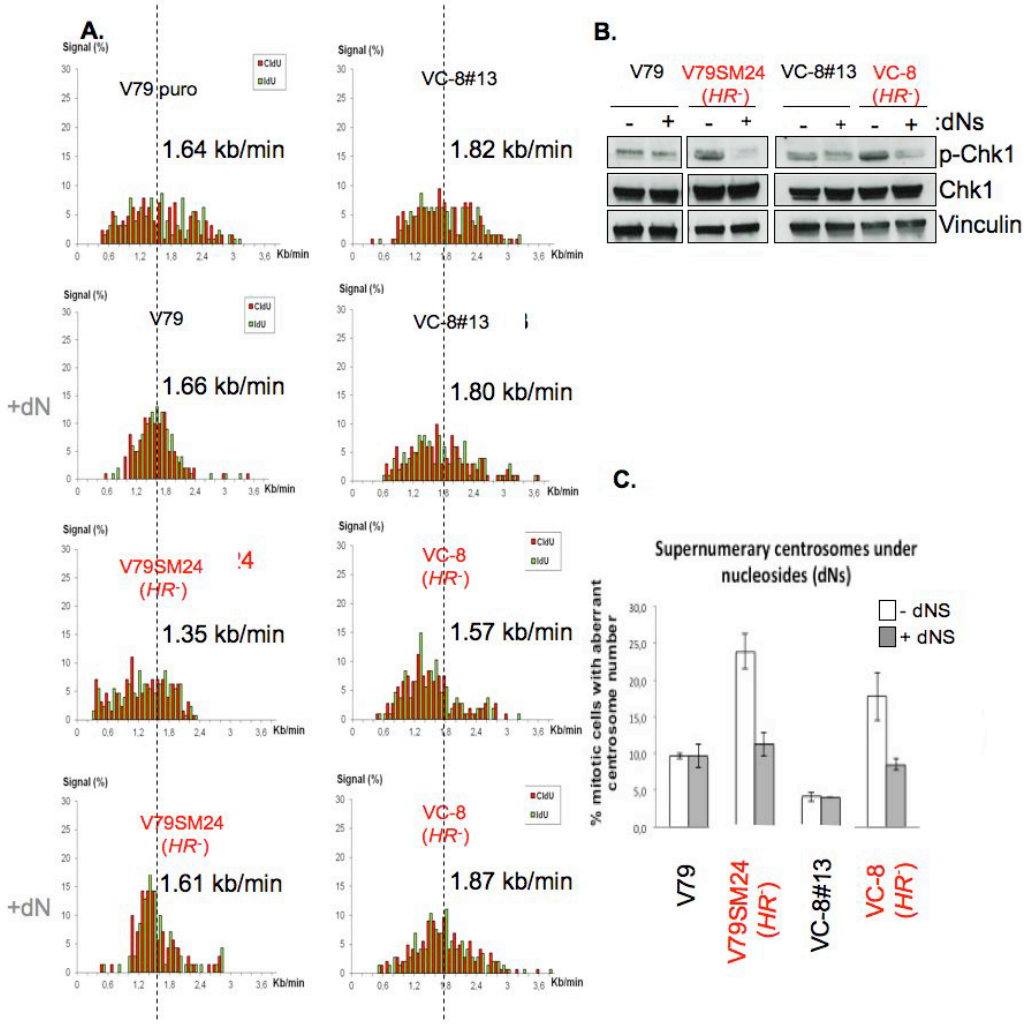


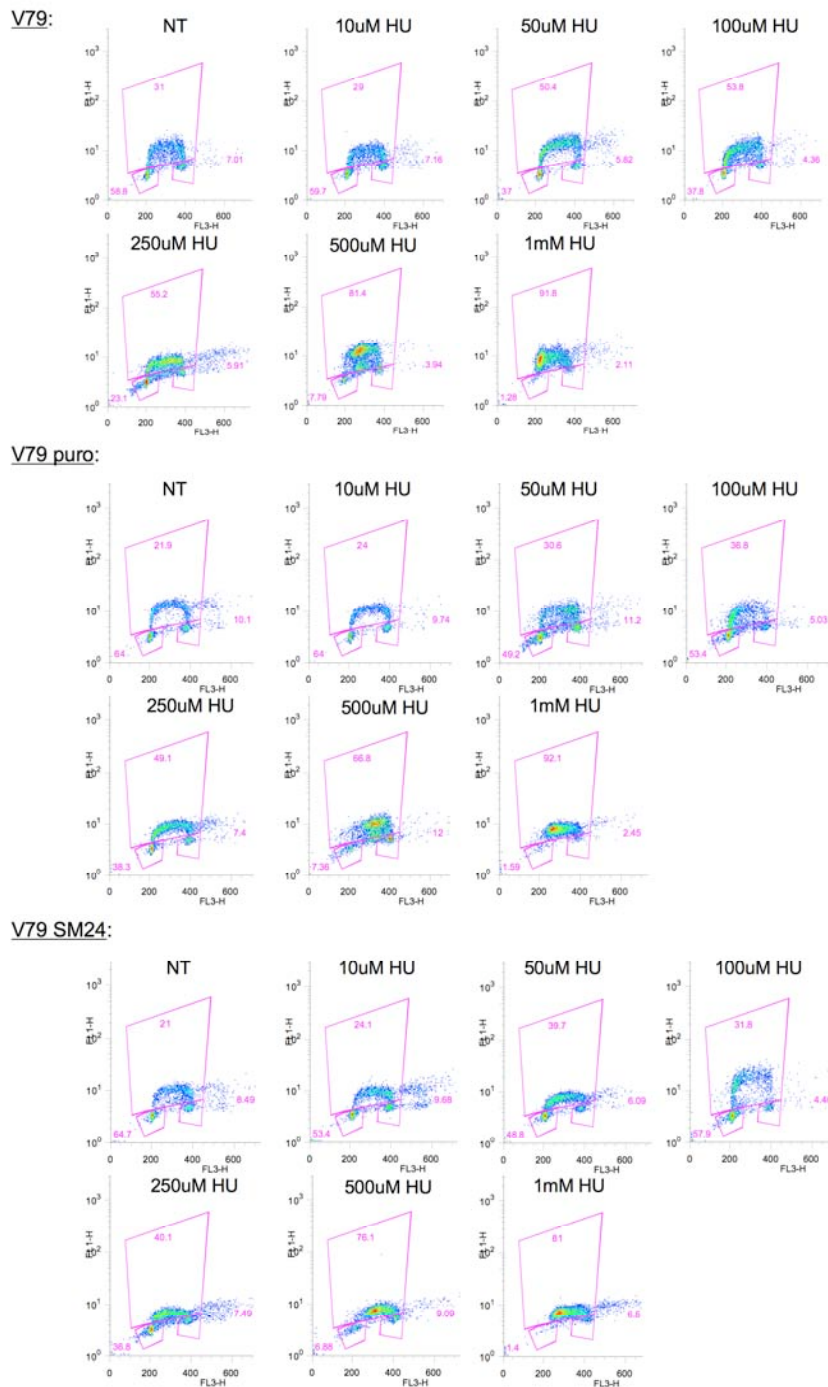
Figure 5 Wilhelm et al.



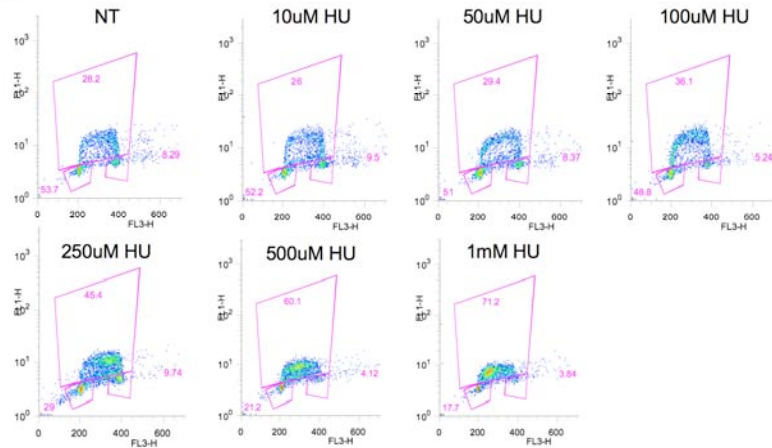
Supplementary data

S1. Impact of increasing doses of HU on cell cycle distribution.

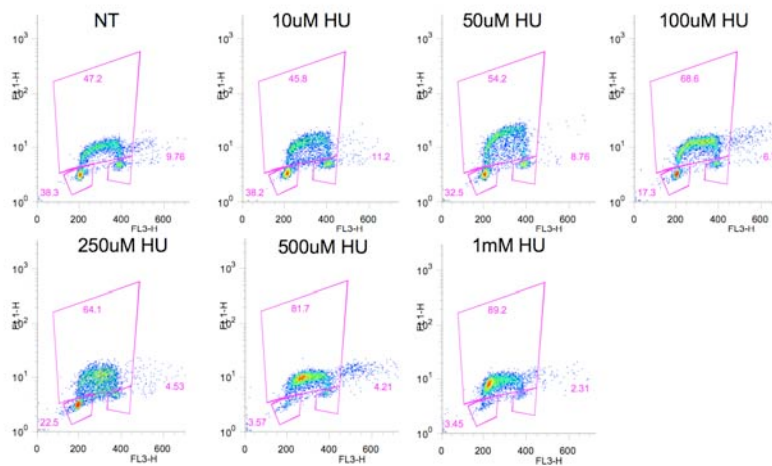
The name of the cell lines, the doses and the frequencies of cells in G1, S and G2/M phases are indicated on the figures.



VC8-13:



VC8:



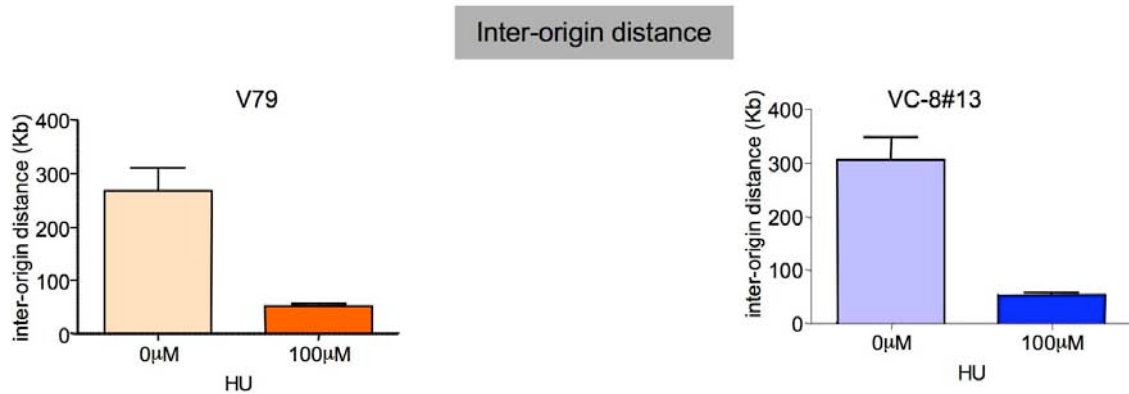
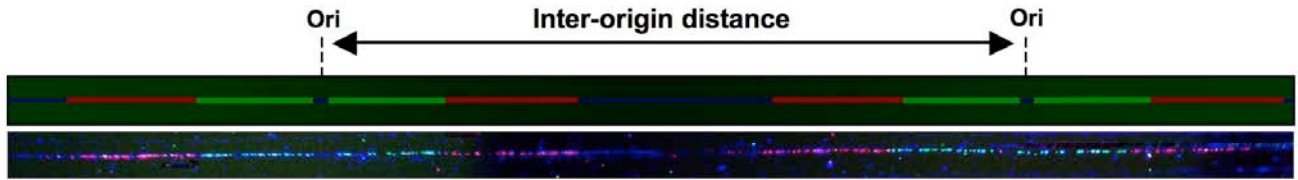
MATERIAL AND METHODS

Cells were grown to 70% confluence, labeled for 20 min with 50 μ M BrdU, washed in PBS, suspended in 500 μ l PBS and fixed in 70% cold ethanol. The fixed cells were then resuspended in 1 ml of 0.5 mg/ml pepsin in 0.1 N HCl, and 1 ml 2 N HCl was added. Following a 40-min incubation in the dark, the suspension was neutralized with PBS containing 0.1% BSA and 0.05% Tween 20. The cells were incubated in a primary antibody solution containing mouse anti-BrdU coupled to FITC (1:25) for at least 1 h in the dark. Secondary antibody was added (goat anti-mouse Alexa Fluor 488, 1:50) after several washes. DNA content labeling using PI was performed as a final step. The cells were incubated for 30 min in PBS solution containing 0.1% BSA, 0.05% Tween 20, 50 μ g/ml RNase and 25 μ g/ml PI. The cell cycle distribution was

analyzed using FACScalibur (Becton-Dickinson). BrdU analyses were assessed using cells treated overnight with hydroxyurea (0 to 1 mM).

S2. Inter-origin distance and fork density upon 100 μ M HU.

A/



B/

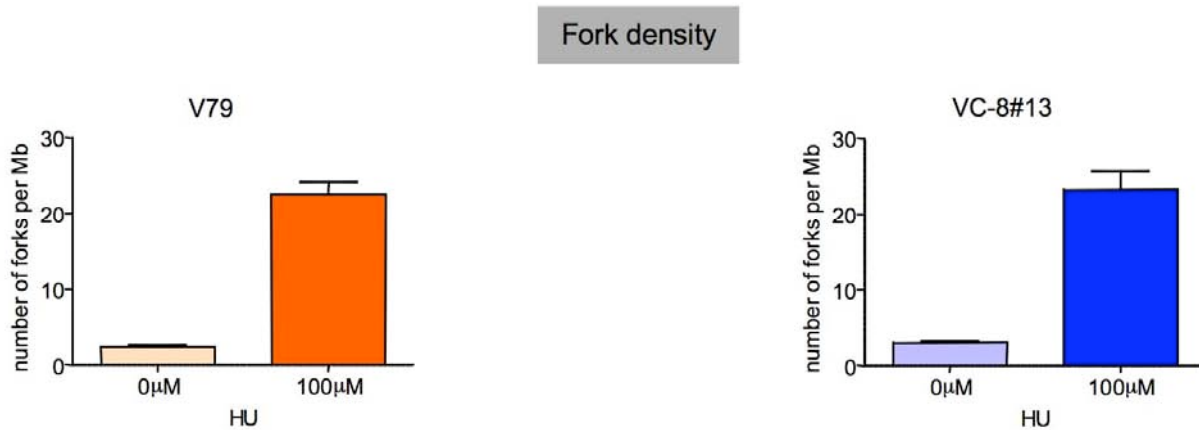


Figure S2: A/ Inter-origin distances. Upper panels: sample fibers; lower panels: histograms of the mean inter-origin distances in each of the cell lines. A total of 100 fibers were counted per condition. C/ Fork density . Histograms of the mean fork density are shown. A total of 100 fibers were counted per condition. NT: not treated.

S3. Inter-origin distance upon 10 mM HU.

Cell lines + treatment	Inter-origin distance (IOD) in Kb	p vs. V79 (p<0.05)	p vs. V79SM24 (p<0.05)
V79	269.8	-----	p=0.0021
V79SM24	164.2	p=0.0021	-----
V79+5μM HU	181.0	p=0.0200	p=0.5832
V79+10μM HU	155.9	p=0.0010	p=0.7042
V79+100μM HU	52.35	p<0.0001	p<0.0001

Cell lines + treatment0	Inter-origin distance (IOD) in Kb	p vs. VC-8#13 (p<0.05)	p vs. VC-8 (p<0.05)
VC-8#13	305.6	-----	p=0.0277
VC-8	242.1	p=0.0277	-----
VC-8#13+5μM HU	219.9	p=0.0045	p=0.8176
VC-8#13+10μM HU	211.6	p=0.0018	p=0.4756
VC- 8#13+100μM HU	53.02	p<0.0001	p<0.0001

Figure S3. Inter-origin distances in HR-deficient (grey line) *versus* non-treated HR-proficient cells or HR-proficient cells exposed to low HU doses. Upper table: V79 cells and derivatives; lower table: VC-8 cells and derivatives.

S4. Mitotic index

First, we monitored mitotic cells by detecting phosphorylated histone H3 (Figure S2A). We confirmed these data by quantification of cells with condensed chromosomes using DAPI staining (Figure S2B). Both methods showed that the mitotic index was spontaneously and significantly increased three-to-four fold in HR-defective cells compared to their respective controls (Figures S2C and S2D). We next tested whether 5 μ M could also affect the mitotic progression and found a significant increase in the mitotic index to a level comparable to that of unchallenged HR-deficient cells (Figures S2C and S2D). HU treatment did not affect the mitotic index of HR-defective cells, which was already high. These data suggest that unchallenged HR-defective cells and wild-type cells exposed to the low HU doses experience mitotic delay

MATERIAL AND METHODS

The mitotic index was measured using two methods: DAPI staining and phosphorylated histone H3 detection. In the first method, DAPI staining was used to count the condensed chromosomes. Permeabilized and fixed cells (see above) were stained with DAPI (2 μ g/ml) and mounted in Vectashield. In the second method, phosphorylated histone H3 (mitosis marker) levels were determined. Non-specific binding sites were saturated for 30 min (2% FBS in PBS) at 37°C. The cells were then incubated for 1 h at 37°C with a primary anti-phospho-histone H3 (S10) antibody at 1/150 dilution (Cell Signaling). After three short washes in PBS, the cells were incubated with Alexa Fluor 499-conjugated goat anti-rabbit (Molecular Probes) (1/400) for 45 minutes at 37°C. The cells were subsequently counterstained with DAPI (1 μ g/ml) and mounted in Vectashield. Approximately 1000 cells were counted per cell line per condition.

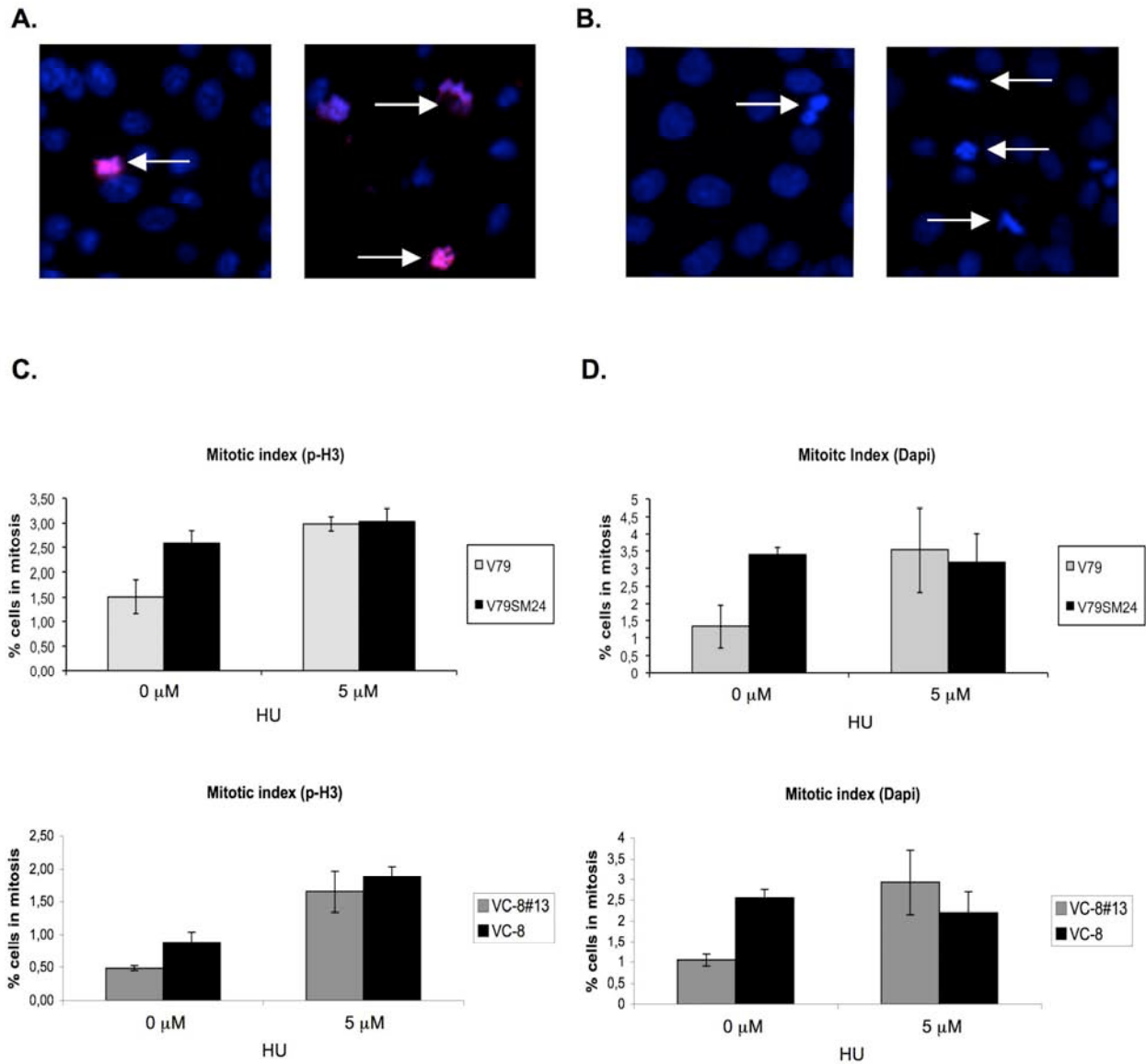


Figure S4. **A/** Example of phospho-H3 labeling monitored using immunofluorescence microscopy. **B/** Example of metaphase-stage cells (white arrow) monitored using DAPI staining. **C/** Frequency of mitotic cells measured with phospho-H3 labeling. **D/** Frequency of cells with condensed chromosomes monitored using DAPI staining. Cell lines and HU doses are indicated. The values correspond to at least three independent experiments. 1000 mitotic cells per cell line were analyzed in each condition.

S5. Impact of HR defect or exposure to very low HU doses on chromosomes segregation

It has been shown that strong replication stress or RAD51 poisoning leads to the formation of anaphase bridges {Chan et al., 2009, Nat Cell Biol, 11, 753-60; Lahkim Bennani-Belhaj et al., 2010, Mol Cancer Res, 8, 385-94; Naim and Rosselli, 2009, Nat Cell Biol, 11, 761-8; Lauzier et al., 2011, Nucleic Acids Res}. Thus, we also followed the formation of anaphase bridges (see examples Figure S5A, S5B) under slow replication fork kinetics, which do not affect cell cycle progression, i.e., in unchallenged HR-deficient cells and wild-type cells treated with very low HU doses.

First the mitotic index was spontaneously increased three-to-four-fold in HR-defective cells compared to their respective controls (Supplementary Data S4); 5 μ M HU increased the mitotic index to a level comparable to that of unchallenged HR-deficient cells (Supplementary Data S4C and S4D). Second, time-lapse video microscopy revealed a delay in mitosis resulting from prolonged metaphase arrest followed by aberrant chromosome segregation in HR-deficient cells (Supplementary Data S5A and S6). Third the percentage of cells displaying anaphase bridges (Supplementary Data S5A, S5B, S7) 3-fold increased in HR-deficient cells, from 18.5% in wild-type cells to 58.2% in HR-deficient cells (Supplementary Data S5C). Fourth, we show here that HR-deficient cells undergo aberrant mitosis and chromosome segregation. Here, aberrant mitosis refers to unequal chromosome segregation and division in more than two cells, which is generally generated by multipolar mitosis (supplementary data S5A, S8). Strikingly, the frequency of aberrant mitosis was 9-fold increased, in HR-deficient cells, from 2.2% in wild-type cells to 20% in HR-deficient cells (Supplementary Data S5D). Exposure to 100 μ M HU led to a strong stimulation (>80% of cells) of both anaphase bridges and aberrant mitosis. Interestingly,

exposure to 5 and 10 μM HU also led to anaphase bridge and abnormal mitosis levels that were similar to that of unchallenged HR-defective cells (Supplementary Data S5C and S5D). Note that these doses also similarly affected replication dynamics, mitotic index and supernumerary centrosomes.

These data show that supernumerary centrosomes are accompanied with mitosis troubles both in HR-deficient cells and in wild-type cells submitted to low doses of HU.

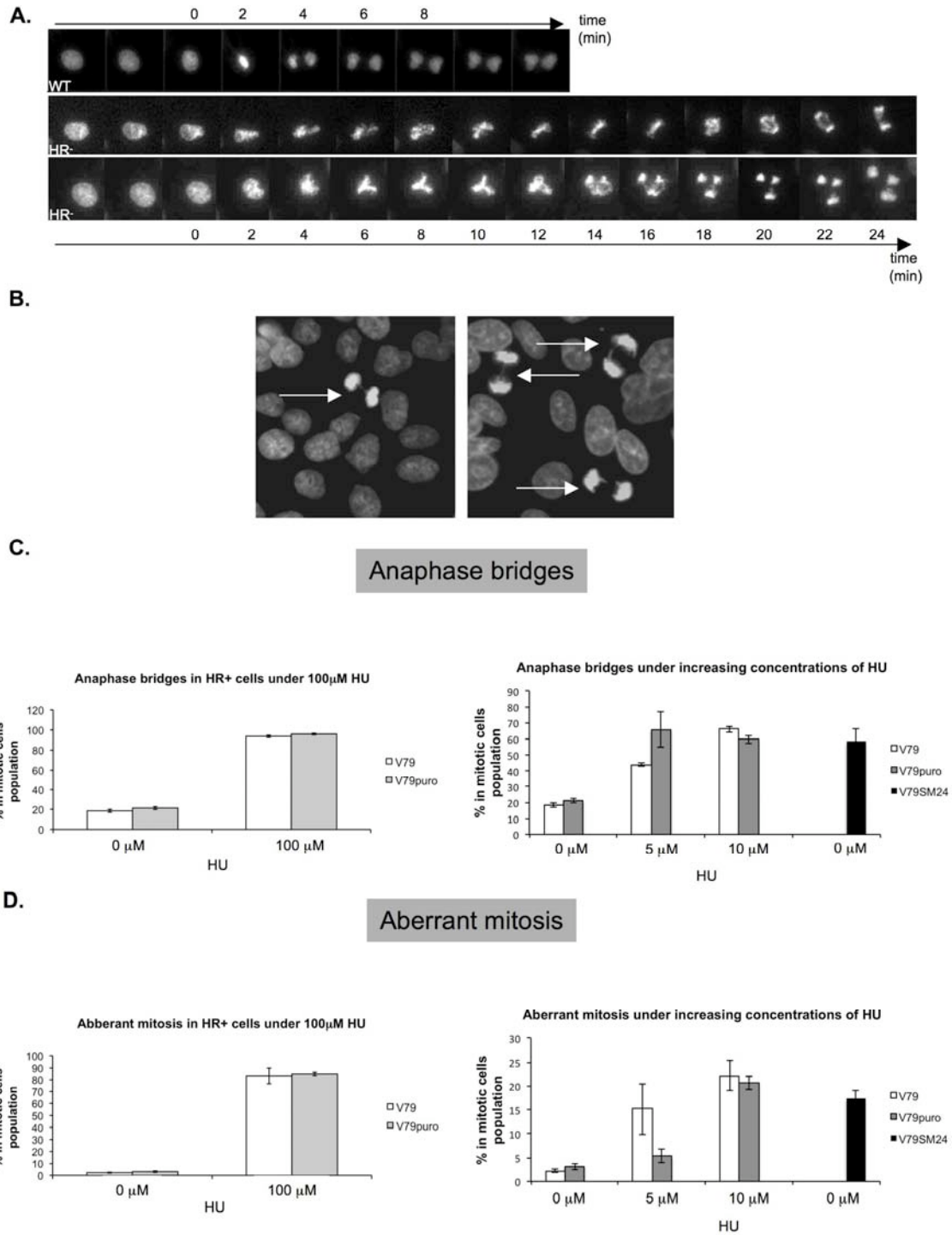
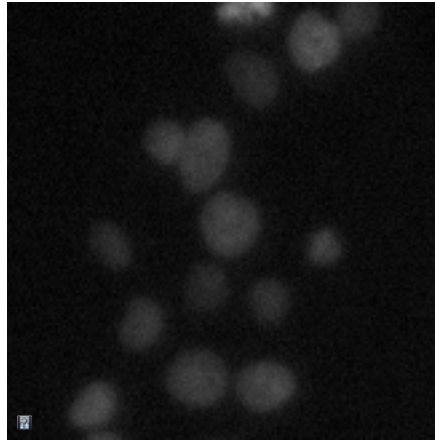


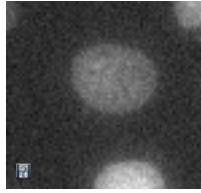
Figure S5: Mitosis abnormalities. **A/** Examples of anaphase bridges (upper panels) and aberrant mitosis (i.e., multipolar cells and unbalanced chromosome segregation; lower panel) as monitored using time-lapse video microscopy. **B/** Examples of anaphase bridges (white arrows)

measured using DAPI staining. **C/** The effect of low HU doses on the frequency of anaphase bridges. Left panel: 100 μ M. Right panel: 5 and 10 μ M HU. The cell lines and HU doses used are indicated. **D/** Impact of low HU doses on the frequency of aberrant mitosis. Left panel: 100 μ M; right panel: 5 and 10 μ M HU. The cell lines and HU doses used are indicated. The values correspond to at least three independent experiments. A total of 300 mitotic cells were analyzed per condition.

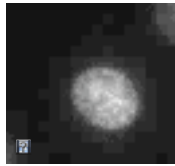
S6. Time-lapse video microscopy: Examples of normal and aberrant mitosis and mitosis with anaphases bridges. Note one exemple of delayed segregation .



S7. Time-lapse video microscopy: example of anaphase bridges.



S8. Time-lapse video microscopy: example of aberrant mitosis (multipolar mitosis).

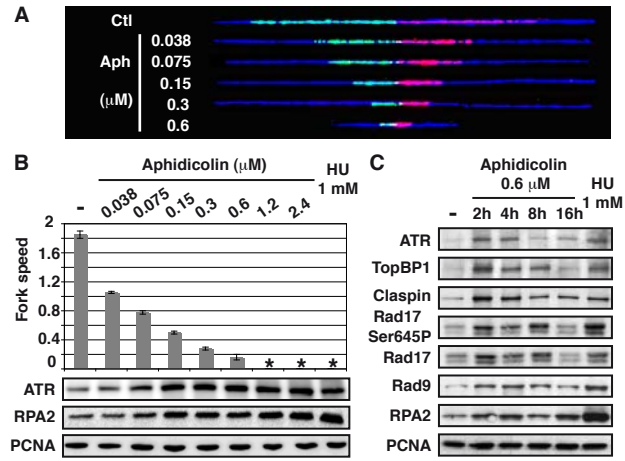


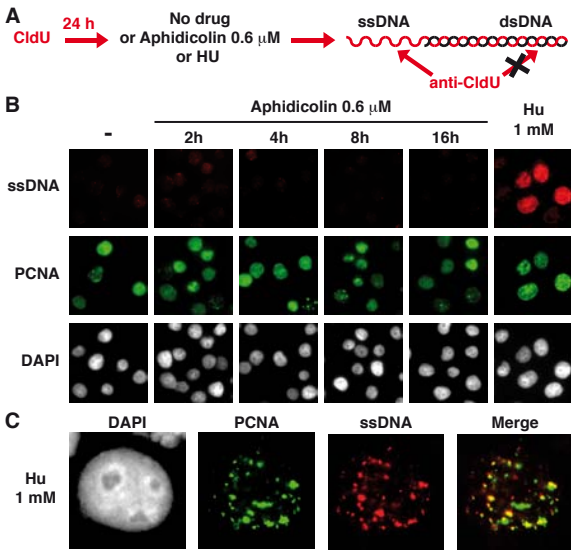
4. Publication #3

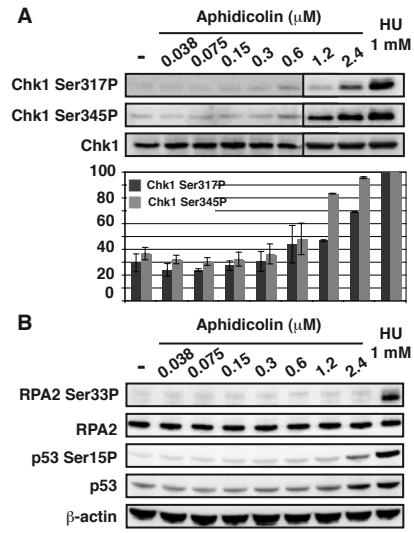
Stepwise activation of DNA-damage checkpoint upon increasing replication stress : impact on common fragile site integrity

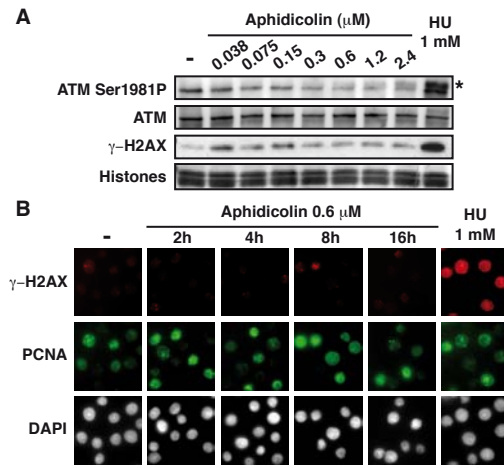
Stéphane Koundrioukoff, Sandra Carignon*, Hervé Técher*, Anne Letessier, Olivier Brison and Michelle Debatisse

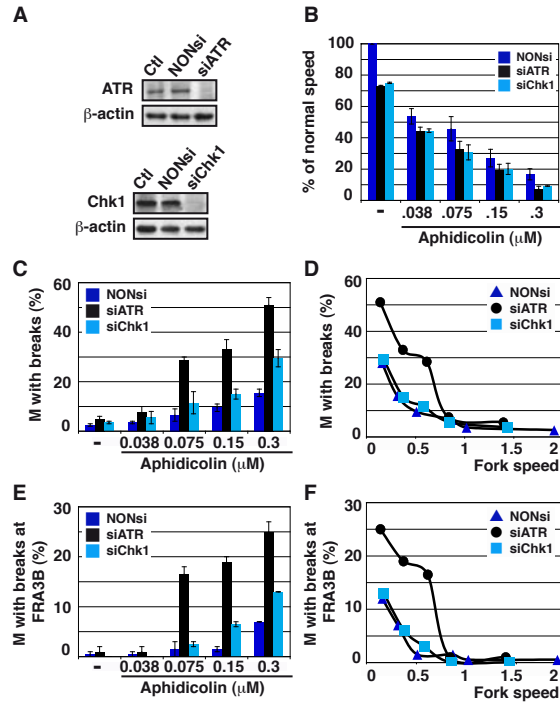
Publication soumise

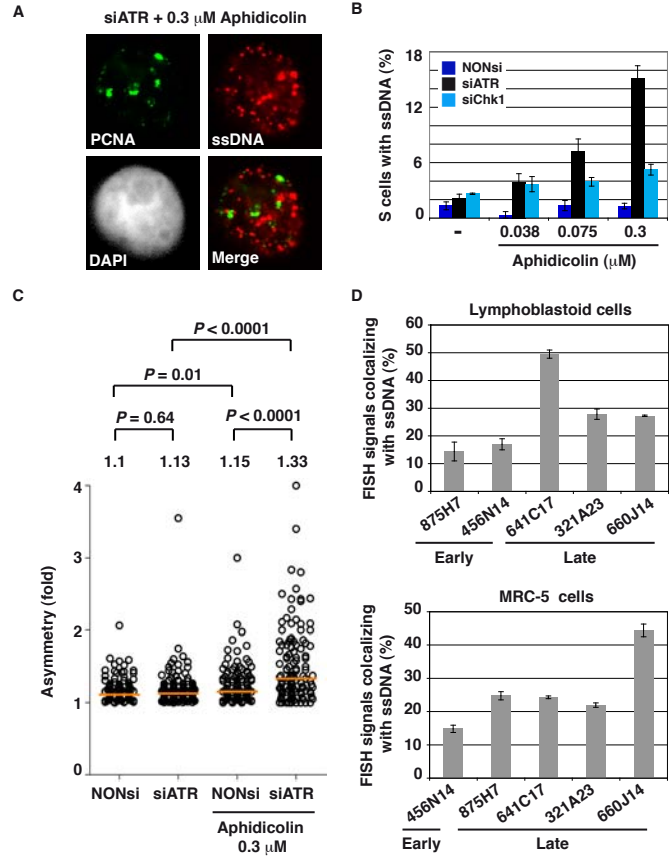


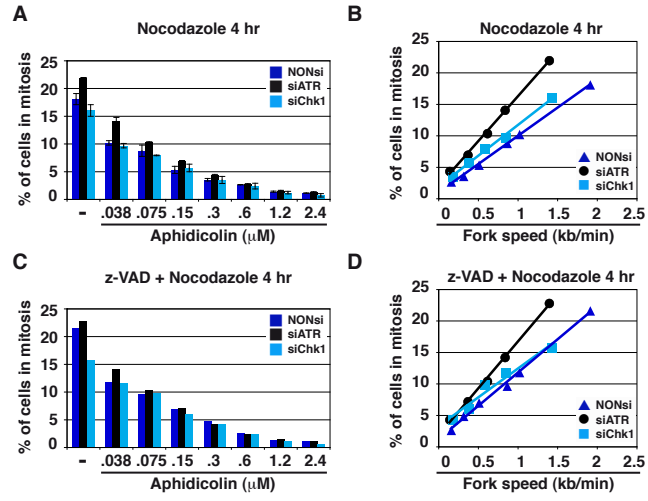




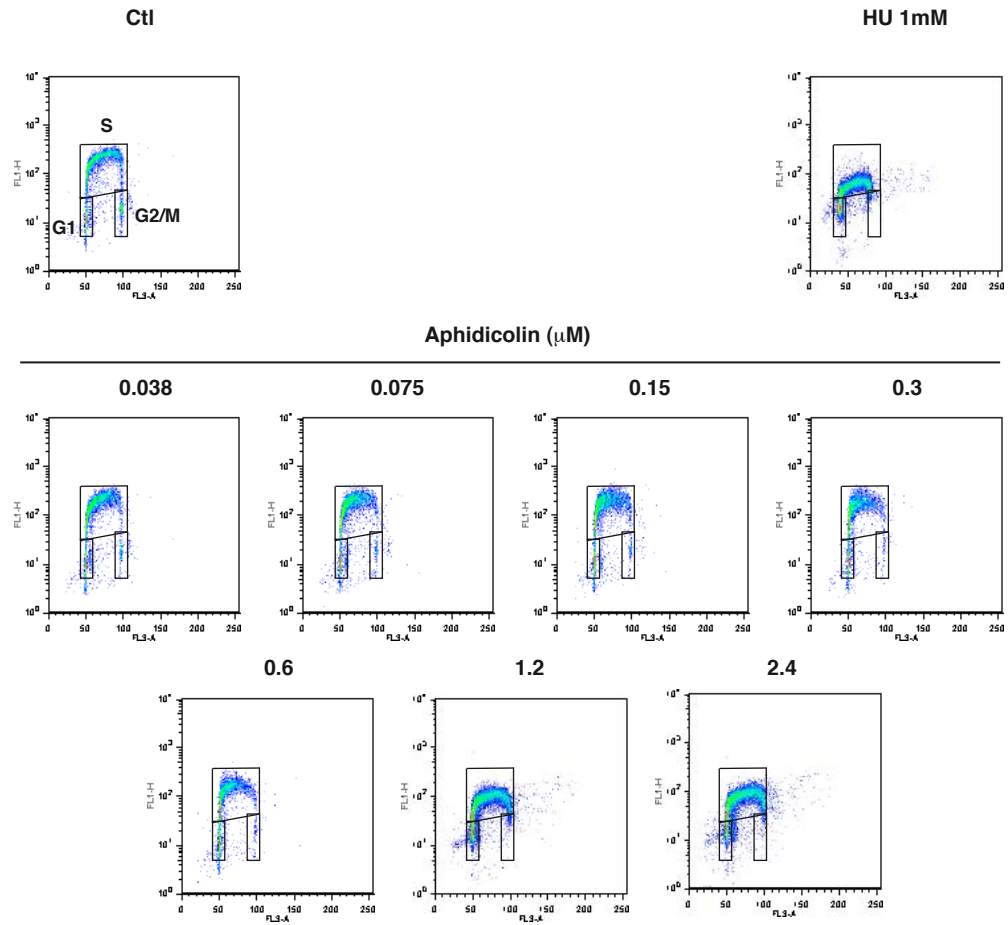




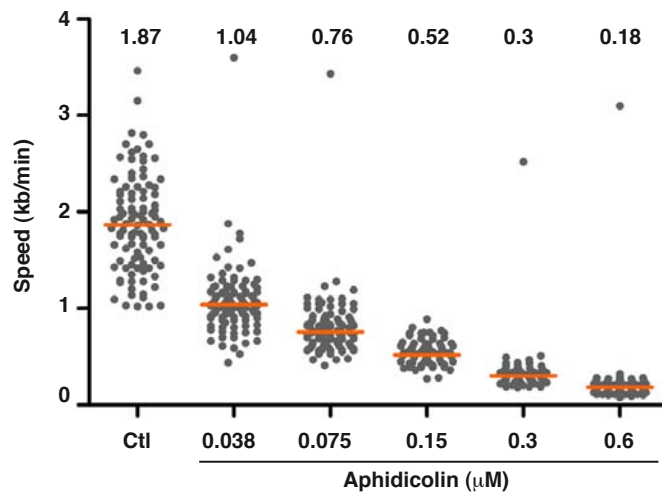


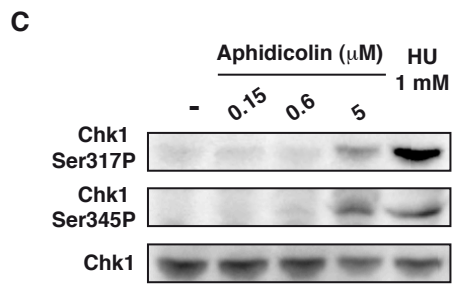
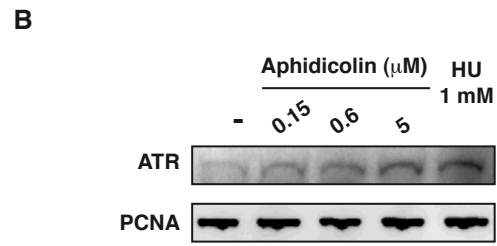
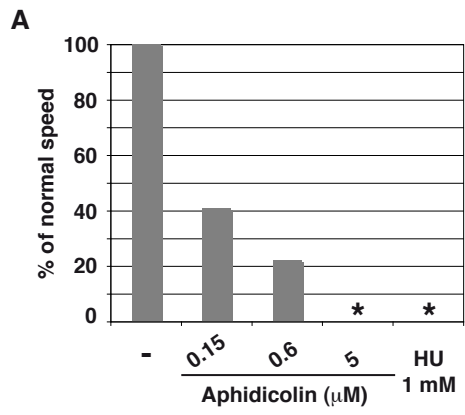


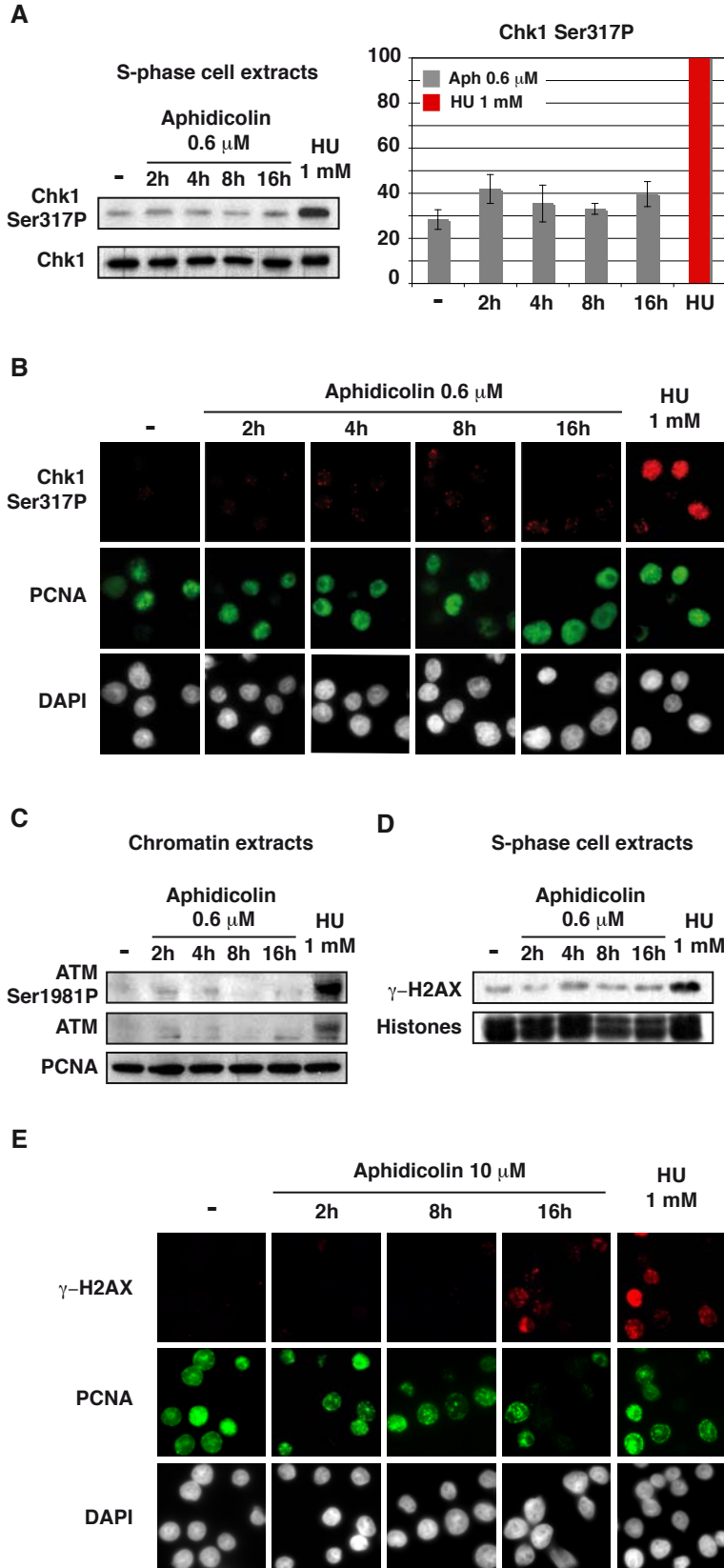
A

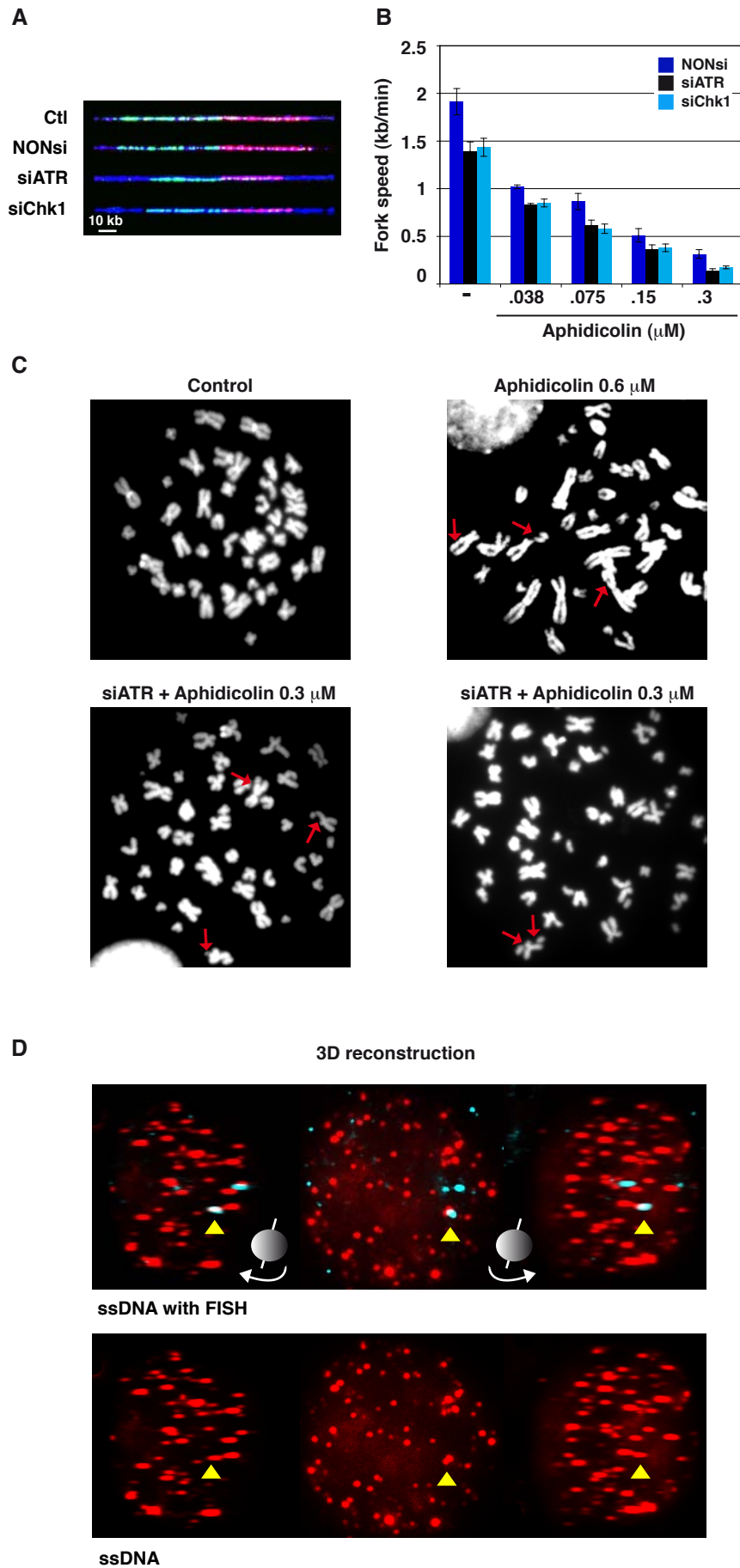


B

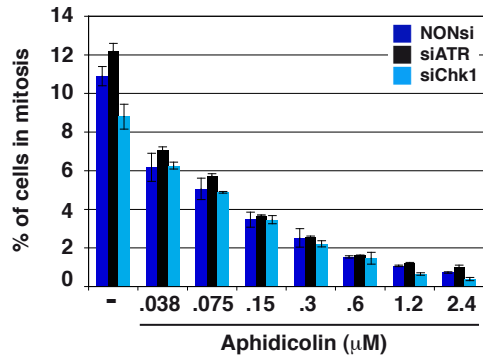




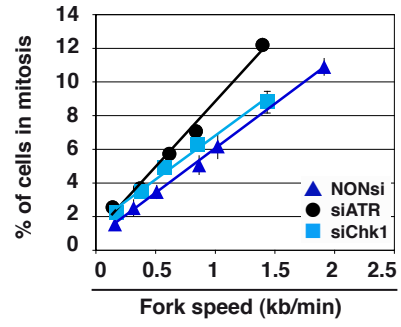




A

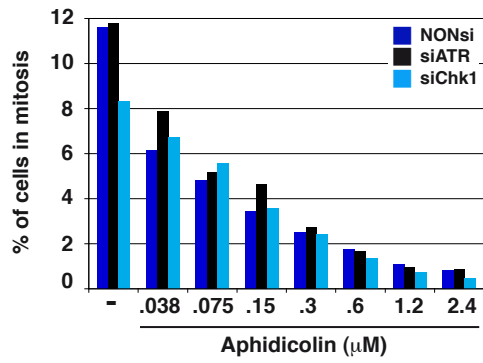


B



C

z-VAD + Nocodazole 2 hr



D

z-VAD + Nocodazole 2 hr

